

Filipe Miguel da Cunha Saraiva Santos

A doença de Alzheimer – importância dos metais na neuropatologia da doença.

Universidade Fernando Pessoa – Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2011

Filipe Miguel da Cunha Saraiva Santos

**A doença de Alzheimer – importância dos metais na
neuropatologia da doença.**

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Porto, 2011

Filipe Miguel da Cunha Saraiva Santos

A doença de Alzheimer – importância dos metais na neuropatologia da doença.

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Sumário

A doença de Alzheimer foi identificada pela primeira vez pelo psiquiatra e neuropatologista alemão Alois Alzheimer, em 1906. É descrita como uma doença que proporciona uma redução do número de neurónios, com diminuição da síntese dos neurotransmissores de uma forma lenta, progressiva e irreversível. É um mal social que actualmente não tem cura, uma das piores doenças em todo o mundo e que afecta em maior número os idosos.

A grande dificuldade na resolução definitiva desta questão prende-se, essencialmente, com a complexidade do diagnóstico clínico e com a ambiguidade dos critérios de diagnóstico correntes. O carácter subjectivo de alguns sintomas e a fiabilidade duvidosa dos instrumentos utilizados na sua avaliação constituem dificuldades adicionais no seu diagnóstico rigoroso e conclusivo. O desenvolvimento do conceito de demência e diagnóstico revela ser fulcral para o melhor entendimento da doença de Alzheimer.

Neste trabalho é possível inferir como se manifesta a doença de Alzheimer, passando pela caracterização do péptido β -amilóide e da proteína precursora amilóide e de todos os processos envolvidos, assim como a relação que existe com o colesterol e a cafeína.

O equilíbrio dos metais iónicos é crucial para muitas funções fisiológicas, em particular no sistema nervoso central. Os iões metálicos como o cobre, o ferro e o zinco são essenciais para o desenvolvimento e manutenção de várias actividades enzimáticas, funções mitocondriais, neurotransmissão, bem como memorização e aprendizagem. As células têm a capacidade de controlar a homeostasia dos iões metálicos. Contudo, havendo uma desregulação na homeostasia dos metais iónicos e uma consequente alteração do balanço iónico, pode resultar num estado grave de doença, proporcionando desordens neurodegenerativas como a doença de Alzheimer.

O melhor entendimento de todas as interações dos íons metálicos com os componentes intra e extracelulares do sistema nervoso central, em condições normais, e durante o processo de neurodegeneração, é essencial para o desenvolvimento de terapias eficazes.

Abstract

The Alzheimer disease was firstly identified in 1906 by the German psychiatrist and neuropathologist Alois Alzheimer. We can consider this disease as leading to a decrease of the number of neurons, by a reduction of the synthesis of the neurotransmitters through a slow, progressive and irreversible way. Being one of the worst illnesses all over the world, it's obviously a social problem with no cure which attacks majority the oldest people.

The big difficulty for the definite resolution of this question is mainly concerned with the complexity of the clinical diagnosis and the ambiguity of the current diagnosis standards. The subjective character of some symptoms and the dubious viability of the methods used in its evaluation can be additional difficulties in its accurate and conclusive diagnosis. The development of the concept of insanity and diagnostic reveals itself as essential for a best understanding of the Alzheimer disease.

In this dissertation it's possible to conclude how the Alzheimer disease can happen through the characterization of the β -amyloid peptide and the amyloid precursor protein, as well as all the involved methods and the relation with the cholesterol and the caffeine.

The equilibrium of the ionic metals is crucial for many physiological functions, specially in the central nervous system. The metallic ions like copper, iron and zinc are essential for the continuity and the maintenance of the several enzymatic activities, the mitochondrial functions, the neurotransmission and also the memorization and the apprenticeship. The cells have the hability of controlling the homeostasis of the metallic ions. However, the disruption in the homeostasis of the metallic ions and a consequent change of the ionic balance can lead to a severe state of the disease, causing neurodegenerative disorders such as the Alzheimer disease.

The best comprehension of all the interactions between the metallic ions and the intra and extra cells constituents of the central nervous system, in normal conditions and

during the process of neurodegeneration, is decisive to the progress of efficient and successful therapies.

Agradecimentos

O presente trabalho é o corolário de muitas horas investidas à volta da importante temática da doença de Alzheimer e sua relação com os metais. Tem sido uma tarefa absorvente, por vezes penosa, quase sempre fascinante. O labor e iniciativa pessoais desenvolvidos, durante este período, podem ter sido decisivos para o resultado final que aqui apresento, mas também importantes foram os contributos dos que me ensinaram e orientaram, e as ajudas e incentivos recebidos. A todos o meu muito obrigado.

Cabe-me agradecer, em particular e em primeiro lugar, à Senhora Professora Doutora Fernanda Leal e à Senhora Professora Doutora Rita Catarino, minhas orientadoras, pelo incentivo e pelo apoio crítico manifestos em todas as fases da preparação e de elaboração deste trabalho.

Índice

I. Introdução	1
1.1. Prevalência	2
1.2. Hipóteses para origem da doença	4
1.3. Alterações fisiológicas/bioquímicas/neurológicas	6
1.4. Diagnóstico	7
1.5. Objectivos do trabalho	10
II. Péptido βA e a PPA	11
2.1. Processamento da PPA	13
2.2. Toxicidade do β A	15
2.3. Processamento da PPA e colesterol	16
2.4. Péptido β A e a apolipoproteína E	18
2.5. Péptido β A e proteína tau	19
III. Stress oxidativo / Radicais livres e a DA	22
3.1. Óxido Nítrico	24
3.2. Peroxidação lipídica	25
3.3. Defesa antioxidativa	27
3.4. Stress oxidativo e DNA	29
3.5. Stress oxidativo e colesterol	30
3.6. Stress oxidativo e proteases	31
3.7. Stress oxidativo e cafeína	31
IV. Metais e a DA	35
4.1. Metais tóxicos	36
iv.i.i. Alumínio	37
iv.i.ii. Chumbo	38
4.2. Biometais	40

iv.ii.i. Cobre	40
iv.ii.ii. Ferro	43
iv.ii.iii. Zinco	45
4.3. Interação dos biometais com a PPA, o β A e a proteína tau	47
V. Tratamento da DA	50
5.1. Inibidores da acetilcolinesterase	50
5.2. Antagonistas não competitivos do N-metil D-aspartato	54
5.3. Inibidores das β - e γ -secretases	55
5.4. Antioxidantes	56
5.5. Quelantes de metais	58
5.6. Compostos não peptídeos	62
5.7. Outros fármacos	64
VI. Conclusão	66
VII. Bibliografia	69

Índice de Figuras

Fig. 1. Comparação de um cérebro normal (à esquerda) com um cérebro de um doente de Alzheimer (à direita)	2
Fig. 2. Representação da estrutura da acetilcolina	5
Fig. 3. Tomografia computadorizada de um cérebro; a imagem da esquerda representa um cérebro saudável e a da direita de um doente de Alzheimer	8
Fig. 4. Imagem que exemplifica uma herança autossómica dominante	12
Fig. 5. Imagem ilustra a formação do βA	14
Fig. 6. Estrutura da ApoE	18
Fig. 7. Estabilização dos microtúbulos pela proteína tau	19
Fig. 8. Hiperfosforilação da proteína tau	20
Fig. 9. (A) Representação da formação de radicais livres com base NO_2^* ; (B) Reacção do H_2O_2 com o catião Fe^{2+} produzindo o radical hidroxilo muito reactivo (OH^*)	25
Fig. 10. Isoprostano	26
Fig. 11. Acroleína	27
Fig. 12. Possível mecanismo do stress oxidativo na DA. (A) Em condições normais, ROS são neutralizados pelo sistema de defesa; (B) Quando a produção de ROS ultrapassa o mecanismo de defesa na DA, ocorre um desequilíbrio resultando em stress oxidativo	28
Fig. 13. Estrutura da cafeína	32
Fig. 14. Esquema que evidencia o processamento da cascata amilóide em volta da PPA e respectiva relação com iões metálicos	35

Fig. 15. Reacção de Fenton: decomposição do H_2O_2 dependente do ferro, com a produção de radicais hidroxilo muito reactivos	36
Fig. 16. Representação da estrutura da tirosina	42
Fig. 17. Representação estrutural da ferritina	44
Fig. 18. Representação estrutural da transferrina	44
Fig. 19. Esquema relativo à homeostase do zinco nas células de mamíferos	46
Fig. 20. Estrutura do donepezilo	51
Fig. 21. Estrutura da rivastigmina	52
Fig. 22. Estrutura da galantamina	53
Fig. 23. Derivado de N-benzilpiperazina	53
Fig. 24. Estrutura da memantina	54
Fig. 25. Diminuição de distúrbios neurotóxicos com a regulação do receptor NMDA através do uso da memantina	55
Fig. 26. Estrutura da coenzima Q10	57
Fig. 27. Estrutura do resveratrol	58
Fig. 28. 3-MT	59
Fig. 29. Desferrioxamina	60
Fig. 30. Estrutura do clioquinol	60
Fig. 31. R-flurbiprofeno	62

Fig. 32. Tramiprosato 62

Fig. 33. Caprospinol 63

Fig. 34. Azul de metileno 63

Fig. 35. Representação da NEP 64

Lista de abreviaturas

β A	Péptido β -Amilóide
3-MT	3-Metalotioneína
8-OxodG	8-Oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
Acroleína	2-Propenal
AChE	Acetilcolinesterase
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
AICD	Domínio do terminal-C intracelular da proteína precursora amiloide (<i>Amyloid precursor protein intracellular domain</i>)
AINE	Anti-inflamatório não esteróide
ALCAR	Acetil-L-carnitina
Alzhemed	Tramiprosato
APH-1	Faringe anterior defectiva 1 (<i>Anterior pharynx-defective 1</i>)
ApoE	Apolipoproteína E
ApoE4	Isoforma 4 da apolipoproteína E
BACE1	Enzima responsável pela clivagem da PPA no local β (<i>Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1</i>)
BAPTA	Ácido 1,2-bis(2-aminofeniloxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético
CuBD	Domínio de ligação ao cobre (<i>Copper-binding domain</i>)
DA	Doença de Alzheimer
FCE	Fluido cerebrospinal
Flurizan	R-flurbiprofeno
FTC- α	Fragmento do terminal-C
FTC- β	Fragmento do terminal-C
FTL	Polipeptídeo leve da ferritina (<i>Ferritin light polypeptide</i>)
GFD	Domínio do factor de crescimento (<i>Growth factor domain</i>)
GSH	Glutationa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HFE	Gene hemacromatose (<i>Hemochromatosis gene</i>)
HMW	Elevado peso molecular (<i>High molecular weight</i>)

IDE	Enzima degradante da insulina (<i>Insulin degrading enzyme</i>)
LA	Ácido R- α -lipóico
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (<i>Low-density lipoprotein</i>)
MAO	Monoamiamina oxidase
MCI	Transtorno cognitivo leve (<i>Mild cognitive impairment</i>)
MMSE	Examinação mental mini do estado (<i>Mini mental state examination</i>)
NEP	Neprilisina
NMDA	Receptores N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	NO sintetase
OH.	Radical hidroxilo
PBT2	8-Hidroxiquinolina
PEN2	Potenciador da presenilina 2
PPA	Proteína precursora β -amilóide
PS	Fosfatidilserina
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
Rember	Azul de metileno
RE	Retículo endoplasmático
ROO \cdot	Radicais peróxido
ROS	Espécies reactivas de oxigénio (<i>Reactive oxygen species</i>)
SNC	Sistema nervoso central
SP-233	Caprospinol
Vitamina C	Ácido ascórbico
Vitamina E	Tocoferol
ZnT	Proteínas transportadoras de zinco

I. Introdução

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva e irreversível que começa por atingir a memória e com a evolução acaba por afectar outras funções mentais, conduzindo o doente à completa dependência de terceiros (Fehlbaum-Beurdeley et al., 2010; Maslow, 2010; Weiner et al., 2010). Quando se pretende falar de um assunto como a DA é necessário em primeiro lugar compreender como se pode definir o termo demência. Este termo aparece descrito como o desenvolvimento de vários défices cognitivos, que incluem um desequilíbrio na memória e outros distúrbios cognitivos como afasia, apraxia e agnosia. A afasia é o termo utilizado para designar o distúrbio que envolve a percepção e expressão através da fala. A apraxia relaciona-se com o comprometimento motor e da fala. Por sua vez a agnosia está relacionada com a perda de conhecimento de certos objectos, pessoas, cheiros e mesmo sons (Kada, 2010; Knels e Danek, 2010; Maslow, 2010; Rinaldi et al., 2010). A demência é um grande problema que está presente no sector dos cuidados de saúde com implicações para os cuidadores e para todo o sistema de saúde. Trata-se de um desafio bastante exigente em que é preciso todo o cuidado apropriado para as pessoas que sofrem de demência, em que o seu comportamento é pautado por agressividade e resistência ao tratamento (Kada, 2010).

A DA caracteriza-se pela deposição de placas senis e emaranhados neurofibrilares combinado com perda neuronal que afecta a zona do hipocampo e zonas do neocórtex, resultando em demência e morte. A primeira descrição feita desta patologia surgiu por Alois Alzheimer em 1906 (Vetrivel e Thinakaran, 2010; Zawia et al., 2009). A maioria dos casos de DA ocorre em idosos. Estudos epidemiológicos têm revelado que as pessoas com demência são mais propensas a terem fracos resultados em testes de inteligência quando eram mais novos quando comparados com pessoas sem demência (Zawia et al., 2009). Estudos genómicos têm demonstrado que mais de 200 genes podem estar envolvidos na patogénese da DA (Zawia et al., 2009). A natureza esporádica da doença, as suas diferentes susceptibilidades e curso em homens e mulheres, bem como a idade de início tardio da doença, adicionam a hipótese de que a epigenética e componentes ambientais desempenhem um papel na sua etiologia (Zawia et al., 2009).

Em média, após diagnosticada a doença, um doente de Alzheimer resiste 8 anos. Esta é uma doença neurodegenerativa, progressiva e irreversível com causa e tratamento ainda não esclarecidos totalmente. Despoleta a morte de células cerebrais acompanhado de atrofia cerebral. Como exemplifica a Fig.1, a doença revela ser fatal e destrói as áreas responsáveis pela memória e fala (Alzheimer's Association Home Page, 2009; Kada, 2010; Liu et al., 2009; Rauk, 2009).

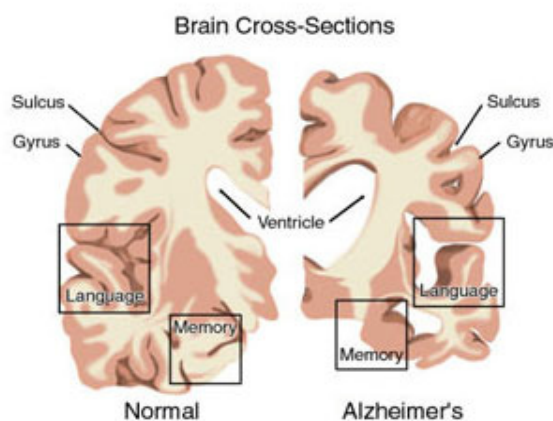


Fig. 1. Comparação de um cérebro normal (à esquerda) com um cérebro de um doente de Alzheimer (à direita) (Doença de Alzheimer e Tratamento Fisioterápico, 2010).

Esta doença afecta em diferentes níveis e de forma faseada a parte cognitiva e funcional. Inicialmente ocorre perda de memória acompanhada de sintomas como ansiedade e depressão. Numa fase mais avançada há registo dos sintomas anteriores ao que se juntam alucinações visuais, falsas crenças e perturbações no sono. Numa fase mais tardia ou final há registo de sinais que afectam a parte motora. Neste campo, a parte motora fica mais rígida e ocorre também um declínio acentuado do nível cognitivo. O declínio cognitivo e funcional são sintomas que acompanham os diferentes estágios da doença (Rauk, 2009; Silvestrelli et al., 2006).

1.1. Prevalência

Portugal tem um número considerável de pessoas com demência, cerca de 153000, entre as quais 90000 com DA. Portugal regista um aumento no envelhecimento

da população com diminuição da taxa de natalidade, sendo igual à tendência demográfica registada por toda a Europa (Alzheimer Portugal, 2010; Castro-Caldas e Mendonça, 2005). De destacar que na última década houve um aumento da população idosa, com mais de 65 anos de idade, de 13,6 % para 16,4 %. Estima-se que em 2050 surja um aumento do índice de envelhecimento, diminuição da relação do número de jovens com o número de idosos, de 243 idosos para cada 100 jovens. Em 2002 a relação era de 106 idosos para cada 100 jovens. Referências relativas ao índice de sustentabilidade potencial no Norte apontam para o valor de 4,9 %, o que significa que para cada idoso existem cerca de 5 indivíduos em idade activa (Castro-Caldas e Mendonça, 2005).

A incidência do risco de demência é agravado com a idade que é considerada o factor de risco para a DA. No caso de Portugal, em comparação com os outros países europeus, esta incidência do risco é mais grave devido ao registo de valores mais elevados de analfabetismo, baixa escolaridade e profissões indiferenciadas. Existe um total de 838140 portugueses analfabetos o que corresponde a uma taxa de analfabetismo nacional de 9,0 %, atingindo 25 % da população acima dos 55 anos (Castro-Caldas e Mendonça, 2005; Silvestrelli et al., 2006).

Com o auxílio de estudos demográficos é possível prever que para 2050 irá ocorrer no continente europeu um aumento da média da faixa etária populacional acompanhada de uma estabilização da taxa de natalidade. Estima-se que o número de cidadãos europeus afectados com demência seja de 7,3 milhões (Alzheimer Portugal, 2010; Castro-Caldas e Mendonça, 2005).

Foram realizados estudos epidemiológicos europeus, elaborados com diferentes métodos e meios, suportados pelo EURODEM – *Prevalence Research Group*, que revelaram haver um aumento da prevalência da DA associada a factores como a idade e o sexo feminino. Deste modo, registaram-se valores para a prevalência europeia da DA, para diferentes grupos segmentados de acordo com a faixa etária de 30-59, 60-69, 70-79, 80-89, respectivamente de 0,02, 0,3, 3,2, e 10,8. Factores relacionados com a idade condicionaram a um aumento exponencial da demência e também a um notável aumento em mulheres (Castro-Caldas e Mendonça, 2005).

Numa realidade diferente do continente europeu, nos Estados Unidos, esta demência assume também grande importância afectando 5,3 milhões de pessoas com cerca de 65 anos. Um novo doente é diagnosticado a cada 70 segundos que passam, sendo a sétima maior causa de morte. Caso não se encontre um tratamento eficaz para a DA, estima-se que em 2050 haja um aumento do número de doentes de Alzheimer de 11,3 milhões para 16 milhões, só nos Estados Unidos (Alzheimer's Association Home Page, 2009; Maslow, 2010).

No panorama mundial existem 24,3 milhões de pessoas que vivem com demência e são estimados 4,6 milhões de novos casos de demência diagnosticados anualmente, com um número que duplica a cada 20 anos, atingindo os 81,1 milhões no ano de 2040 (Alzheimer's Association Home Page, 2009; Maslow, 2010).

A idade revela ser o factor de risco para a DA em que a sua incidência tem um aumento considerável com o aumento da idade. A prevalência desta doença entre os 60 anos de idade é de cerca de 1 %. Esta incidência duplica aproximadamente a cada 5 anos, atingindo os 2 % aos 65 anos de idade, os 8% aos 75 anos de idade e os 16 – 32 % aos 85 anos de idade (Silvestrelli et al., 2006). Actualmente não existe ainda nenhum tratamento definitivo para a DA, contudo a correlação linear entre os vários estágios da DA e o volume da estrutura cerebral sugerem que com uma intervenção terapêutica seja possível impedir o progresso da patologia (Rauk, 2009; Silvestrelli et al., 2006).

Cada vez mais é importante augurar a prevalência da DA na população portuguesa, visto o aumento da sua notoriedade ao nível epidemiológico e o abalo social e económico que esta possa causar. Para isso é preciso visar cuidados de saúde apropriados para uma população envelhecida (Alzheimer's Association Home Page, 2009; Castro-Caldas e Mendonça, 2005).

1.2. Hipóteses para a origem da doença

A DA pode surgir como uma causa genética, devido a antecedentes familiares, ou de forma esporádica, havendo neste caso várias hipóteses para que isto aconteça como a alteração da transmissão colinérgica, da cascata amilóide, da isoforma 4 da

apolipoproteína E (ApoE4) e da proteína tau (Contestabile, 2010; Maccioni et al., 2010; McGuinness et al., 2010; Rauk, 2009; Van Beek e Claassen, 2010; Pimplikar, 2009).

Com a descoberta da importante relação da acetilcolina (Fig. 2) na memória ou aprendizagem, e sabendo, também, que no cérebro de um doente de Alzheimer ocorre uma perda da enervação colinérgica, a hipótese da transmissão colinérgica continua ainda nos dias de hoje a ter realce no entendimento da DA (Van Beek e Claassen, 2010).

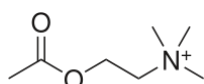


Fig. 2. Representação da estrutura da acetilcolina (Wikipedia, the free encyclopedia, 2010).

Tem sido estudado o papel do sistema colinérgico na enervação e controlo dos vasos sanguíneos cerebrais, desde o momento em que esses vasos foram observados rodeados por fibras nervosas originárias de gânglios nervosos periféricos e neurónios intrínsecos. A esses nervos perivasculares foi atribuída importância na regulação do tónus ao nível vascular cerebral. Na DA os vasos corticais revelam certa deservação, o terminal nervoso colinérgico perivascular é diminuto e também ocorre redução do fluxo sanguíneo cerebral, o que é considerado uma manifestação precoce da doença. A combinação destas três observações leva a uma hipótese vascular colinérgica, em que a perda da enervação colinérgica vascular é responsável ou contribui significativamente para o comprometimento do fluxo sanguíneo cerebral (Van Beek e Claassen, 2010). A sustentar esta ideia sabe-se que a actividade da enzima colina-acetiltransferase, responsável pela síntese da acetilcolina, é um marcador em neurónios colinérgicos e sinapses, e esta enzima encontra-se diminuída em amostras do córtex e hipocampo de pacientes de Alzheimer (Contestabile, 2010). Há um registo de baixa de acetilcolina na DA. A enzima responsável pela sua degradação é a acetilcolinesterase (AChE). Por isso, a forma de aumentar os níveis de acetilcolina prende-se com compostos que inibam a enzima que degrada a acetilcolina em outros metabolitos. Nesta linha de pensamento, os inibidores da AChE podem ter um efeito significativo na circulação cerebral, melhorando a função cerebrovascular (Van Beek e Claassen, 2010), como será aprofundado no capítulo do Tratamento da DA.

Mais tarde surge outra hipótese em que a DA é causada por uma mutação de genes, no gene da proteína precursora β -amilóide (PPA) localizada no cromossoma 21. Todas as mutações genéticas e factores de risco são associados com uma produção anormal do péptido β -amilóide (β A), o maior constituinte das placas senis que são diagnosticadas na DA, o que conduz à sua acumulação e ao despoletar de uma cascata amilóide (Rauk, 2009; Zatta et al., 2009; Pimplikar, 2009). Outro argumento a considerar é a ApoE4 que constitui também um factor de risco para o desenvolvimento da DA. Revela efeito particular na propensão da deposição do β A no cérebro. A ApoE4 altera a estrutura e função dos microtúbulos interferindo com a proteína tau. Esta isoforma existe em predominância nos indivíduos com DA (McGuinness et al., 2010; Rauk, 2009). A hipótese da proteína tau é também um argumento a ter em conta, sendo que esta proteína é responsável pela estabilização dos microtúbulos que conferem a estrutura e o transporte intracelular aos neurónios. Na DA a proteína tau fica hiperfosforilada havendo formação de neurofibrilas e contribuindo para a desintegração do sistema de transporte intracelular nos neurónios e a sua consequente degeneração. Esta hipótese defende que as modificações na proteína tau possam iniciar a cascata da DA (Duce e Bush, 2010; Maccioni et al., 2010; Rauk, 2009).

1.3. Alterações fisiológicas/bioquímicas/neurológicas

Do ponto de vista histopatológico verifica-se a deposição de placas senis extracelulares (agregados do péptido β A), bem como a deposição de fibrilas intracelulares de proteína tau polimerizada (Rauk, 2009).

Torna-se essencial compreender todo o processo em torno do péptido β A para melhor entendimento da progressão da doença, para ser possível utilizar uma intervenção química adequada que poderá pôr fim à evolução da doença (Rauk, 2009). Este péptido β A resulta da clivagem proteolítica da PPA e caracteriza-se por um domínio hidrofílico e um outro domínio hidrofóbico, em que as formas mais frequentes deste péptido são constituídas por 40 e 42 aminoácidos, que são também as formas mais tóxicas (Hureau e Faller, 2009; Rauk, 2009). Assim, este conjunto de toxinas formado proporciona o evento de demência e de neurodegeneração, revelando ser um factor crucial para a DA (Perez et al., 2010; Pitt et al., 2009). Consequentemente ocorrem

perdas de sinapses no córtex, resultando em atrofia nas regiões afectadas (Rauk, 2009; Zatta et al., 2009). A perda de neurónios é o maior acontecimento neuropatofisiológico na DA, caracterizada microscopicamente por formação de placas senis e emaranhados de neurofibrilas. O primeiro acontecimento referido são depósitos extracelulares de filamentos β A enquanto que os emaranhados de neurofibrilas formam-se intracelularmente com um rearranjo anormal de proteínas e microtúbulos, como a proteína tau (Rauk, 2009; Zatta et al., 2009).

Na patologia da DA ocorrem deposições de β A em placas senis e aparecimento de neurofibrilas produzidas pela proteína tau. A homeostasia pode ser alterada por iões metálicos que são essenciais para a vida, contudo são também reconhecidos como um co-factor nas desordens neurodegenerativas. Factores como a idade, a exposição ambiental, as dietas inadequadas podem induzir uma alteração da homeostasia, culminando em neurotoxicidade (Zatta et al., 2009).

1.4. Diagnóstico

O início da demência devido a doença degenerativa é normalmente um processo pouco padronizado e pode mesmo não conseguir ser identificado durante anos, propondo-se um acompanhamento e seguimento atento. Num contexto clínico o diagnóstico desta demência é efectuado por norma na presença do doente e do cuidador, provavelmente já com repercussões funcionais (Castro-Caldas e Mendonça, 2005). O diagnóstico precoce não é fácil de ser executado, devido a factores relacionados com a idade de início, escolarização, nível sócio-cultural, alterações comportamentais e repercussões funcionais (Castro-Caldas e Mendonça, 2005).

O auxílio do computador para o diagnóstico da DA tem-se revelado uma ferramenta muito útil na obtenção e classificação de imagens tomográficas do cérebro para assim diferenciar imagens de um cérebro normal e um cérebro de um doente de Alzheimer, como a Fig. 3 evidencia (Gonzalez et al., 2009).

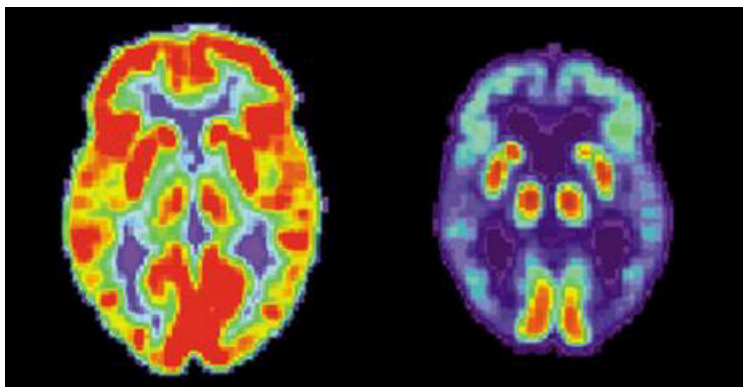


Fig. 3. Tomografia computadorizada de um cérebro; a imagem da esquerda representa um cérebro saudável e a da direita de um doente de Alzheimer (The Dementia Dozin: Foods to Avoid « Fire Earth, 2010).

Com uma avaliação ao nível cognitivo e comportamental através de testes neuropsicológicos é possível obter um diagnóstico da DA. Através de exames neurológicos, análises laboratoriais e imagens cerebrais é possível concluir uma avaliação, excluindo outras causas de demência (Fehlbaum-Beurdeley et al., 2010).

O diagnóstico de demência é uma tarefa exaustiva, particularmente nos mais idosos, em que pode ser complicado distinguir entre manifestações iniciais de demência e alterações relativas ao envelhecimento considerado como normal. Quando em associação com baixa escolarização e fraca interacção social, pode ainda ser mais complicada essa detecção nas fases iniciais da demência. Deste modo, na ausência de marcadores biológicos específicos, a detecção de demência coloca sérias dificuldades pela necessidade de obtenção de amostra representativa da população em estudo e pela utilização de métodos de rastreio demorados e de difícil aplicação (Castro-Caldas e Mendonça, 2005). Para além de uma forte procura por novos tratamentos que possam impedir ou mesmo retardar a progressão da DA, a relação médico-doente aguarda uma caracterização precisa e quantificável de biomarcadores não-invasivos. O fluido cerebrospinal (FCE) pode ser considerado uma fonte lógica para biomarcadores em desordens do sistema nervoso central. Contudo, o sangue é uma alternativa menos invasiva para identificação de biomarcadores. Com a circulação de moléculas sinalizadoras é possível detectar níveis alterados devido à actividade biológica desregulada na DA. Neste âmbito há a considerar o stress oxidativo, disfunção

sináptica, neurodegeneração e consequente produção do péptido β A (Fehlbaum-Beurdeley et al., 2010).

Esta questão do diagnóstico de declínio cognitivo pode ainda ser dificultada, para além da escolarização e factores culturais, no caso de indivíduos com função mnésica no limite considerado normal, ou quando são detentores de elevada capacidade intelectual, e que mesmo em declínio, registam ainda valores aceitáveis nos testes. Todos os factores referenciados causam dificuldade no rastreio de disfunção cognitiva, levando a que os estudos realizados sejam fracamente comparáveis e replicáveis para diversas populações (Castro-Caldas e Mendonça, 2005).

Para realizar o rastreio em estudos populacionais é necessário a realização de avaliações de vários indivíduos com um conjunto de testes que avaliam a parte cognitiva de acordo com o âmbito e metodologia do estudo, e que podem ser acompanhados ou seguidos por uma entrevista clínica neurológica e psiquiátrica (Castro-Caldas e Mendonça, 2005). Neste âmbito um teste muito utilizado neste rastreio populacional de demência é o Exame ao mínimo estado mental (MMSE, *Mini Mental State Examination*), com base na sua fácil aplicação e pelo facto de revelar elevada sensibilidade (Castro-Caldas e Mendonça, 2005). Contudo, visto o MMSE ser o teste comumente utilizado, tem sido também alvo de críticas no caso particular dos idosos porque apresenta quantidade considerável de falsos positivos (Castro-Caldas e Mendonça, 2005). Um estudo feito na população portuguesa, num teste a 137 indivíduos saudáveis e 151 doentes, o teste de MMSE registou uma sensibilidade máxima de 77,4 % e uma especificidade máxima de 96,8 % na detecção de demência, em que o factor da escolarização registou as maiores variações quando comparado com outros factores, como a idade e o sexo (Castro-Caldas e Mendonça, 2005).

Distante da realidade dos doentes com características demenciais bem definidas, existem indivíduos com estabilidade nas suas actividades do quotidiano e na sua cognição no geral, apenas com um comprometimento aparente da memória. Tais características são incluídas num quadro designado como Defeito Cognitivo Ligeiro (MCI, *Mild Cognitive Impairment*). Quando em estudos populacionais se faz uma avaliação neuropsicológica é importante realizar testes de memória, linguagem, atenção

e funções motoras para aumentar a sensibilidade de rastreio de MCI (Castro-Caldas e Mendonça, 2005). Cerca de 10 a 15 % dos doentes com características amnésicas evoluem para a demência em cada ano, sendo extremamente importante fazer uma avaliação clínica e neuropsicológica regular (Castro-Caldas e Mendonça, 2005). Para despiste de demência e MCI realizam-se normalmente duas fases distintas. Na primeira é feito um rastreio de casos positivos que revela ser pouco complexa. A segunda fase é mais pormenorizada em que é preciso efectuar regularmente entrevistas clínicas assim como avaliar as funções cognitivas com testes neuropsicológicos (Castro-Caldas e Mendonça, 2005).

Os resultados de diagnóstico podem ser diversos porque dependem da metodologia e critérios usados e por isso se recomenda que a metodologia seja homogénea na análise populacional de demência (Castro-Caldas e Mendonça, 2005).

1.5. Objectivo do trabalho

O intuito deste trabalho versa compreender que a DA é muito abrangente. Em causa está uma doença que afecta principalmente a mnésica e várias outras capacidades cognitivas e que preocupa à escala mundial (Maslow, 2010).

Estudos recentes (Hureau e Faller, 2009; Kozlowski et al., 2009) têm revelado uma forte influência da homeostase de determinados metais, particularmente os que possuem actividade redox como o cobre e o ferro, na evolução neurodegenerativa da doença. A nível cerebral os referidos metais contribuem para um aumento do stress oxidativo uma vez que podem conduzir à produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radicais hidroxilo, bem como de espécies reactivas de azoto como o óxido nítrico (NO) (Chauhan e Chauhan, 2006). O presente trabalho tem como objectivo a realização de uma revisão cuidada e crítica da literatura científica publicada sobre a DA e a influência de diversos metais na evolução neurodegenerativa da doença.

II. Péptido β A e PPA

A DA surge como uma demência com uma manifestação tardia, ou seja, já numa idade adulta avançada, devido à acção do péptido β A que conduz a uma perda neuronal e sináptica (Arya et al., 2009; Pitt et al., 2009; Ray et al., 2010; Salay et al., 2009; Vigo et al., 2009; Zetterberg et al., 2010). O β A é um produto metabólico da PPA (Vigo et al., 2009). É o factor preponderante na DA uma vez que, com a deposição deste péptido, há a formação de placas senis (depósitos extracelulares de péptidos β A com 32-42 aminoácidos) responsáveis pela neurodegeneração e demência (Perez et al., 2010; Pitt et al., 2009). Produzem-se alterações consistentes no funcionamento das células e a interacção dos oligómeros β A com os neurónios é crítico no início da patologia de Alzheimer (Pitt et al., 2009). As placas amilóides formadas por agregados do péptido β A são a marca ou o registo no cérebro de um paciente com a DA. Elevados níveis de acumulação do β A num cérebro proporcionam efeitos nefastos com formação de fibrilas em placas amilóides, resultando na disfunção neuronal com neurodegeneração progressiva e demência (Hureau e Faller, 2009, Perez et al., 2010).

As formas mais predominantes do β A, β A40 e β A42, são constituídas por 40 e 42 aminoácidos, respectivamente. O aumento da proporção de β A40 e β A42 está associado com o desenvolvimento da DA. O β A42 revela maior propensão para formar agregados amilóides e maior toxicidade para os neurónios. É a forma do β A menos solúvel que entra na formação base das placas senis características da DA. Por isso, a identificação do processo de agregação e de oligómeros responsáveis pela disfunção sináptica e perda neuronal na DA são importantes questões a ter em conta (Hureau e Faller, 2009; Rauk, 2009).

Os neurónios não são as únicas células no cérebro afectadas na DA. Existem regiões cerebrais vulneráveis que também exibem actividade ao nível das células da microglia e astrócitos que sugerem estar associados com a deposição do β A. Com microscopia electrónica foi possível detectar num cérebro com a patologia a presença de β A em astrócitos. Neste caso, o β A vai induzir a entrada de moléculas potencialmente citotóxicas nos astrócitos. Estes ficam susceptíveis a acumular β A e quando possuem elevada carga de β A podem mesmo sofrer lise, originando a formação de placas

amilóides. Existem estudos recentes que sugerem que os astrócitos podem funcionar como uma fonte de β A porque são responsáveis por causar um aumento na expressão da enzima responsável pela clivagem da PPA no local β (BACE1, *β -site amyloid cleaving enzyme*) em resposta ao stress crónico (Perez et al., 2010).

Algumas formas hereditárias da DA são transmitidas através de uma herança autossómica dominante (Fig. 4) do gene da PPA que reside no cromossoma 21 e que induz posterior secreção de β A (Rauk, 2009). Indivíduos com Síndrome de Down têm uma cópia extra do gene da PPA, logo têm grande probabilidade de desenvolver DA (Vetrivel e Thinakaran, 2010). Existem 3 genes envolvidos na DA: gene do PPA no cromossoma 21, presenilina 1 (PS1) no cromossoma 14 e presenilina 2 (PS2) no cromossoma 1, que podem iniciar um processamento anormal da PPA com um início da doença repentino. Esta desregulação na PPA provoca um aumento da proporção do β A42 e β A40, o que por sua vez proporciona maior número de agregados β A. Torna-se relevante perceber a distribuição do péptido β A para poder obter considerações mais válidas contra a formação deste péptido (Viitanen et al., 2009).

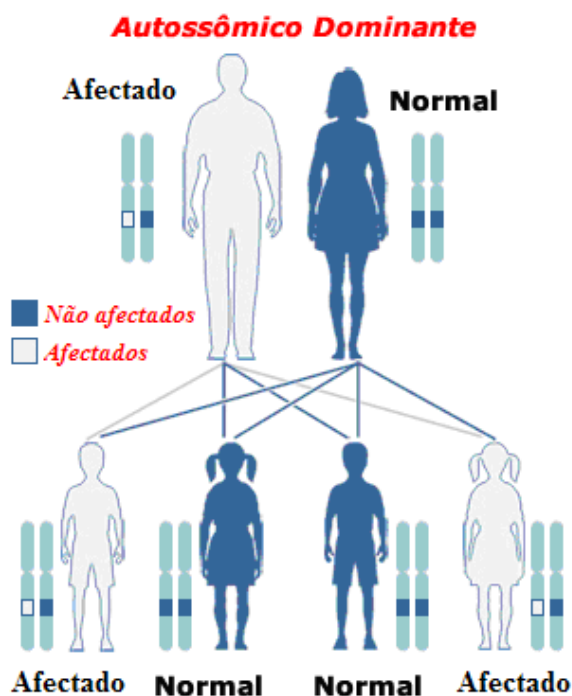


Fig. 4. Imagem que exemplifica uma herança autossómica dominante (Novas...Um pouco do saber para todos: DOENÇA DOS PÉZINHOS, 2010).

Segundo Viitanen et al. (2009), foram seguidos 3 grupos de pessoas em diferentes faixas etárias: um grupo de indivíduos mais novos com 41 a 49 anos, outro grupo de indivíduos com 58 a 74 anos e um grupo de faixa etária mais avançada dos 83 aos 94 anos. No grupo de maior faixa etária e no grupo de idade intermédia foram verificados elevados níveis de deposição de β A40 e β A42 na zona do córtex frontal, com maior registo para a deposição de β A40 no grupo de idade mais avançada, enquanto o controlo de β A no grupo mais jovem detectou uma distribuição homogénea nas regiões corticais. Surge desta forma uma relação inequívoca do aumento do péptido β A com o aumento da idade (Viitanen et al., 2009). Curiosamente, a PPA com mutações associadas a inícios precoces familiares na DA é mais facilmente clivada pelo BACE1, o que despoleta mais facilmente esta patologia (Vetrivel e Thinakaran, 2010).

2.1. Processamento da PPA

A PPA é sintetizada no retículo endoplasmático (RE) para depois ser secretada. Apenas uma pequena fracção da PPA alcança a membrana plasmática. Verificou-se que a maioria da PPA se localiza no Complexo de Golgi. A PPA tem um curto tempo de residência na superfície das células até ser clivada pela α -secretase ou ser captada pela célula na forma de endossoma. A endocitose da PPA revelou ser crítica para a produção de β A tanto em culturas celulares como *in vivo* (Vetrivel e Thinakaran, 2010).

O β A é o produto resultante de todo um processo amiloidogénico que envolve enzimas proteolíticas que actuam na PPA (Findeis, 2007; Viitanen et al., 2009). A associação de PPA com fibrilas de β A vai induzir um excesso de acumulação de PPA, que leva à multimerização deste, sendo um factor preponderante na evolução da degeneração neuronal. Contudo, a PPA pode não ser a única proteína da membrana celular que funciona como receptor de espécies tóxicas de β A. Pode-se assumir que a associação β A com PPA leva a um mecanismo impulsor que provoca a degeneração neuronal (Vigo et al., 2009).

Sendo uma proteína transmembranar, a PPA é clivada pela β -secretase no local onde esta proteína passa do domínio do lúmen para o meio transmembranar, originando o terminal-N do β A (Fig.5). Por sua vez, a γ -secretase também cliva o β A, dando

origem ao terminal-C (Vetrivel e Thinakaran, 2010). O domínio do terminal-N é hidrofílico, enquanto o domínio do terminal-C é hidrofóbico (Hureau e Faller, 2009; Rauk, 2009).

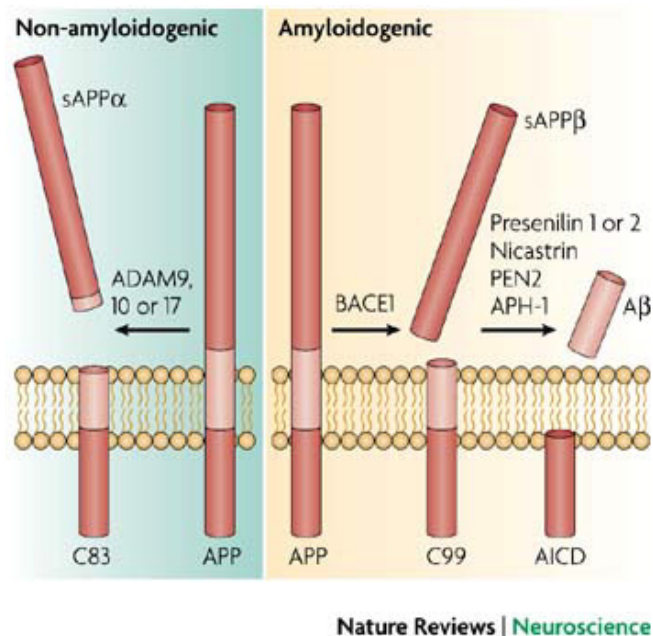


Fig. 5. Imagem ilustra a formação do β A (Figure 1: Intracellular amloid-[beta] in Alzheimer's disease: Nature Reviews Neuroscience, 2010).

Na parte amiloidogénica, a β -secretase cliva a PPA no lúmen formando o terminal-N do β A, um fragmento solúvel PPA β e um fragmento do terminal-C (FTC- β). O fragmento do terminal-N da PPA β , depois de clivado, pode actuar como um ligando num receptor de morte o que pode induzir a uma situação de apoptose nos neurónios. A segunda clivagem ocorre com a γ -secretase que corta o FTC- β no interior do domínio transmembranar para libertar o β A para o meio extracelular e o domínio do terminal-C intracelular da proteína precursora amiloide (AICD, *Amyloid precursor protein intracellular domain*) para o citoplasma. Dentro da região transmembranar da PPA, esta γ -secretase vai actuar em vários locais e, devido a esta preferência heterogénea, produz uma mistura de componentes do β A de comprimento variável, como o β A40, β A42 e o terminal-C do β A (Rauk, 2009; Vetrivel e Thinakaran, 2010). Os β A formados que assumem maior comprimento têm mais facilidade para uma rápida agregação, oligomerização e formação de fibrilas, o que constitui um conjunto crítico para a DA (Vetrivel e Thinakaran, 2010).

No processamento não amiloidogénico da PPA há o envolvimento de outra enzima, a α -secretase, no domínio extracelular (Vetrivel e Thinakaran, 2010). No fragmento do terminal-N a PPA α é libertada, enquanto o fragmento do terminal-C (FTC- α) em C83 continua ancorado à membrana. Este resíduo do C83 pode entretanto ser clivado pela γ -secretase no interior transmembranar. O AICD é libertado para o interior das células. As suas funções estão relacionadas com a sua ligação ao gene promotor da neprilisina (NEP), uma metaloenzima que é capaz de degradar o β A. Sendo assim, ocorre aumento da expressão da NEP (Rauk, 2009). A actividade da α -secretase está associada a pelo menos três elementos do grupo das desintegrinas e metaloproteinases (Vetrivel e Thinakaran, 2010).

A α -secretase compete com a β -secretase, uma vez que também cliva a PPA no mesmo local, dando origem a um segmento do péptido β A clivado no terminal-N (péptido p3). Logo, o processamento amiloidogénico ou não-amiloidogénico da PPA depende dos níveis de α - e β -secretases. Devido aos elevados níveis de BACE1 nas células neuronais, há grande probabilidade de ocorrer o processamento amiloidogénico, o que não acontece nas outras células (Vetrivel e Thinakaran, 2010).

A γ -secretase é um complexo multiproteico constituído por presenilinas (PS1 e PS2), potenciador da presenilina 2 (PEN2), nicastrina e faringe anterior defectiva 1 (APH-1, *Anterior pharynx-defective 1*). Mutações no complexo de PS1 ou de PS2 provocam aumento na produção de β A42 ou na sua agregação em oligómeros. Aparentemente níveis aumentados de β A42 aumentam a expressão e actividade da β -secretase. A clivagem de PS1, responsável pela produção de β A40 e β A42, tem sido modelada por computador na tentativa de formar um péptido mais pequeno e menos tóxico (Rauk, 2009).

2.2. Toxicidade do β A

O processo proteolítico que ocorre na PPA, com a consequente formação do β A, não é homogéneo, visto que esta produção origina diferentes comprimentos de β A, em particular nas terminações carboxílicas do péptido (Findeis, 2007; Ray et al., 2010). Consoante a organização estrutural ou comprimento assumido pelo β A, este pode existir

em diferentes formas: monómero, dímero, oligómero, fibrilas e agregados de fibrilas (Hampel et al., 2009). Quando na forma de monómero, o β A é produzido predominantemente em membranas plasmáticas e lançado para o espaço extracelular onde se deposita, formando placas senis. Da mesma forma é também produzido nas membranas dos neurónios e lançado para o citosol (Rauk, 2009). As fibrilas são depositadas em placas senis extracelulares e assumem-se como outra característica da DA (Rauk, 2009). Segundo Rauk (2009), para esta patologia da DA assim como para outras doenças neurodegenerativas, este género de deposição pode ser encarado como um mecanismo de protecção que inactiva a toxicidade extrema das espécies oligoméricas. O mecanismo activo existente para remover oligómeros do β A ocorre pela promoção da sua desagregação enzimática em monómeros (Rauk, 2009). A forma de oligómero é a espécie mais neurotóxica quando comparada com monómeros ou fibrilas (Rauk, 2009).

Nem todas as formas de β A levam à DA. Pensa-se que apenas algumas formas o possam fazer e que estas não estejam expressas na maioria da população. Caso contrário, como todos os seres humanos produzem β A, todos desenvolveriam DA, o que não acontece. Os oligómeros β A solúveis sugerem ser os mais sinaptotóxicos, estando estes presentes no FCE (Zetterberg et al., 2010). Vários estudos revelam que são as formas solúveis de β A que determinam o declínio cognitivo, levando à demência, em detrimento das placas senis. Pressupõem-se que os oligómeros de β A não provocam a degeneração celular, mas interferem nas propriedades sinápticas (Hermann et al., 2009). Há portanto a possibilidade de se desenvolver vários estudos de diagnóstico com os biomarcadores da DA, nomeadamente recolhendo amostras do FCE. Por exemplo sabe-se que a relação dos níveis de β A42 ou de β A42/40 e os níveis da proteína tau no FCE reflecte a degeneração axonal na DA (Zetterberg et al., 2010).

2.3. Processamento da PPA e colesterol

Os elevados níveis de colesterol já demonstraram indubitavelmente serem um factor de risco para doenças coronárias e outras formas de doenças cardíacas, mas também constituem um grande risco para a evolução da DA (Findeis, 2007). De todos os órgãos, o cérebro é aquele que apresenta maior quantidade de colesterol. Este é o

principal constituinte das pontes lipídicas, que têm um papel fundamental no sistema nervoso central. Estas pontes são domínios da membrana ricos em colesterol e outros lípidos, que concentram determinadas proteínas, servindo de plataforma para vários processos celulares, como sinalização celular, adesão celular, motilidade, entrada de agentes patogénicos, entre outros. A inibição do transporte de colesterol dos organelos endocíticos para o RE parece reduzir os níveis de β A nas células neuronais. O processamento da PPA em β A pode ser induzido nas pontes lipídicas, uma vez que a γ -secretase cliva a PPA preferencialmente nas pontes lipídicas (Vetrivel e Thinakaran, 2010).

A importância do colesterol na patogénese da DA tornou-se evidente. Com esta importante e evidente relação do colesterol com a DA foram feitas experiências e foi possível retirar algumas conclusões. Os níveis de colesterol total e de lipoproteína de baixa densidade (LDL, *Low-density lipoprotein*) no soro correlacionam-se com a carga de β A em cérebros de doentes com a DA (Vetrivel e Thinakaran, 2010). Indivíduos com níveis elevados de colesterol durante a meia-idade tendem a desenvolver a patologia. Evidências epidemiológicas demonstram que as estatinas (inibidores da enzima que limita a síntese do colesterol) ao reduzirem os níveis de colesterol reduzem também o risco para desenvolver a DA (Findeis, 2007; Vetrivel e Thinakaran, 2010). Pacientes que foram tratados com estatinas para diminuir o colesterol apresentam uma redução significativa na incidência da DA (Vetrivel e Thinakaran, 2010).

Em apoio a estes resultados, foi encontrada uma elevada absorção de colesterol em coelhos, aumentando a formação de placas amilóides (Vetrivel e Thinakaran, 2010). Estudos sobre a depleção e carregamento de colesterol, em culturas celulares e em ratos com a DA, revelaram uma correlação entre os níveis de colesterol e a produção e deposição do β A. Com recurso a cobaias, um tratamento com um medicamento para reduzir os níveis de colesterol revelou reduzir também a deposição do β A, demonstrando uma correlação positiva entre os níveis de colesterol plasmáticos e os níveis de β A no cérebro (Vetrivel e Thinakaran, 2010). Experiências com animais e culturas celulares indiciam que alterações na distribuição dos níveis do colesterol modulam o processamento da PPA. Verificou-se que a formação de β A é significativamente reduzida em células neuronais quando o transporte de colesterol para

o RE é bloqueado. O aumento do efluxo de colesterol provoca uma diminuição na produção de β A, reduzindo assim a BACE1 e γ -secretase responsáveis por clivar a PPA (Vetrivel e Thinakaran, 2010).

Contudo, foram contestados recentemente os benefícios das estatinas no que diz respeito à incidência da DA ou declínio cognitivo em doentes com DA (Vetrivel e Thinakaran, 2010). Segundo Vetrivel (2010), a lovastatina utilizada normalmente para reduzir os níveis de colesterol tem também efeitos na circulação da PPA e no seu processamento (Vetrivel e Thinakaran, 2010).

2.4. Péptido β A e apolipoproteína E

Existem várias isoformas da ApoE (Fig. 6), mas é a sua isoforma 4 que apresenta maior facilidade para promover a formação de agregados do péptido β A (Rauk, 2009).

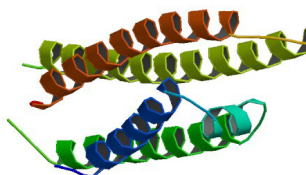


Fig. 6. Estrutura da ApoE (Wikimedia Commons, 2010).

A presença da ApoE4 provoca resultados com pior desempenho em testes cognitivos que avaliam o estado da memória e de funções motoras (McGuinness et al., 2010). A ApoE4 causa especial transtorno cognitivo ao nível da velocidade de processamento da informação em situações de toma de decisões e memória. É associada também a um aumento no desequilíbrio da atenção na DA (McGuinness et al., 2010). Deste modo, esta apolipoproteína é considerada como um factor de risco para o desenvolvimento da DA (McGuinness et al., 2010; Rauk, 2009).

Ainda se encontra por esclarecer o mecanismo pelo qual as suas isoformas actuam com o péptido β A. Sabe-se, contudo, que ocorre a ligação desta apolipoproteína ao péptido β A40 o que provoca a sua internalização nos neurónios. É conhecida a capacidade de promoção da agregação do β A na forma tóxica pelo ApoE, promovendo também uma maior produção do péptido β A, activando todo o processo em volta das proteases que actuam no PPA (Rauk, 2009). Em muitos casos associa-se o efeito da ApoE4 a casos de memória e atenção com destaque para a fase inicial da doença. Contudo, esta relação nem sempre é concordante visto que existem outros estudos que concluem não haver relação entre a ApoE4 e algum tipo de problema com declínio cognitivo (McGuinness et al., 2010).

2.5. Péptido β A e proteína tau

Os axónios são constituídos em grande parte pela proteína tau e microtúbulos de baixo peso molecular. Esta proteína tau tem um papel de grande relevo na estabilização dos microtúbulos e na própria indução da sua formação (Fig. 7) (Maccioni et al., 2010). A proteína tau constitui o elemento que suporta a estrutura dos axónios, por onde ocorre a passagem de nutrientes para a sinapse (Duce e Bush, 2010; Rauk, 2009).

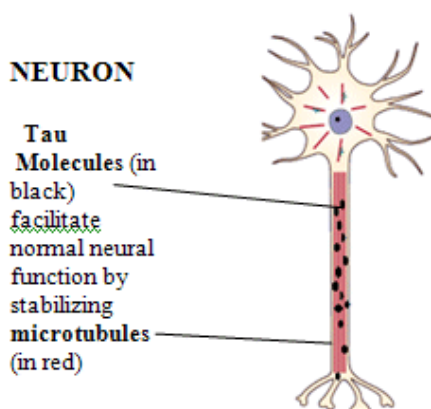


Fig. 7. Estabilização dos microtúbulos pela proteína tau (Genetics | Association for Frontotemporal Dementias, 2010).

A hiperfosforilação dos oligómeros da proteína tau (Fig. 8) acarreta efeitos patológicos que propiciam neurotoxicidade nos neurónios com consequente alteração ao

nível das suas interações (Maccioni et al., 2010). Esta presença de emaranhados neurofibrilares intracelulares com a hiperfosforilação da proteína tau é uma característica da DA. Os oligómeros formados do péptido β A provocam instabilidade na proteína tau, havendo uma rápida dissociação dos microtúbulos e o rompimento da estrutura axonal, permitindo uma desordem no processamento das sinapses e posteriormente a morte de neurónios (Maccioni et al., 2010; Rauk, 2009).

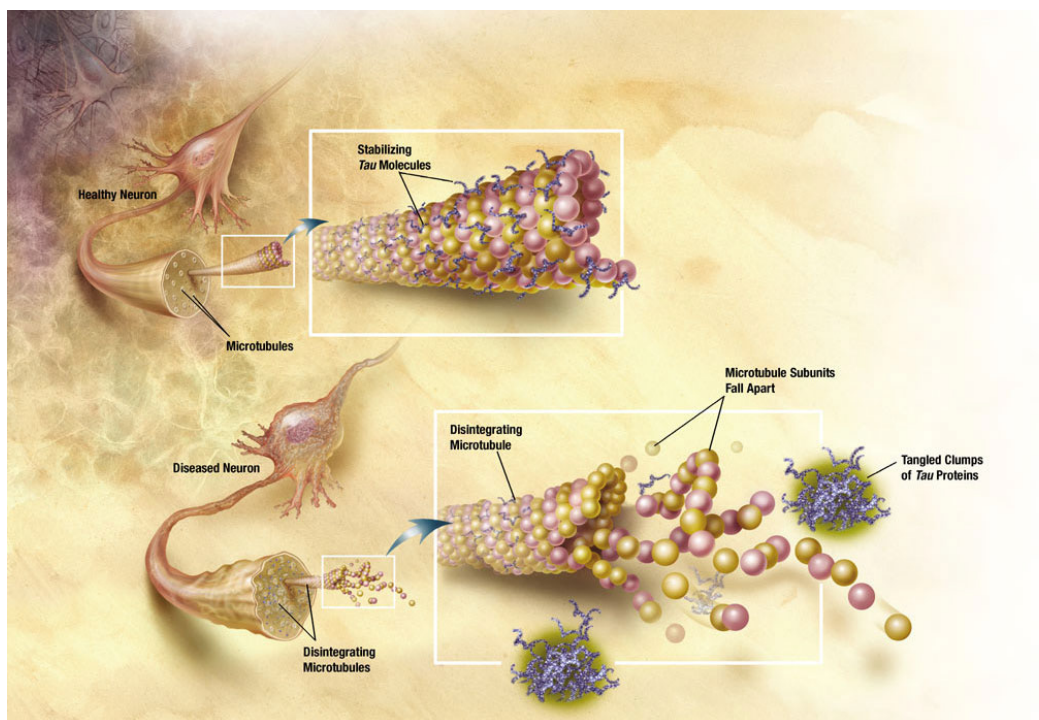


Fig. 8. Hiperfosforilação da proteína tau (Genetics: 200 family members having dementia-mutation studied for 13 years | Neurological Corre, 2010).

Quando ocorrem modificações na proteína tau acaba por ocorrer a sua oligomerização e a formação de emaranhados neurofibrilares (Maccioni et al., 2010). Estas formas oligoméricas e os filamentos tau são libertados para o meio extracelular como resultado da morte neuronal. Assim, contribui para a activação das células da microglia e desencadeia desta forma um ciclo nocivo e altamente prejudicial que provoca a degeneração neuronal de forma gradual (Maccioni et al., 2010). A DA é uma desordem multifactorial em que alterações nas proteínas, stress oxidativo, neuroinflamação, desequilíbrio neuronal e agentes neurotóxicos são alguns factores que

desencadeiam a degeneração dos neurónios no cérebro. O equilíbrio entre estes factores pode apresentar diferentes valores entre as pessoas com a DA (Maccioni et al., 2010).

Existem vários sinais que conduzem aos danos neuronais, entre eles destacando-se os oligómeros β A, radicais livres de oxigénio, os níveis de colesterol, os valores de LDL, a activação das células da microglia. Estes factores induzem um sinal nocivo aos receptores neuronais, que levam à hiperfosforilação da proteína tau porque proporcionam a libertação de citocinas que modificam o comportamento neuronal através da transmissão de sinais nocivos (Maccioni et al., 2010). A agregação de proteínas tau e a neurotoxicidade associada à hiperfosforilação são determinantes para todo o ciclo neurodegenerativo (Maccioni et al., 2010).

Quando associada a ApoE4 com o péptido β A42 formado, é desencadeada a activação de cinases responsáveis pela desregulação e hiperfosforilação da proteína tau e consequente dissociação microtubular (Maccioni et al., 2010; Rauk, 2009). Existem já várias correlações clínicas indicando que os oligómeros tau são altamente tóxicos. Anomalias na hiperfosforilação da proteína tau causam alterações moleculares que afectam os neurónios do cérebro (Maccioni et al., 2010), o que provoca um desequilíbrio cognitivo (Maccioni et al., 2010; Maslow, 2010).

III. Stress oxidativo / Radicais livres e a DA

Os danos oxidativos em componentes celulares resultam numa modificação das propriedades da membrana, como fluidez, transportadores de iões, actividade enzimática e ligação entre proteínas. Em resultado de danos oxidativos excessivos poderá resultar como consequência a morte celular (Chauhan e Chauhan, 2006). No cérebro de um doente de Alzheimer, para além da acumulação de placas amilóides e de emaranhados neurofibrilares, ocorre uma alteração nas reacções redox, havendo registo de um aumento de danos oxidativos em muitas das células (Zawia et al., 2009).

Têm surgido bastantes dados a partir de modelos experimentais de cérebros humanos que sugerem que o stress oxidativo desempenha um papel bastante importante na degeneração neuronal na DA (Chauhan e Chauhan, 2006). Este é provavelmente o factor desencadeante da doença, uma vez que é uma das primeiras características observadas no cérebro com DA, podendo mesmo aparecer décadas antes de se desenvolver a DA. Suspeita-se que a secreção e a deposição do β A, bem como a agregação das placas senis ocorrem num segundo plano, funcionando como um esforço das células na tentativa de se proteger contra os danos provocados pelo stress oxidativo (Liu et al., 2009).

O stress oxidativo é, normalmente, a subjugação de um sistema de defesa antioxidante pelo sistema oxidativo. Resulta da produção de radicais livres, como ROS, que são geradas por moléculas que têm electrões não emparelhados. Devido a estes electrões não emparelhados, os radicais livres são muito instáveis e muito reactivos. Deste modo, para os electrões estarem aos pares, os radicais livres estão em constante procura de novos electrões, e portanto retiram electrões de outras moléculas, para tentarem o equilíbrio. Por consequência, a molécula dadora de electrões, molécula a que foi retirado o electrão, torna-se instável e é convertida também em radical livre (Chauhan e Chauhan, 2006). Estes radicais livres são tóxicos e no caso de não serem removidos ou neutralizados reagem com lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, danificando as funções celulares (Chauhan e Chauhan, 2006).

A produção de ROS ocorre em qualquer célula aeróbia, como resultado da respiração (devido às reacções de oxidação-redução que ocorrem para originar ATP). As células com grande actividade metabólica como os neurónios produzem grande quantidade de radicais livres, na ordem dos 10¹¹ ROS/célula/dia (Liu et al., 2009).

O stress oxidativo pode induzir a fosforilação da proteína tau e a formação de lesões neurofibrilares. Como já foi referido, uma das características da DA é a existência de emaranhados neurofibrilares (compostos por proteína tau hiperfosforilada) (Silvestrelli et al., 2006).

Há três factores que influenciam o stress oxidativo mediado pelo β A: o aumento da produção de ROS, a diminuição da actividade enzimática do sistema de defesa antioxidante e a actividade mitocondrial disfuncional. Pode também ocorrer a atracção de mediadores inflamatórios pelos depósitos amilóides que tendem a acelerar a formação de um microambiente oxidativo (Chauhan e Chauhan, 2006).

Existe um aumento de registos que evidenciam que os β A ~~so~~íveis induzem o stress oxidativo. Vários estudos sugerem que os radicais livres estão envolvidos na fibrilação dos β A e na formação de emaranhados neurofibrilares em doentes de Alzheimer (Chauhan e Chauhan, 2006; Lee et al., 2004). A coincidência temporal do aumento de radicais livres e de enzimas antioxidantes, com o início de deposição de placas amilóides é ainda uma prova de que o envelhecimento induz alterações no cérebro de carácter oxidativo, que são um factor importante no reforço de uma produção e deposição de β A no doente de Alzheimer (Chauhan e Chauhan, 2006). Sendo a DA uma doença crónica, é provável que os neurónios vão sendo sujeitos a níveis quase letais de stress oxidativo por períodos prolongados (Silvestrelli et al., 2006).

Sendo a idade o factor de risco primário para a DA, propõe-se a existência de uma “cascata oxidativa de neurodegeneração induzida pela idade”. Esta é resumida em vários processos. As ROS produzidas na respiração provocam danos nas macromoléculas vitais, tais como DNA, DNA mitocondrial, fosfolípidos, entre outras. Estes danos vão-se acumulando ao longo dos anos. Os danos oxidativos provocados pelos radicais livres vão provocar a produção de mais radicais livres oxidativos,

atingindo-se um patamar (patamar do estado oxidativo estabilizado) em que a célula deixa de conseguir controlar a propagação deste ciclo. A célula inicia um estado compensatório de modo a obter novamente controlo do seu ambiente interno, evitando a sua morte, mas que, por sua vez, pode vir a provocar mais agressões à célula. Este estado induz a secreção de β A (para sequestrar ROS) o que pode levar à destruição da integridade celular. O β A também pode sofrer danos oxidativos que provocam a oligomerização e agregação, levando a neuroinflamação e a danos nas mitocôndrias que induzem mais produção de ROS. Estas células entram em degeneração ou ficam muito debilitadas, levando ao declínio cognitivo e ao estado de demência típico de doentes com DA (Liu et al., 2009).

Temos outros exemplos da actuação dos radicais livres, como os superóxidos: o oxigénio pode reagir com electrões que são libertados na respiração, formando radicais livres que têm por base o oxigénio (O_2^- , O_2 , OH^-), que são convertidos em H_2O_2 . Por sua vez, o H_2O_2 pode reagir com iões ferrosos (Fe^{2+}) produzindo radicais hidroxilos muito reactivos (OH^*) (Chauhan e Chauhan, 2006).

3.1. Óxido Nítrico

Os superóxidos também podem reagir com o NO originando radicais livres com base NO_2^* (Fig. 9) (Chauhan e Chauhan, 2006).

O NO é um biorregulador de vários sistemas, incluindo o sistema nervoso. É sintetizado devido à conversão de L-arginina em L-citrulina, pela acção da NO sintetase (NOS). O NO é um importante mensageiro no cérebro, tendo um papel preponderante no processo de aprendizagem, na memória, além de regular a expressão de factores tróficos (que tendem a diminuir com a idade). Segundo alguns autores, os neurónios com expressão de NOS são muito susceptíveis à neurodegeneração, assim como relacionam a NOS com a hiperfosforilação da proteína tau. Logo, a NOS pode contribuir para a DA. Por outro lado, o β A está também directamente relacionado com a produção de NO, tendo mesmo já sido sugerido que a diminuição de NO induzido pelo β A nas células da microglia é um dos mecanismos susceptíveis de provocar a morte neuronal na DA (Chauhan e Chauhan, 2006).

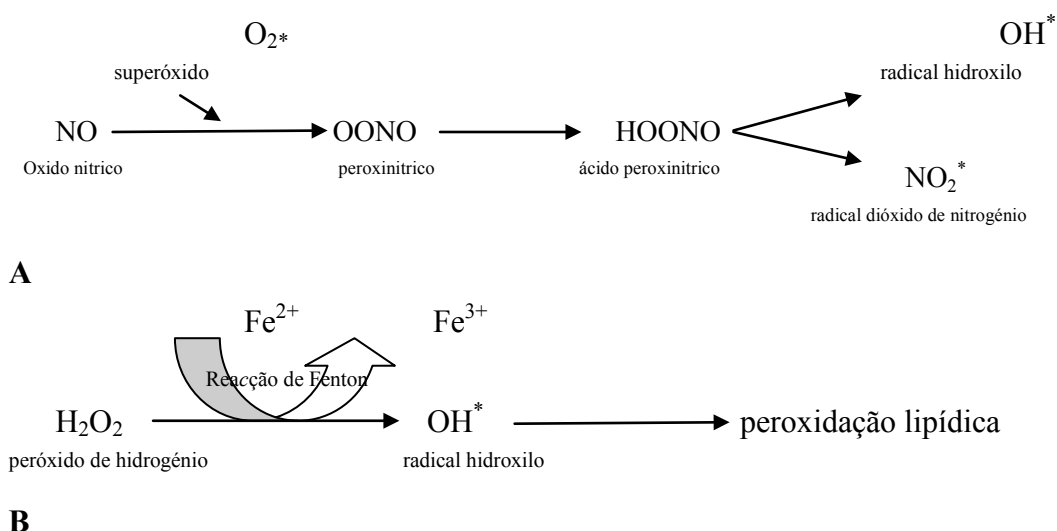


Fig. 9. (A) Representação da formação de radicais livres com base NO_2^* ; (B) Reacção do H_2O_2 com o catião Fe^{2+} produzindo o radical hidroxilo muito reactivo (OH^*) (Chauhan e Chauhan, 2006).

3.2. Peroxidação lipídica

Sabe-se que o βA tem propriedades antioxidantes no FCE e no plasma, pois protege as lipoproteínas da oxidação (Liu et al., 2009). Factores como idade, deformações mitocondriais (uma vez que as mitocôndrias funcionam como o centro de toda a actividade metabólica celular, sendo estas a fonte inicial do stress oxidativo, caso ocorra alguma perturbação oxidativa, leva a uma capacidade metabólica alterada), emaranhados neurofibrilares e acumulação de βA contribuem para o aumento do stress oxidativo no doente de Alzheimer. Desequilíbrios na homeostase oxidativa levam a um aumento da peroxidação lipídica que tem sido revelada como um factor importante envolvido em desordens neurodegenerativas no doente de Alzheimer (Chauhan e Chauhan, 2006). Mitocôndrias danificadas não têm a capacidade de resposta para o correcto fornecimento de energia necessária para a actividade celular, uma vez que há uma deficiente produção de ATP e um aumento de radicais de oxigénio, logo há aumento do stress oxidativo. Por outro lado, o βA também provoca diminuição do potencial mitocondrial induzindo também o stress oxidativo, devido à activação da NADPH oxidase (Chauhan e Chauhan, 2006).

Os fosfolípidos (principais constituintes da membrana celular) têm na sua composição ácidos gordos polinsaturados que são, por sua vez, o principal alvo das

ROS. A produção de radicais livres como o radical hidroxilo (OH \cdot) e radicais peróxido (ROO \cdot) inicia a sequência da peroxidação lipídica. O β A ao aumentar a peroxidação lipídica aumenta o stress oxidativo. Os produtos da oxidação lipídica alteram a estrutura das proteínas ao interferirem nas ligações covalentes, inibindo consequentemente a função das enzimas (Chauhan e Chauhan, 2006). Os fosfolípidos estão distribuídos assimetricamente na membrana, perdendo-se esta assimetria com a peroxidação. Os péptidos β A são atraídos pela carga negativa dos ácidos gordos da membrana, o que vai provocar a formação de uma película β , que é um pré-requisito para a fibrilação do β A. Durante a peroxidação da membrana, os lípidos aniónicos, como por exemplo a fosfatidilserina (PS), trocam de posição na bicamada fosfolipídica, trocando para a camada externa, estando assim acessíveis a uma interacção com β A. Propõe-se então que a fibrilogénese pode ser provocada pela perda de assimetria dos fosfolípidos (Chauhan e Chauhan, 2006).

A produção de metabolitos lipídicos (como o isoprostano) mediada por β A, está implícita na patogénese da DA. O isoprostano (Fig. 10) estimula a formação e agregação de β A. Sendo a membrana celular constituída por lípidos, as interacções dos agregados de β A provocam stress oxidativo e aumento da concentração de iões cálcio livre, o que pode levar à morte celular por apoptose (Chauhan e Chauhan, 2006).

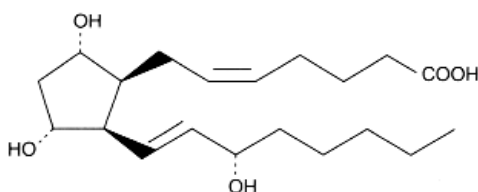


Fig. 10. Isoprostano (Prostanoids, 2010).

O cérebro de doentes com DA evidencia altos níveis de produtos resultantes da peroxidação lipídica, tais como 4-hidroxinonenal ou 2-propenal (acroleína) (Fig. 11). A peroxidação lipídica pode também ser detectada através do plasma de doentes de Alzheimer e no FCE. Os radicais livres contribuem para danificar proteínas e ácidos nucleicos, contribuindo também para a patologia do doente de Alzheimer (Chauhan e Chauhan, 2006; Liu et al., 2009).

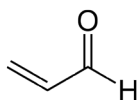


Fig. 11. Acroleína (Wikimedia Commons, 2010).

3.3. Defesa antioxidativa

Torna-se evidente que os antioxidantes têm um papel preponderante na prevenção da DA, fazendo com que os danos celulares sejam reduzidos. O sistema celular tem antioxidantes endógenos que actuam em primeira linha contra os efeitos do stress oxidativo, sendo o mais abundante a glutathiona (GSH) (Silvestrelli et al., 2006).

Várias enzimas estão envolvidas na defesa antioxidativa, como é o caso da dismutase superóxido que intervém na transformação do superóxido em H_2O_2 e da glutathiona peroxidase/catalase que neutraliza o H_2O_2 . Por exemplo, a alteração no metabolismo da GSH associada ao aumento do stress oxidativo, está implícita na DA (Chauhan e Chauhan, 2006). A glutathiona peroxidase/catalase pode neutralizar o H_2O_2 originando como produtos finais H_2O e O_2 , ou sob a acção da mieloperoxidase dar origem ao singlete oxigénio 1O_2 . Quando ocorre um desequilíbrio entre o mecanismo de defesa e a produção de ROS, como consequência por exemplo da idade, o organismo entra em stress oxidativo. Com a idade há o aumento das concentrações de proteínas, lípidos e DNA com danos oxidativos (Fig. 12) (Chauhan e Chauhan, 2006).

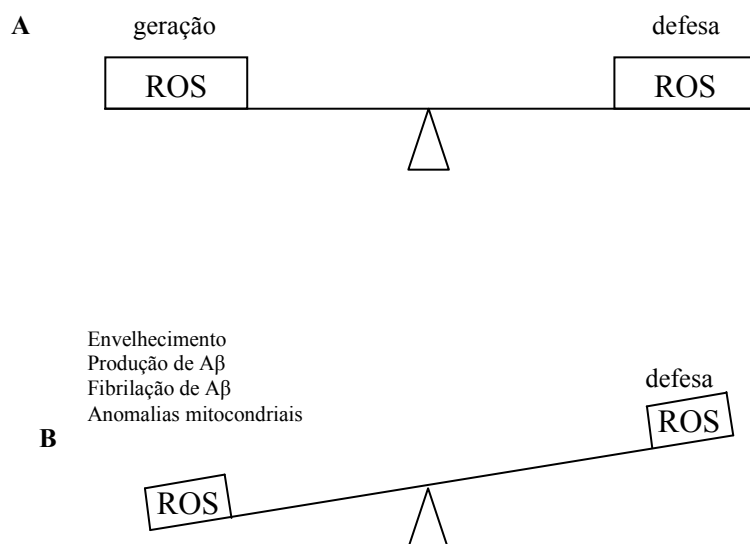


Fig. 12. Possível mecanismo do stress oxidativo na DA. **(A)** Em condições normais, ROS são neutralizados pelo sistema de defesa; **(B)** Quando a produção de ROS ultrapassa o mecanismo de defesa na DA, ocorre um desequilíbrio resultando em stress oxidativo (Chauhan e Chauhan, 2006).

Os emaranhados neurofibrilares resultam da hiperfosforilação da proteína tau. Como a formação de lesões neurofibrilares reduz os danos provocados pelo stress oxidativo, a fosforilação da proteína tau funciona assim como um antioxidante. Deste modo, a indução da fosforilação da proteína tau e a sua agregação provocada pelo stress oxidativo funciona como uma defesa da célula, na tentativa de preservar a sua estrutura e função (Silvestrelli et al., 2006).

Hoje em dia, as medidas terapêuticas utilizadas em doentes com DA visam apenas atenuar a sintomatologia, não conseguindo abrandar o progresso da doença. Sendo o stress oxidativo um dos primeiros factores da DA, a protecção dos neurónios dos danos provocados pelo stress oxidativo irá prevenir o aparecimento da DA (Liu et al., 2009).

O tocoferol (vitamina E) e o ácido ascórbico (vitamina C) estão relacionados com a diminuição da incidência de DA, tema que irá ser abordado no próximo capítulo. Vários estudos estão a ser efectuados, nomeadamente com a Coenzima Q₁₀ (presente na membrana interna das mitocôndrias), acetil-L-carnitina (ALCAR) e ácido R- α -lipóico (LA). Este tipo de terapêutica pode funcionar quando administrada em pessoas ainda

jovens (a título preventivo), pois uma vez atingido o patamar do estado oxidativo estabilizado, deixa de ser eficaz (Chauhan e Chauhan, 2006; Liu et al., 2009). Outros antioxidantes como gossipina, melatonina, ginkgo biloba e flavonóides também têm efeitos na diminuição da neurotoxicidade de β A (Chauhan e Chauhan, 2006).

3.4. Stress oxidativo e DNA

Tanto o ácido desoxirribonucleico (DNA, *desoxyribonucleic acid*) nuclear como o mitocondrial podem ser vítimas dos danos oxidativos provocados por ROS, como por exemplo a modificação das bases azotadas ou a oxidação da desoxirribose. Danos no DNA mitocondrial podem levar à formação de compostos anormais da cadeia transportadora de electrões, que acaba por levar à formação de mais ROS, provocando mais danos nas células, (tornando-se um ciclo vicioso) (Chauhan e Chauhan, 2006). Devido à natureza pós mitótica, os danos no DNA dos neurónios podem ser altamente prejudiciais para o seu desempenho e viabilidade (Zawia et al., 2009).

De todas as bases azotadas do DNA, a guanina é a base azotada que tem o potencial de oxidação mais baixo. Desta maneira, 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) é a forma mais dominante das bases azotadas oxidadas que são produzidas (Zawia et al., 2009). A metilação da citosina influencia a regulação da expressão de genes. Alterações nos padrões da 5-metilcitosina sobre os promotores de genes são o primeiro nível de regulação na expressão génica no desenvolvimento, diferenciação, carcinogénese e envelhecimento. A metilação da citosina pode às vezes servir como código hereditário através da acção selectiva de algumas metilases que actuam na citosina na sequência de CG. Os padrões da metilação do DNA são geralmente estabelecidos no útero e o ambiente fetal pode alterar esses padrões, levando a mudanças na expressão dos genes que podem durar toda a vida (Zawia et al., 2009).

Considerando que as substituições no DNA revelam interacção com danos oxidativos e metilação, esta relação pode também ser feita ao nível celular. Estudos com transformações oxidantes demonstraram alterações não comuns nos padrões de metilação de vários genes. Isto sugere que o DNA com danos oxidativos e a metilação do DNA interagem um com o outro, o que pode depois alterar os padrões de metilação e

a actividade da transcrição dos genes que ficam afectados. No caso do gene PPA, alterações na oxidação e metilação nas suas regiões de promotor podem determinar a sua expressão, bem como os níveis dos seus produtos genéticos e os seus derivados associados às formações amilóides. Tanto a hipermetilação como a hipometilação podem ser afectadas por factores relacionados com a dieta, ambiente e stress oxidativo (Zawia et al., 2009).

3.5. Stress oxidativo e colesterol

A hipercolesterolemia, a hipertensão e a aterosclerose são factores de risco para a DA. Como será aprofundado no capítulo seguinte, alguns estudos revelam que medicamentos para baixar o colesterol reduzem também o risco de DA (Chauhan e Chauhan, 2006).

A produção de α -hidroxicolesterol, devido à oxidação do colesterol mediada por PPA/ β A, pode contribuir para o stress oxidativo e morte celular na DA (Chauhan e Chauhan, 2006). O domínio do terminal-C da PPA revela desempenhar um papel fulcral para que surja afinidade na ligação com o colesterol. Quando surge este tipo de interacção, ocorre a promoção de processos como a fibrilização, a oligomerização e a oxidação do colesterol (Beel et al., 2010). Com um aumento dos níveis de colesterol ocorre a sua crescente complexação com a PPA. Neste tipo de associação a actividade das β - e γ -secretases fica comprometida, havendo um aumento das suas clivagens na PPA com consequente aumento da síntese e agregados de β A (Beel et al., 2010; Chauhan e Chauhan, 2006). Foram feitos estudos que sustentam esta ideia, revelando uma tendência para a acumulação de β A no cérebro de animais com uma dieta rica em colesterol, enquanto que nos animais tratados com medicamentos para baixar o colesterol os níveis de β A diminuíram, resultado da estimulação da α -secretase (Chauhan e Chauhan, 2006).

3.6. Stress oxidativo e proteases

As proteases são em grande parte as responsáveis pela apoptose e neurodegeneração. A presença de marcadores da resposta inflamatória no cérebro de doentes com DA sugere uma relação entre as proteases e o stress oxidativo. A actividade do promotor de BACE1 é aumentada devido ao stress oxidativo provocado por H₂O₂, fazendo também com que seja facilitada a actividade da β -secretase e a formação de β A. O β A pode mesmo ter um papel fundamental na actividade das proteases. O β A solúvel estimula a actividade das proteases de elevado peso molecular (HMW, *high molecular weight*) no cérebro, enquanto que o β A fibrilar diminui (Chauhan e Chauhan, 2006).

Como já foi referido, os radicais livres são formados durante a fibrilação de β A, mas não se consegue ainda estabelecer uma relação entre a inibição da actividade das proteases com a produção de radicais livres durante a fibrilação de β A. As proteases são necessárias para o catabolismo do β A, o que vai provocar o aumento de β A solúvel, que por sua vez provoca aumento do stress oxidativo (Chauhan e Chauhan, 2006).

3.7. Stress oxidativo e cafeína

Vários estudos fazem referência a que a ingestão de cafeína, por períodos prolongados de tempo, ao longo da vida adulta, reduz o risco de DA (Arendash et al., 2006; Costa et al., 2008).

A cafeína (3,7-diidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona) (Fig. 13) pertence ao grupo das xantinas e na sua maioria é consumida na forma de café ou chá (Arendash et al., 2006).

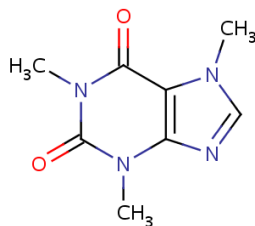


Fig. 13. Estrutura da cafeína (Cafeína | Informação Nutricional, 2010).

A cafeína é um antagonista dos receptores da adenosina (Arendash et al., 2006). A adenosina é um importante neuromodulador do Sistema Nervoso Central (SNC). Existem quatro receptores da adenosina, A1, A2A, A2B, A3, sendo A1 e A2A os que apresentam maior relevância no SNC, especialmente A1 pois está amplamente distribuído por todo o cérebro (Costa et al., 2008). Estudos sugerem que a cafeína apresenta benefícios quando utilizada para prevenir o desequilíbrio cognitivo ligeiro (Costa et al., 2008). Tem a capacidade de potenciar a libertação de neurotransmissores como o glutamato, a dopamina e a acetilcolina (Silva et al., 2008). Existe um antagonismo não selectivo com o receptor da adenosina, o qual inibe a libertação de glutamato que é o maior neurotransmissor excitatório. Ocorre o bloqueio dos receptores A1 e A2A que são o principal alvo farmacológico (Costa et al., 2008; Morelli and Simola, 2010), ganhando destaque de neuroprotecção para a DA (Morelli and Simola, 2010). Com a activação dos receptores da adenosina ocorre diminuição do estímulo para a libertação de neurotransmissores (Silva et al., 2008).

A cafeína aumenta o metabolismo energético cerebral, a actividade cortical e os níveis de acetilcolina extracelulares (Arendash et al., 2006). Promove o estado de alerta e de despertar, diminuindo o efeito de fadiga (Botton et al., 2010). A degeneração dos neurónios colinérgicos é responsável pelo declínio das funções cognitivas na DA. A cafeína desperta os indivíduos, pois amplifica a transmissão colinérgica cortical. Estudos recentes revelam que a cafeína previne o declínio cognitivo associado à DA, assim como a morte de neurónios provocada pela β A (Botton et al., 2010).

Através das suas propriedades hidrofóbicas, a cafeína atravessa barreiras biológicas e até mesmo a barreira fetal (Silva et al., 2008). Quando ocorre administração da cafeína em baixas doses ocorre o efeito de estímulo. Contudo, quando em doses

elevadas, pode provocar efeito de depressão (Arendash et al., 2006). A ingestão diária moderada de cafeína pode reduzir o risco de DA (Arendash et al., 2006). A cafeína protege os neurónios da toxicidade. Dessa forma, mostra capacidade para atenuar a degeneração neuronal, sugerindo ser um forte neuroprotector para a DA (Costa et al., 2008; Morelli e Simola, 2010).

Para além das propriedades antioxidantes, em que protege as membranas do stress oxidativo com inibição da peroxidação lipídica induzida por radicais livres (Prasanthi et al., 2010), a cafeína revela capacidade adicional para diminuir os níveis do péptido β A. Com a administração da dose diária correcta de cafeína será possível reduzir os níveis acelerados da fosforilação da proteína tau e os níveis de stress oxidativo, sendo útil para a prevenção contra a DA (Prasanthi et al., 2010). A cafeína revela resultados mais satisfatórios para diminuir o péptido β A40 e o β A42 em pequenas doses diárias do que quando administrada em maiores doses diárias (Prasanthi et al., 2010). Revela também capacidade para contrariar os elevados níveis de stress oxidativo e de agregados β A. Previne a acumulação do péptido β A através de duas formas: reduzindo a produção e aumentando a degradação deste péptido. Demonstra influência na redução dos níveis da PPA e da enzima BACE1, diminuindo a síntese do péptido β A. A cafeína proporciona um aumento dos níveis da enzima degradante da insulina (IDE, *insulin degrading enzyme*), enzima que colabora na degradação da PPA gerada no cérebro (Prasanthi et al., 2010).

Estudos demonstram que os benefícios da cafeína não estão relacionados com os níveis dos receptores de adenosina, mas sim com a supressão da produção de β A. Isto porque a cafeína reduz a expressão tanto da PS1 como da α -secretase (BACE1) (Arendash et al., 2006). A redução dos níveis de β A no cérebro deve-se à diminuição da clivagem da PPA pela γ -secretase e BACE1. Esta diminuição, associada à expressão de PS1 necessária para a actividade do complexo γ -secretase, previne o processamento amilóidogénico da PPA, explicando a diminuição dos níveis de β A. A competição entre a α -secretase e as BACEs pela PPA enquanto substrato leva ao processamento não-amilóidogénico. Logo o tratamento com cafeína pode modular a actividade da α -secretase para produzir o metabolito PPA neuroprotector (Arendash et al., 2006). Experiências com ratos realizadas por Arendash et al (2006) revelaram que a ingestão a

longo prazo de cafeína protege os ratos contra enfraquecimento cognitivo. Esta protecção é global, ou seja, abrange vários domínios cognitivos. Há a redução hipocampal dos níveis de PS1 e BACE1 nos ratos com Alzheimer. A cafeína não afecta os níveis dos receptores no cérebro, embora seja responsável pela restauração dos níveis de adenosina no cérebro (Arendash et al., 2006).

A ApoE é um dos principais factores de risco para DA, como já foi referido no capítulo anterior. Indivíduos com uma ou duas cópias do alelo ApoE4 têm risco aumentado de sofrerem da DA. A ApoE transporta colesterol do sangue para o cérebro, logo está associada ao aumento de colesterol no plasma. Conforme já foi mencionado, o colesterol aumenta o risco de desenvolvimento de DA. Dietas ricas em colesterol aumentam os danos oxidativos e o aumento de β A e fosforilação da proteína tau. A cafeína tem uma acção protectora ao evitar a acumulação de β A e os danos oxidativos (Prasanthi et al., 2010). Vários estudos demonstram que animais com dietas ricas em colesterol beneficiam da administração da cafeína. Esta diminui o aumento da produção de β A induzida pela dieta rica em colesterol e reduz também a fosforilação da proteína tau, assim como protege contra o stress do RE provocado pelo colesterol. A cafeína restaura os níveis de adenosina A1, mas não afecta os níveis de colesterol. Logo, estes estudos revelam que uma dieta rica em colesterol pode ser o ponto de partida para desenvolver DA. A cafeína, devido às suas propriedades antioxidantes, pode proteger contra a DA (Prasanthi et al., 2010).

Nos seres humanos, os dados acerca dos benefícios da cafeína nas funções cognitivas ainda são controversos, uma vez que apenas alguns estudos encontram uma associação positiva entre a ingestão da cafeína e o aumento cognitivo (Costa et al., 2008). Embora vários estudos com roedores reportem para os benefícios da ingestão da cafeína na protecção da DA, no Homem é muito difícil confirmar pois, em primeiro lugar, os estudos retrospectivos são baseados nas recordações dos indivíduos, não se podendo isolar a ingestão da cafeína de outros factores que possam afectar a cognição, em segundo, os estudos longitudinais envolvendo a administração de cafeína ao longo de décadas são por si só impraticáveis (Arendash et al., 2006).

IV. Metais e a DA

O equilíbrio de metais é crítico para funções fisiológicas (Duce e Bush, 2010), em particular no sistema nervoso central, onde os metais são essenciais para as actividades enzimáticas, para o bom desempenho mitocondrial, na neurotransmissão, na memória e no processo de aprendizagem (Duce e Bush, 2010).

O cérebro concentra metais, como por exemplo no neocórtex, e a homeostasia destes tem um papel preponderante na evolução da DA, assim como em interacções da PPA, β A e interacções redox (Fig. 14) (Duce e Bush, 2010).

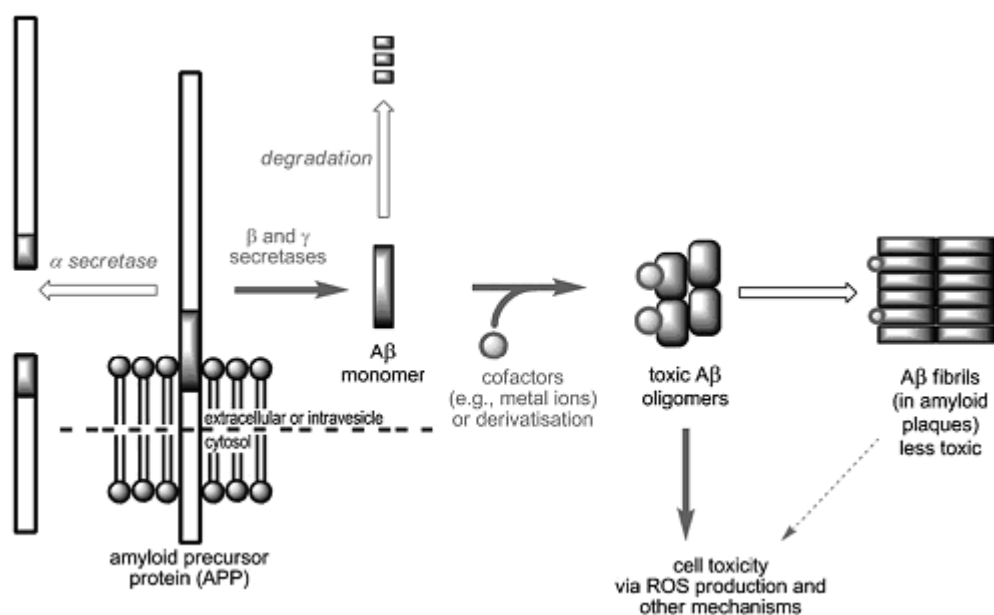


Fig. 14. Esquema que evidencia o processamento da cascata amilóide em volta da PPA e respectiva relação com iões metálicos (Hureau et al., 2010).

Uma das principais características da DA é o dano provocado por oxidação (Duce e Bush, 2010). Os iões metálicos funcionam como mediadores no mecanismo do stress oxidativo, desenvolvendo toxicidade ao nível do β A (Barnham e Bush, 2008; Duce e Bush, 2010). Metais como o cobre e o ferro levam à geração de ROS ou radicais livres (Barnham e Bush, 2008; Coenzyme Q10, 2010) como o H_2O_2 , que proporciona níveis tóxicos de β A (Barnham e Bush, 2008). Numa reacção redox o H_2O_2 pode reagir

com Fe^{2+} ou Cu^+ que, via reacção de Fenton, dá origem a radicais hidroxilo (Fig. 15) desencadeando posteriormente a patologia (Duce e Bush, 2010; Valenzuela et al., 2008).



Fig. 15. Reacção de Fenton: decomposição do H_2O_2 dependente do ferro, com a produção de radicais hidroxilo muito reactivos (Zatta et al., 2009).

O contacto com ambientes ricos em metais constitui um factor de risco para a DA (Liu et al., 2009). Contudo, não é o aumento da exposição a estes metais que provoca doenças neurodegenerativas, mas sim a ocorrência da desregulação do mecanismo homeostático que é responsável pela sua regulação (Duce e Bush, 2010).

Todos os metais são susceptíveis de criar stress oxidativo, ou seja, um desequilíbrio na relação prooxidante-antioxidante, responsável pelo envelhecimento das células cerebrais, assim como do envelhecimento mitocondrial. Há vários tipos de danos provocados pelo stress oxidativo na DA como oxidação proteica, peroxidação lipídica e oxidação dos ácidos nucleicos, como já foi referido no capítulo anterior (Duce e Bush, 2010). Quando na presença de uma situação com stress oxidativo exagerado, seguido de peroxidação lipídica, desencadeia-se um evento patológico no cérebro que leva depois à doença (Barnham e Bush, 2008; Duce e Bush, 2010). Existem dois tipos de metais, os metais tóxicos e os biometais, tendo grande parte deles, quando no organismo, um papel relevante na evolução da DA (Duce e Bush, 2010; Liu et al., 2009).

4.1. Metais tóxicos

Os metais tóxicos são principalmente absorvidos e captados pelo cérebro e exemplo destes metais são o alumínio e o chumbo. Ao contrário dos biometais, o organismo não consegue fazer a regulação homeostática destes metais (Duce e Bush, 2010).

iv.i.i. Alumínio

É um dos metais aos quais os seres humanos estão mais expostos, isto devido à sua abundância na superfície terrestre, assim como ao facto de ser amplamente utilizado no dia-a-dia, tais como em utensílios de cozinha e embalagens (Duce e Bush, 2010).

O alumínio provoca um aumento de stress oxidativo (induzido por outros metais, nomeadamente o ferro), da produção de β A e da deposição de placas senis (Duce e Bush, 2010). Daí existirem poucas dúvidas quanto à sua toxicidade para o Homem e animais (Duce e Bush, 2010; Zatta et al., 2009). As alterações patológicas já verificadas suportam a ideia de que a neurotoxicidade do alumínio pode ser mais elevada sempre que ocorre excreção fisiológica do metal de uma forma debilitada (Zatta et al., 2009). Por sua vez, apenas uma pequena percentagem de alumínio ingerido, presente na comida, chá e medicamentos como os antiácidos, é absorvido no tracto gastrointestinal. A captação de alumínio é limitada pela presença de componentes como o citrato que vai complexar o ião, ou através da competição pela captação também exercida por outros iões como cálcio, magnésio e sílica. Ainda não existem dados científicos que confirmem a entrada de alumínio no cérebro, assim como o mecanismo que estará envolvido neste processo. Contudo, parte do alumínio que chega ao cérebro permeia a barreira hematoencefálica com a activação de vários transportadores. Tais modificações na patologia ao nível estrutural e funcional da barreira hematoencefálica contribuem para a acumulação de alumínio no cérebro do doente de Alzheimer (Zatta et al., 2009).

O alumínio revela não ser o factor preponderante para causar a DA, uma vez que isoladamente não é suficiente para promover este tipo de doença. Doentes que sofrem de encefalopatia com necessidade de fazer diálise revelam um aumento de alumínio no cérebro, que se pensa ser o resultado das soluções de diálise ricas em águas contaminadas por alumínio (Duce e Bush, 2010; Zatta et al., 2009). As marcas neuropatológicas e funcionais na encefalopatia com este metal, com um longo historial de diálises não são sobreponíveis aos dados observados em doentes com a DA (Duce e Bush, 2010; Zatta et al., 2009). Estudos científicos indicam que o alumínio quando conjugado com β A pode desempenhar um efeito que possibilita o estado oligomérico do péptido, favorecendo a formação de espécies amilóides perigosas e neurotóxicas. Uma

produção patológica do péptido β A leva a disfunção sináptica e mais tarde a demência. Isto acontece porque ocorre quebra na homeostasia do alumínio, acabando este metal por funcionar como um co-factor para a DA (Zatta et al., 2009).

Quando se estabelece uma comparação com outros metais, como cobre, ferro e zinco, o alumínio revela ser o mais eficaz na promoção da agregação do tipo associações β A com alta neurotoxicidade. Quando ocorre a conjugação do alumínio com o β A, este sofre uma espontânea mudança na sua conformação estrutural, o que leva a um aumento da sua superfície hidrofóbica. Ocorre uma redução na sequestração de microcapilares cerebrais e um aumento da permeabilidade através da barreira hematoencefálica, um fenómeno que acarreta uma acumulação do complexo β A-alumínio (Zatta et al., 2009).

O alumínio, sendo um elemento reactivo, pode contribuir para patologias relacionadas com a proteína tau (Zatta et al., 2009). A proteína tau tem importância fisiológica na produção de microtúbulos neuronais, proporcionando desta forma um elemento essencial para a estabilização do citoesqueleto neuronal, importante para manter a integridade estrutural e de transporte axonal. Na DA, a hiperfosforilação da proteína tau promove o desarranjo ou dissociação de microtúbulos e a formação de emaranhados neurofibrilares da proteína tau que ficam agregados o que provoca a morte neuronal (Duce e Bush, 2010; Zatta et al., 2009).

iv.i.ii. Chumbo

Com facilidade encontramos chumbo no nosso dia-a-dia, como por exemplo na composição de tintas e de combustíveis (Duce e Bush, 2010; Struzynska, 2009). Trata-se de um poluente ambiental, um metal pesado com propriedades neurotóxicas. A exposição excessiva a este metal persiste como um problema de saúde actual, apesar dos esforços para reduzir a sua presença (Struzynska, 2009). Mesmo em baixas doses de exposição foi reconhecido como uma potente toxina que leva à degradação neurológica com défice cognitivo e distúrbios comportamentais relacionados, ainda com repercussões tóxicas ao nível do SNC. Foi estabelecido que os organismos de indivíduos adultos são menos vulneráveis a intoxicações de chumbo devido à barreira

hematoencefálica e ao próprio desenvolvimento dos mecanismos de defesa. A influência deste metal tóxico sobre as funções do cérebro é evidente: o chumbo revela facilidade para atravessar a barreira hematoencefálica e depois entrar no parênquima (Struzynska, 2009).

Este metal tem maior propensão em afectar as crianças uma vez que impede o desenvolvimento do SNC. Altera o influxo de cálcio e afecta os neurotransmissores. É dessa forma que consegue levar a uma disfunção do SNC, com desequilíbrio intelectual e alterações ao nível comportamental, tendo influência na progressão da DA. Quando ocorre um distúrbio adicional, como o contacto com o chumbo, aumenta a intensidade do nível da gravidade da patologia (Duce e Bush, 2010). Segundo Struzynska (2009), a exposição a este metal influencia os mecanismos subjacentes ao processo de aprendizagem, memória e morte celular por apoptose. Foram realizadas investigações através de espectroscopia por ressonância magnética e foi possível descrever que com este tipo de exposição ocorre disfunção do lobo frontal, e em maior medida do hipocampo, que é muito importante em processos de aprendizagem e de memorização. Neste estudo, a disfunção do hipocampo que foi verificada estava também relacionada com a perda neuronal ou sinais de neurodegeneração (Struzynska, 2009).

Estudos que avaliaram a exposição de trabalhadores num ambiente rico em chumbo comprovaram que ocorre um aumento do nível de chumbo no sangue levando posteriormente a um desequilíbrio neurocognitivo com perda acentuada da memória, que possibilita a ocorrência de doenças neurodegenerativas como a DA (Struzynska, 2009). Os resultados desses estudos sugerem que a exposição ao chumbo desempenha um papel na etiologia da DA. De acordo com estas pesquisas, a exposição ao chumbo pode ter efeitos adversos sobre o sistema nervoso, podendo depois mais tarde causar neurodegeneração (Duce e Bush, 2010; Struzynska, 2009).

O envolvimento do chumbo no desenvolvimento da DA não está ainda bem determinado. Estudos em primatas e roedores mostram implicação do chumbo nas alterações que levam ao aumento da PPA β A, bem como do stress oxidativo (Duce e Bush, 2010). Este aumento não está relacionado com as secretases, nem com um aumento da sua expressão. Não parece ter igualmente nenhum efeito na actividade

proteolítica destas enzimas (Duce e Bush, 2010). O mecanismo pelo qual o chumbo aumenta a PPA e a β A relaciona-se com a sua capacidade em alterar a expressão genética do gene responsável pela formação da PPA (White et al., 2007). Segundo White et al. (2007), a exposição ao chumbo à nascença conduz a um aumento, durante a senescência, da expressão do gene responsável pela formação do PPA, ocorrendo assim um aumento do mRNA da PPA com conseqüente aumento da PPA e β A. Além disso, o chumbo é também capaz de promover a formação de agregados concentrados nanomolares, bem como causar a acumulação intracelular de β A, e aumentar a densidade do núcleo das placas (Duce e Bush, 2010).

4.2. Biometais

As células possuem processos eficientes de aquisição, distribuição e regulação dos biometais. Quando ocorre alguma anomalia no seu controlo homeostático, esta vai-se reflectir numa disfunção mitocondrial, em stress oxidativo e danos no genoma mitocondrial (Coenzyme Q10, 2010).

Os biometais circulam no cérebro de forma regulada através da barreira hematoencefálica. O aumento da concentração de biometais leva a uma interacção com proteínas e posteriormente à origem de uma doença neurodegenerativa. Tal facto deve-se, como já foi mencionado anteriormente, a uma falha no mecanismo de homeostasia que os regula. Estes iões metálicos encontram-se associados a ligandos ou no estado livre (Duce e Bush, 2010). Por exemplo, o cobre e o zinco actuam como mediadores que possibilitam a agregação de β A (Zatta et al., 2009).

iv.ii.i. Cobre

O cobre é de extrema importância para o organismo, pois é responsável por actividades de oxidação e desoxigenação, transferência de electrões, e controlo do nível de radicais de oxigénio (Coenzyme Q10, 2010). Existe na forma oxidada, Cu^{2+} , ou reduzida, Cu^+ , e este carácter redox facilita a conjugação com muitos ligandos. As formas livres deste metal são potencialmente prejudiciais (Duce e Bush, 2010).

Os níveis de cobre encontrados no plasma ao nascimento são baixos e estes valores aumentam mais tarde. Vários estudos em animais e no Homem reportam para este aumento dos níveis de cobre no cérebro desde a infância até à fase adulta (Duce e Bush, 2010). Alterações na homeostasia dos níveis de cobre no cérebro levam a patogénia em desordens neurológicas como a DA (Duce e Bush, 2010). Elevadas concentrações de cobre foram encontradas nas placas amilóides de cérebros de doentes com DA (Rivera-Mancía et al., 2010). A absorção, distribuição e excreção do cobre são controladas por várias proteínas, prevenindo potenciais danos provocados pelas formas livres deste metal (Duce e Bush, 2010).

A homeostasia do cobre é controlada por metaloproteínas e também através da ATPase, um transportador de cobre (Duce e Bush, 2010). O cobre iónico é libertado com a estimulação da fenda pós-sináptica e fica concentrado em vesículas. Estas concentrações de cobre levam a um aumento da secreção de metaloproteínases, e desta forma à degradação do β A (Zatta et al., 2009). Logo, a deficiência em cobre leva à diminuição da degradação de β A (Rivera -Mancía et al., 2010). A PPA provoca a depleção de cobre no cérebro de um doente de Alzheimer, devido ao facto de esta PPA se ligar ao cobre favorecendo assim o efluxo de iões (Zatta et al., 2009). A PPA funciona como um transportador de cobre, com local de ligação na sequência do péptido β A e na super expressão de PPA, que demonstra reduzir os níveis de cobre no cérebro (Rivera-Mancía et al., 2010; Zatta et al., 2009). Este argumento é baseado em experiências com ratos, nos quais, os níveis de cobre revelam um aumento na zona do córtex do cérebro, considerando que uma grande expressão de PPA promove uma redução significativa da concentração de cobre no cérebro de ratos com a doença (Zatta et al., 2009).

O β A tem elevada afinidade para o cobre, o que pode promover a toxicidade do β A (Rivera-Mancía et al., 2010). Quando existem iões cobre, β A reduz o Cu^{2+} para Cu^+ e catalisa a formação de H_2O_2 (Chauhan e Chauhan, 2006) através de processos de redução que usam O_2 , colesterol, vitamina C e catecolaminas (Zatta et al., 2009), originam radicais hidroxilo muito tóxicos, o que aumenta o stress oxidativo (Chauhan e Chauhan, 2006). Uma grande variedade de cadeias β A podem ser oxidadas e as suas conjugações podem ocorrer, como aldeídos com resíduos de lisina e tirosina (Fig. 16) na

posição 10. Esta última é facilmente susceptível a radicais livres devido ao anel aromático conjugado (Duce e Bush, 2010; Zatta et al., 2009).

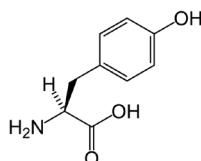


Fig. 16. Representação da estrutura da tirosina (Mecanismo de acción de la noradrenalina, 2010).

A eliminação do H₂O₂ é feita por peroxidases, como a catalase e glutathione peroxidase.

$X_{\text{reduzida}} + \text{H}_2\text{O}_2$ (peroxidase + cofactor) > $X_{\text{oxidada}} + \text{H}_2\text{O}$, em que X é referente à molécula que sofre peroxidação.

No caso da DA, com a ausência de enzimas como a catalase e a glutathione peroxidase, o H₂O₂ pode levar a uma produção muito pronunciada de radicais com consequências neurotóxicas muito prejudiciais (Duce e Bush, 2010; Zatta et al., 2009).

Segundo Bush e Duce (2010), observou-se recentemente na sinapse a presença da espécie iónica em concentrações micromolares. Este microambiente é o único local onde se conhece a existência de cobre na sua forma livre. A presença de cobre é relevante, uma vez que evita a morte de alguns neurónios do hipocampo. O mecanismo de recaptação do cobre libertado na sinapse envolve provavelmente o gasto de energia. Com o avançar da idade, e principalmente quando esta está associada com DA, há a diminuição de produção de energia mitocondrial, levando à acumulação de cobre livre na sinapse. No cérebro o cobre está associado com placas senis e esta associação aumenta com o avanço da idade (Duce e Bush, 2010). Isto porque há uma redistribuição anormal de cobre. Pensa-se que esta redistribuição ocorra devido a algum componente lipídico, uma vez que se demonstrou que elevados níveis de colesterol e cobre promovem a agregação de β A e processos oxidativos (intensa produção de stress

oxidativo), que resultam na formação de placas senis, logo, aumentam o risco de DA (Coenzyme Q10, 2010; Duce e Bush, 2010; Zatta et al., 2009).

A utilização de várias moléculas quelantes de cobre (como o clioquinol) tem sido alvo de vários estudos, uma vez que estas vão interromper a interacção cobre- β A. Estes quelantes podem remover o cobre do β A, mas ~~á~~amb podem transportar através da membrana para o interior da célula (Hureau et al., 2010). Estes estudos serão aprofundados no capítulo seguinte

iv.ii.ii. Ferro

O ferro é um elemento vital. Em excesso este metal torna-se tóxico porque origina radicais hidroxilos e aniões superóxidos que mais tarde reagem com proteínas, DNA e lípidos (Duce e Bush, 2010). Através de reacções de Fenton, o ferro gera radicais livres, como os radicais hidroxilo que são muito reactivos. Estes, por sua vez, vão intervir nas biomoléculas como os lípidos membranares, proteínas e ácidos nucleicos, mas também vão promover as ligações covalentes entre monómeros que levam à agregação de β A (Rivera -Mancía et al., 2010). Existe um mecanismo responsável por manter a homeostasia do ferro e quando este mecanismo fica desregulado surgem anemias ou doenças por excesso de ferro (Duce e Bush, 2010). A existência de ferro nas placas senis e nos emaranhados neurofibrilares nos cérebros *post mortem* de doentes com DA confirma a sua relevância na evolução da doença (Rivera-Mancía et al., 2010).

O cérebro e o fígado são os órgãos com maior quantidade de ferro. O acelerado metabolismo oxidativo que mantém o gradiente iónico membranar, assim como o transporte axonal e a transmissão sináptica parecem ser os responsáveis por esta elevada concentração de ferro nas células cerebrais (Duce e Bush, 2010). No cérebro o ferro não é apenas importante para o transporte de oxigénio e transferência de electrões, mas também para a síntese de neurotransmissores e produção de mielina. Com a idade aumentam os níveis de ferro nos tecidos (inclusive no cérebro) e diminui a sua concentração no plasma havendo, consequentemente, uma diminuição de hemoglobina (Duce e Bush, 2010).

O ferro fica armazenado numa proteína globular com 24 sub-unidades, a ferritina (Fig. 17), protegendo a célula de efeitos tóxicos. Está distribuída por vários órgãos, mas encontra-se maioritariamente no fígado (Devlin, 2002; Koolman e Roehn, 2005).

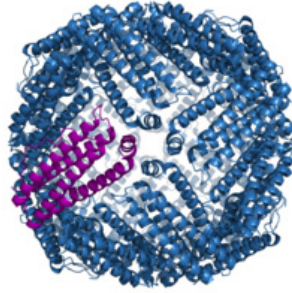


Fig. 17. Representação estrutural da ferritina (Wikipedia, the free encyclopedia, 2010).

Por sua vez, a transferrina é uma proteína (β -globulina) com dois domínios, útil no transporte do íon ferro pelo sangue e que está presente em placas senis de cérebros com DA (Fig. 18) (Koolman e Roehn, 2005; Rivera-Mancía et al., 2010).

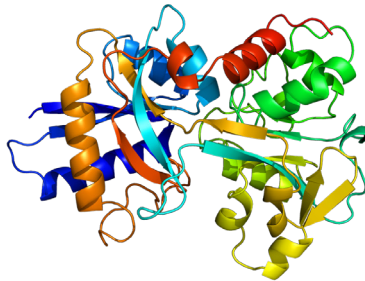


Fig. 18. Representação estrutural da transferrina (Wikipedia, the free encyclopedia, 2010).

O transporte de ferro até ao cérebro é feito através da transferrina, uma vez que o ferro oxidado para a sua forma férrica não consegue atravessar a barreira hematoencefálica (Duce e Bush, 2010). A homeostasia do ferro é controlada pela transferrina, uma glicoproteína que vai ligar os dois átomos de ferro, e também através da ferritina (Duce e Bush, 2010).

É possível confirmar que o aumento nos níveis de ferro está associado à formação de placas senis e novos neurofibrilares na DA (Duce e Bush, 2010; Zatta et al., 2009). Estes valores de ferro que se encontram aumentados estão associados em forma de complexos com a ferritina. Assim, enquanto que os níveis de ferritina aumentam, os níveis de transferrina diminuem (Duce e Bush, 2010). A falta de homeostasia de ferro no cérebro leva a um aumento da vulnerabilidade das células ao stress oxidativo que envolve o ferro num estado redox, sendo um dos estados iniciais na DA que está envolvido na progressão e patogénese da doença (Duce e Bush, 2010; Zatta et al., 2009). Níveis anormais de ferro, assim como de ferritina e de transferrina afectam o córtex e o hipocampo do cérebro no doente de Alzheimer. Além disso, nas áreas do cérebro mais vulneráveis à neurodegeneração, o ferro tem demonstrado que se acumula a um ritmo tal que não é acompanhado pelos níveis de produção de ferritina (Zatta et al., 2009).

Factores genéticos podem estar na origem de doenças neurodegenerativas, uma vez que vão afectar a homeostasia de determinados elementos. Mutações nos genes que codificam o polipeptídeo leve da ferritina (FTL, *ferritin light polypeptide*) levam ao desequilíbrio homeostático do ferro. Mutações do gene hemacromatose (HFE) são outro exemplo. Este gene codifica proteínas da membrana que estão relacionadas com a entrada de ferro na célula. Vários estudos genéticos demonstraram que a combinação do HFE e alelo C2 da transferrina constitui um factor de risco para a DA (Duce e Bush, 2010; Zatta et al., 2009).

A associação de níveis elevados de colesterol e ferro foram analisados e sabe-se que promovem a DA, sendo considerados também como um factor de risco (Duce e Bush, 2010; Zatta et al., 2009).

iv.ii.iii. Zinco

O zinco está presente em todos os tecidos animais, sendo o cérebro um dos órgãos que contém níveis mais elevados deste metal. Na sua forma iónica encontra-se nos terminais dos nervos glutamérgicos. Existem proteínas transportadoras de zinco (ZnT), nomeadamente ZnT1 e ZnT3, que têm grande expressão no cérebro (Fig. 19)

(Kozlowski et al., 2009). ZnT3 é o principal mediador do transporte de zinco para as vesículas sinápticas. ZnT3 e zinco encontram-se principalmente nas sinapses glutamérgicas do hipocampo e do neocórtex. Muito provavelmente ZnT3 é responsável pelas sinapses que medeiam elevadas funções cognitivas. A concentração de zinco diminui com o avançar da idade, havendo acentuado decréscimo a partir dos 75 anos de idade. Esta diminuição em doentes com DA, aumenta a patologia amilóide. A diminuição de zinco sistémico provoca aumento na retenção de zinco no cérebro, diminuindo os níveis de transportadores ZnT1. Os níveis de outros transportadores incluindo ZnT3 apresentam-se alterados nos cérebros de doentes com DA. Não é só a idade que induz a estreita relação do zinco com a DA, mas também o sexo, uma vez que os estrogénios modulam os níveis de ZnT3, diminuindo a sua actividade, logo aumentando o zinco sináptico (Duce e Bush, 2010; Maynard et al., 2006). A desregulação da homeostasia do zinco pode provocar uma disfunção mitocondrial (por exemplo, interfere na cadeia transportadora de electrões, inibindo a respiração celular) e stress oxidativo, podendo levar à neurodegeneração (Kozlowski et al., 2009).

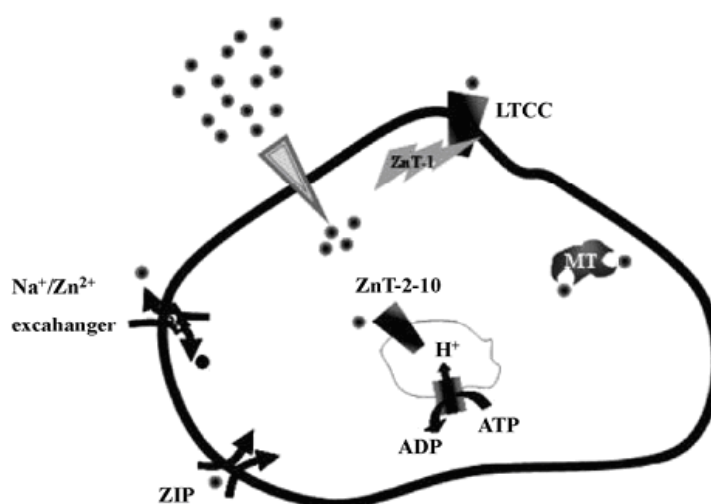


Fig. 19. Esquema relativo à homeostase do zinco nas células de mamíferos (Kozlowski et al., 2009).

Quando conjugados o cobre e o zinco, é facilmente provocada a precipitação de oligómeros β A. A zona terminal-N de β A pode levar a uma variada coordenação de metais, com a correlação entre β A e cobre, comprometendo -se a viabilidade neuronal (Barnham e Bush, 2008). Foram descobertas elevadas concentrações de cobre e zinco

em placas amilóides muito provavelmente devido a sinapses glutamérgicas. Esta associação formada pelo cobre e zinco está directamente coordenada com β A. Este tipo de interacção entre a associação dos metais referidos e β A poderá contribuir para uma maior acumulação do péptido e acarretar níveis de toxicidade para o cérebro. Num estado de saúde normalizado as quantidades intersticiais de zinco são consideradas importantes para a degradação do β A através de proteinases dependentes do zinco que previnem as acumulações do péptido (Strozyk et al., 2009).

4.3. Interacção dos biometais com a PPA, β A e a proteína tau

Embora não haja muitos dados, há uma provável associação da proteína tau com os metais, induzindo estes a sua fosforilação (Duce e Bush, 2010). Todos os biometais actuam na evolução da DA a vários níveis, logo são potenciais alvos para novos medicamentos (Arendash et al., 2006), revelando ter influência na fosforilação da proteína tau (Duce e Bush, 2010). O cobre e o ferro participam nas reacções de Fenton, produzindo ROS responsáveis pelo aumento do stress oxidativo, que por sua vez levam à hiperfosforilação da proteína tau e à formação de emaranhados neurofibrilares (Zheng et al., 2010). Quando há a ligação de Fe^{3+} à proteína tau, esta experimenta uma mudança na sua configuração, o que pode provocar agregação (Duce e Bush, 2010). O Fe^{3+} promove a agregação da proteína tau hiperfosforilada. Contudo esta agregação pode sofrer uma inversão e ocorre a redução para Fe^{2+} . Este processo pode ser uma porta aberta para um possível tratamento com agentes redutores (Duce e Bush, 2010). Também a interacção da proteína tau com Cu^{2+} pode mediar a formação de H_2O_2 , responsável pelo stress oxidativo (Duce e Bush, 2010).

A PPA é muito abundante no cérebro, sendo uma proteína transmembranar, subdividida em vários domínios (Coenzyme Q10, 2010). No terminal-N há um domínio rico em cisteína que é o domínio do factor de crescimento (GFD, *Growth factor domain*) e um domínio de ligação ao cobre (CuBD, *Copper-binding domain*), no qual também se podem ligar outros metais como o ferro e o zinco (Marino et al., 2010). O péptido β A, como já foi referido, corresponde a um fragmento específico da PPA e está estritamente relacionado com o desenvolvimento de DA, tendo origem num processo

proteolítico realizado por β - e α -secretases (Coenzyme Q10, 2010). A agregação do β A leva à formação de placas senis, típicas da DA. Experiências revelam que, *in vitro*, vários metais provocam a sua agregação, logo é justificado o facto do núcleo das placas senis ser considerado um autêntico reservatório de metais, nomeadamente: cobre, 0,44 mM; ferro, 1 mM; zinco, 1 mM (Costa et al., 2008). O pH do meio é muito importante uma vez que influencia a agregação do β A induzida pelos biometais. Por exemplo, a agregação devido ao zinco ocorre rapidamente em pH entre 5,5 e 7,5 (pH fisiológico 7,4), mas a pH ligeiramente ácido (pH 6,8-7,0) induz a agregação tanto pelo cobre como pelo ferro (Duce e Bush, 2010).

A dimerização da PPA pode ser influenciada pela ligação PPA-Zn. Alterações nos níveis de cobre também interferem na PPA. Há também interações do ferro com a PPA, ao nível da regulação do RNAm da PPA. O processamento da PPA pode ser influenciado por metais, uma vez que α -, β - e γ -secretases são essenciais para o processamento da PPA. Estas secretases têm interações com diferentes espécies de metais (também afectam indirectamente a PPA) (Duce e Bush, 2010).

Os biometais como o cobre, o ferro e o zinco estão presentes em concentrações significativas no cérebro de doentes com DA, tanto associados como aos emaranhados neurofibrilares (Uranga et al., 2010). As placas senis são sujeitas a uma elevada acumulação de ferro, assim como acontece nos emaranhados neurofibrilares. Na DA, ocorre um aumento dos níveis de ferritina em detrimento dos níveis de transferrina que por sua vez diminuem (Duce e Bush, 2010). Estudos revelam que há um declínio no funcionamento mitocondrial provocado pela presença de ferro livre no meio, assim como há o aumento de danos na membrana citoplasmática. Contudo, também revelam que há o aumento de danos provocados pelos complexos β A-ferro ou β A-cobre em detrimento dos danos provocados apenas pelo β A ou pelos metais isoladamente (Uranga et al., 2010). O β A liga-se ao cobre e este promove a agregação do β A no cérebro de doentes com DA (Arendash et al., 2006; Coenzyme Q10, 2010). Ao agregar o excesso de cobre livre intracelular, o β A armazena temporariamente a sua toxicidade (Uranga et al., 2010). Por sua vez, o aumento da concentração de zinco na fenda sináptica é relevante na formação amilóide nos modelos transgénicos de DA. A IDE e a NEP são proteases da família das metalopeptidases de zinco. Logo, há a probabilidade de ambas

serem afectadas pelo metabolismo anormal do zinco. Estas proteases são responsáveis pela degradação de β A. A formação da placa senil pode ser reduzida, ou mesmo evitada, ao aumentar os níveis de IDE e NEP (Duce e Bush, 2010). O zinco liga-se ao β A através dos anéis imidazola da histidina no núcleo das placas senis (Marino et al., 2010). Vários estudos revelam que o cobre e o zinco têm afinidade para o péptido β A e que ambos se ligam aos mesmos resíduos do β A, logo competem pelo mesmo local, tendo o zinco maior relevância na rápida agregação do péptido do que o cobre, que por sua vez induz principalmente mudanças conformacionais do β A (Marino et al., 2010; Hoernke et al., 2010). A maioria das sinapses glutaminérgicas no córtex cerebral liberta zinco. O Zn^{2+} sináptico maximiza a oligomerização do β A (Arendash et al., 2006).

V. Tratamento da DA

O tratamento para a DA é tema comum de várias discussões e conferências universitárias com o fim de tentar encontrar uma terapia que seja eficaz. Neste âmbito há a considerar o stress oxidativo, disfunção sináptica, neurodegeneração e consequente produção do péptido β A. Já há conhecimento de que o péptido β A42 é o que apresenta maior toxicidade mesmo superior à do péptido β A40, e com maior propensão para originar uma cascata de auto-propagação. De acordo com este seguimento de ideias, a terapêutica poderá passar por ter como foco de atenção as enzimas que degradam a PPA, o próprio péptido β A, o desequilíbrio que se verifica ao nível da proteína tau ou mesmo todos os processos que são daí desencadeados e que depois levam à neurodegeneração (Duara et al., 2009). Actualmente não existe ainda nenhum tratamento definitivo para a DA. Contudo, a correlação linear entre os vários estágios da DA e o volume da estrutura cerebral sugerem que com intervenção terapêutica é possível impedir o progresso da patologia (Rauk, 2009; Silvestrelli et al., 2006). Para o tratamento da DA torna-se essencial conseguir inibir a formação de oligómeros (Duara et al., 2009).

5.1. Inibidores da acetilcolinesterase

Há a destacar princípios activos como o donepezilo, a rivastigmina e a galantamina que se encontram hoje em dia aprovados para terapêutica da DA (Dong et al., 2009; Molinuevo et al., 2009; Sugimoto, 2008).

O donepezilo (Aricept®) (Fig. 20) é um inibidor da AChE, enzima que degrada a acetilcolina ($\text{acetilcolina} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{colina} + \text{acetato}$) (Dong et al., 2009; Sugimoto, 2008), usado para o tratamento do défice cognitivo em diferentes níveis: leve, moderado e grave (Sugimoto, 2008). Os doentes que apresentam um menor défice cognitivo manifestam melhor resposta ao tratamento com donepezilo (Molinuevo et al., 2009). O donepezilo desempenha, por isso, uma acção de neuroprotecção que contraria a perda sináptica, visto diminuir a toxicidade de agregados de β A (Dong et al., 2009).

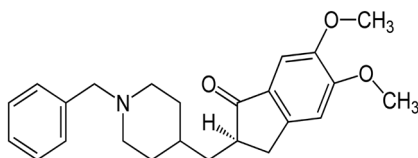


Fig. 20. Estrutura do donepezilo (Donepezil, 2010).

Constatou-se, a partir de uma experiência que durou 6 meses, com uma dose diária de 4 mg/kg, que os doentes de Alzheimer podem verdadeiramente beneficiar com a administração de donepezilo. Nesta experiência foi possível constatar uma diminuição significativa dos níveis do péptido β A solúvel e insolúvel no cérebro, prevenindo a perda da corrente sináptica. Não foi verificado qualquer indício na continuação da degeneração neuronal, situação frequentemente registada antes da toma de donepezilo, o que sugere que os inibidores de AChE conseguem regular ou interferir no metabolismo amiloide (Dong et al., 2009). Este composto revela facilidade em atravessar a barreira hematoencefálica e administra-se apenas uma vez ao dia. Revela também capacidade para poder potenciar o nível cognitivo nos doentes de Alzheimer e ser bem tolerado, sem hepatotoxicidade (Sugimoto, 2008). Com o despoletar da DA, havendo uma administração de donepezilo de imediato nos primeiros sintomas, é possível alcançar maior número de resultados benéficos, o que implica um rápido e eficaz diagnóstico nestes doentes (Molinuevo et al., 2009). Deste modo, o donepezilo consegue impedir a formação de agregados do péptido β A promovidos pela AChE. Contudo, revela eficácia apenas em elevadas concentrações. Quando ocorre administração de baixas doses, com períodos mais curtos de tratamento revela incapacidade para bloquear a actividade da AChE na agregação do péptido β A (Dong et al., 2009).

A técnica de reabilitação cognitiva, para melhorar a informação relativa à orientação (como o tempo, local e pessoas), revela grande utilidade para auxiliar no tratamento da DA, em associação ao donepezilo (Giordano et al., 2009). Os benefícios desta associação reflectem-se essencialmente no discurso e no poder de execução, visto que há uma estimulação cognitiva (Giordano et al., 2009; Molinuevo et al., 2009). Estes indícios sugerem que com este tratamento possa haver um atraso no declínio das capacidades funcionais e verbais. Com esta combinação é possível melhorar a atenção e progredir ao nível da orientação espacial e temporal. A estimulação cognitiva com esta

técnica tem reforçado os efeitos positivos do donepezilo. Contudo, caso termine esta associação da terapia com o donepezilo, as melhorias verificadas tendem a desaparecer, o que implica uma prática contínua desta associação (Giordano et al., 2009).

A rivastigmina (Prometax ®) (Fig. 21) actua essencialmente mantendo ou melhorando as capacidades de discurso, pensamento, memória e comportamento dos doentes (Wilson et al., 2008). Promove a neurotransmissão colinérgica com a diminuição da degradação da acetilcolina que é libertada por neurónios colinérgicos funcionalmente intactos (Eskander et al., 2005). A rivastigmina aumenta a disponibilidade de acetilcolina no hipocampo e no córtex (Cummings et al., 2005). É aconselhada para casos de DA com um desequilíbrio cognitivo moderado a grave, com maior efeito neuroprotector quando comparado com placebo (Ferris et al., 2009; Wilson et al., 2008). Reduz também a actividade da AChE o que contrapõe os baixos níveis de acetilcolina. A inibição da AChE pode constituir um factor preponderante para a diminuição da formação da PPA, evitando a formação de placas senis (Cummings et al., 2005; Eskander et al., 2005).

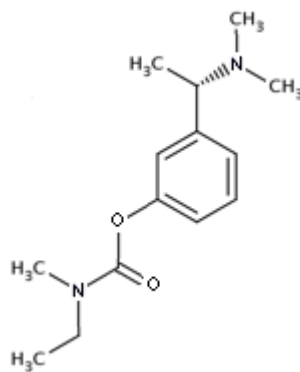


Fig. 21. Estrutura da rivastigmina (DrugBank: Showing Rivastigmine (DB00989), 2010)

A galantamina (Reminyl®) (Fig. 22) inibe de forma selectiva, competitiva e reversível a AChE, prevenindo a perda sináptica e modulando o processamento da PPA, útil para o tratamento sintomático leve a moderado da DA (Liu et al., 2010). Com a ligação a uma posição alostérica do receptor promove a acção da acetilcolina em receptores nicotínicos, reduzindo a morte neuronal e a formação doβA (Calciano et al., 2010; Liu et al., 2010). A galantamina surge também como uma possibilidade para o

tratamento da DA uma vez que inibe a agregação de β A(1-40) e β A(1-42), actuando como um inibidor β -amiloide (Liu et al., 2010; Vetrivel e Thinakaran, 2010).

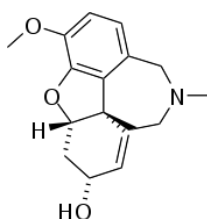


Fig. 22. Estrutura da galantamina (Wikimedia Commons, 2010).

Com um rastreio aleatório foi encontrado um derivado de N-benzilpiperazina (Fig. 23), com actividade de inibição da AChE. Contudo, substituindo o N-benzilpiperazina por N-benzilpiperizina, o poder de inibição da AChE aumenta consideravelmente. Esta actividade ainda pode ser aumentada caso na sua composição se troque o grupo éter por grupo amida. Vários estudos foram feitos neste sentido, contudo a baixa biodisponibilidade do composto final (um derivado de benzilsulfonil, com grande capacidade de inibição de acetilcolinesterase) não permitiu dar seguimento à inserção deste composto no mercado, não se chegando mesmo a fazer testes clínicos (Sugimoto, 2008).

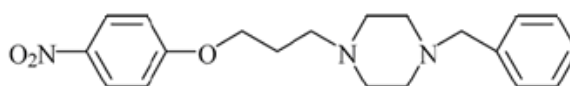


Fig. 23. Derivado de N-benzilpiperazina (Sugimoto, 2008).

Há vários fármacos que estão em desenvolvimento, entre eles, inibidores duplos de AChE-monoamini oxidase (MAO) ou da agregação AChE- β A. A actividade da MAO-B aumenta nas imediações das placas senis nos doentes com DA e aumenta os níveis de radicais livres que vão agravar o stress oxidativo. Alguns neurotransmissores como a dopamina, noradrenalina e serotonina diminuem nos doentes com DA. Contudo, a inibição de MAO A/B aumenta os níveis destes neurotransmissores. Exemplos destes

inibidores são a selegilina (inibidor selectivo de MAO-B), fisostigmina (ou tacrina, inibidor da AChE), entre outros (Zheng et al., 2010).

5.2. Antagonistas não competitivos do N-metil D-aspartato

A memantina (Ebixa®) (Fig. 24) é comercializada para o tratamento moderado e grave da DA com efeitos benéficos ao nível do discurso (Arif et al., 2009; Ferris et al., 2009; Wu and Chen, 2009). Este princípio activo é útil para melhorar ou pelo menos manter as capacidades de discurso em doentes com DA (Ferris et al., 2009).

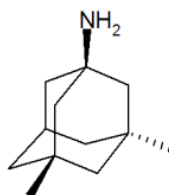


Fig. 24. Estrutura da memantina (Memantina | memantina.org, 2010).

A memantina tem demonstrado ter efeitos neuroprotectores com melhor tolerância no tratamento e maior eficácia do que os controlos placebo (Ferris et al., 2009). Na DA ocorre um distúrbio glutamatérgico o que acarreta desequilíbrio da função cognitiva e morte neuronal. A memantina previne a estimulação excessiva dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), impedindo o influxo prolongado de iões de cálcio, inibindo a toxicidade deste ião que pode contribuir para a DA (Fig. 25) (Wu e Chen, 2009). Restaura os níveis de glutamato fisiológico e as células da glia responsáveis pelo suporte e nutrição dos neurónios através da sua actividade antagonista nos receptores NMDA, o que promove um aumento da capacidade mnésica (Arif et al., 2009; Ferris et al., 2009; Wu e Chen, 2009). A memantina reduz apenas a excessiva estimulação dos receptores glutamérgicos NMDA não interferindo na normal transmissão neuronal (Ferris et al., 2009).

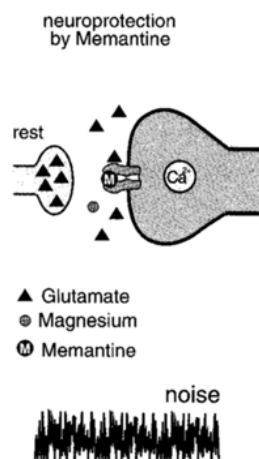


Fig. 25. Diminuição de distúrbios neurotóxicos com a regulação do receptor NMDA através do uso da memantina (Danysz et al., 2000).

Para além da interferência nos receptores NMDA a memantina também revela capacidade para prevenir a hiperfosforilação da proteína tau e o consequente metabolismo da PPA (Wu e Chen, 2009). A memantina previne a expressão da microglia, que através da sua capacidade fagocitária protege os neurónios, e da macroglia, como os astrócitos, que são relevantes para que a sinalização celular ocorra. Estudos recentes com ratos comprovam que a memantina acarreta melhorias comportamentais, com redução do β A (Arif et al., 2009).

5.3. Inibidores das β - e γ -secretases

Um objectivo farmacológico promissor envolve as β - e γ -secretases, que são enzimas proteolíticas que interferem na produção de β A, proporcionando a clivagem da PPA (Rauk, 2009; Sheng et al., 2009; Vetrivel e Thinakaran, 2010). Na terapia da DA as β - e γ -secretases assumem assim destaque, em particular na via amiloidogénica nos neurónios, que é despoletada pela BACE1 (ou β -secretase) (Donev et al., 2009).

Através de inibidores de secretases é possível prevenir a DA, inibindo a deposição do péptido β A (Donev et al., 2009). Inibidores de β -secretase demonstraram

conseguir inibir eficazmente a BACE1 *in vivo* e *in vitro* (Donev et al., 2009). Coloca-se, no entanto, o problema de a PPA não ser o único substrato envolvido (Rauk, 2009)

Como já foi referido, a γ -secretase é também uma protease que proporciona a clivagem da PPA, sendo o complexo desta protease formado por proteínas como PS1, PS2, PEN-2, APH-1 e nicastrina. Neste sentido, tem progredido a descoberta de inibidores de PS1 que possam assim revelar utilidade para a DA (Rauk, 2009). Vários inibidores de γ -secretase foram já testados. Contudo, uma forte inibição da γ -secretase leva a efeitos secundários muito graves, uma vez que interfere com a sinalização de proteínas e receptores da superfície celular (Sheng et al., 2009). O tratamento com inibidores de γ -secretase pode eventualmente provocar toxicidade gastrointestinal grave e também interferir com a maturação dos linfócitos T e B (Donev et al., 2009).

5.4. Antioxidantes

As moléculas antioxidantes reagindo quimicamente com radicais livres de oxigênio têm capacidade de os estabilizar. Neutralizam metais livres ou metais com ligações incorrectas, interferindo com a geração de ROS, revelando ter uma acção preventiva para a DA. É possível tirar partido destas propriedades dos antioxidantes através do vinho tinto, milho e aveia que possuem melatonina, das frutas cítricas e morangos que contêm vitamina C, dos espinafres, amêndoas, soja, abacate, sementes de girassol, alface e couve com vitamina E, das sementes e chá do ginkgo biloba, do açafraão onde é possível encontrar curcumina, das cerejas, soja, nozes e uvas que possuem flavonóides, e através dos estrogénios. Conseguem-se retirar proveito dos seus efeitos neuroprotectores contra a toxicidade induzida pelo péptido β A (Duce e Bush, 2010; Donev et al., 2009). Estudos recentes confirmam a importância dos antioxidantes, referindo que a vitamina E, quando associada com a vitamina C, retarda a DA, reduzindo efectivamente a incidência e prevalência da DA (Bonda et al., 2010).

Extractos de ginkgo biloba melhoram o funcionamento cerebral ao aumentar o fluxo sanguíneo, aumentam a libertação de PPA β , ajudando tanto no β defice cognitivo ligeiro, como no caso de doentes de Alzheimer. Mas nem sempre a ginkgo biloba revelou resultados positivos. É uma situação contraditória porque não apresenta efeitos

benéficos para a DA, ou mesmo em casos de defeito cognitivo ligeiro, ou no caso de demência em que a cognição se encontra normalizada (Donev et al., 2009; Rauk, 2009).

No interior da célula surge grande produção de radicais livres, ao nível das mitocôndrias. Um passo importante que aumentaria a eficácia do tratamento da DA seria a possibilidade de impedir os danos produzidos por estes radicais livres neste organelo. A coenzima Q10 (Fig. 26) revela capacidade para proteger contra danos provocados pelo stress oxidativo, apresentando, contudo, inconvenientes. A coenzima Q10 com uma dose de 6,5 μ M desempenha um papel neuroprotectivo na DA, visto que atenua a possível disfunção mitocondrial. Apesar de prevenir a neurotoxicidade proveniente de radicais livres como o H_2O_2 , apresenta dificuldade para atravessar a barreira hematoencefálica (Bonda et al., 2010).

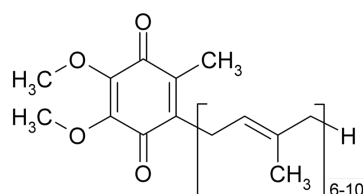


Fig. 26. Estrutura da coenzima Q10 (Coenzyme Q10, 2010).

Os polifenóis e em particular o resveratrol (também inibidor da BACE1) (Fig. 27) são facilmente encontrados na constituição de vinhos tintos e em frutas que actuam como importantes antioxidantes que regulam a saúde. Revelam poder para desestabilizar as fibrilas e agregados do péptido β A, prevenindo e/ou atrasando o processo neurodegenerativo associado à DA (Feng et al., 2009; Rauk, 2009). É, por isso, sugerido que um consumo moderado de vinho tinto possa contribuir para protecção contra a DA, atenuando a deterioração cognitiva e a neuropatologia amiloide. O resveratrol exerce um importante papel para a diminuição dos níveis do péptido β A, com particular efeito para o β A42 (Feng et al., 2009).

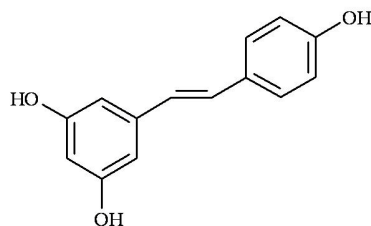


Fig. 27. Estrutura do resveratrol (Phytochemicals as Nutraceuticals, 2010).

O resveratrol apresenta afinidade para se ligar ao β A através de interações hidrofóbicas que surgem na região hidrofóbica do β A42, e é dessa forma que depois bloqueia a associação entre vários péptidos β A, impedindo a formação de agregados e de fibrilas. Estas interações acontecem também por influência das ligações de hidrogénio estabelecidas através do grupo hidroxilo presente nos anéis fenólicos do resveratrol. Dessa forma, o resveratrol vai-se estabelecendo de forma alternada na estrutura dos agregados de β A e assim potencia a sua desagregação. Contudo, apesar de toda a informação já recolhida e estudada, o mecanismo exacto pelo qual o resveratrol exerce efeitos de neuroprotecção continua ainda por esclarecer (Feng et al., 2009).

5.5. Quelantes de metais

Estes compostos apresentam capacidade para se ligarem a vários iões metálicos e dessa forma proporcionam no organismo a deplecção desses metais. São usados para proteger culturas neuronais da toxicidade β A (Duce e Bush, 2010). A utilização de quelantes no tratamento da DA deve ter em atenção que estes devem atravessar a barreira hematoencefálica para escolher selectivamente o alvo metálico no cérebro, não devem alterar o equilíbrio homeostático no organismo e devem possuir adequada afinidade para os iões metálicos, para poderem remover do cérebro os iões que influenciam a DA. Os quelantes actuam na DA quelatando os metais e dissolvendo o β A. Mas também activam os percursos de sinalização de neuroprotectores das células (Zheng et al., 2010).

A 3-metalotioneína (3-MT) (Fig. 28) surge com propriedades quelantes. O mecanismo consiste em sequestrar o íon cobre do péptido α e dessa forma reduzir a neurodegeneração (Duce and Bush, 2010).

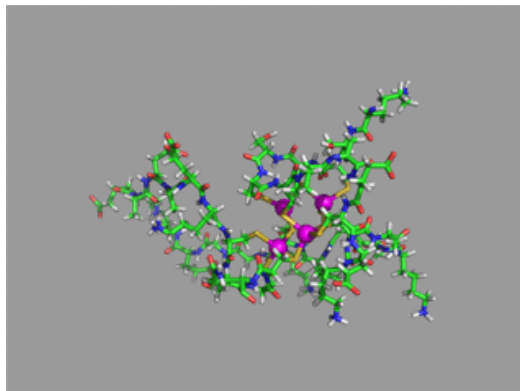


Fig. 28. 3-MT (Dr. H. Z. Sun Lab, 2010).

A MT é uma família de proteínas de baixo peso molecular, ricas em cisteína. Existem várias isoformas de MT que revelam capacidade de ligação a metais. É, contudo, a 3-MT que apresenta maior capacidade de ligação para os metais e resistência contra proteólises, sendo indicada para a neuropatologia da DA (Palumaa et al., 2005). A 3-MT revela potencial para combater os níveis de toxicidade e para contribuir para a neuroprotecção, sendo importante para casos de distúrbios em doenças neurodegenerativas e regenera também as funções cognitivas (West et al., 2008).

A desferrioxamina (Fig. 29) tem também propriedades quelantes, ligando-se ao alumínio, cobre, ferro e zinco. Foi a primeira molécula medicinal testada para o tratamento da DA (Duce and Bush, 2010; Shaal et al., 2007). Demonstra efeitos benéficos com redução do stress oxidativo, com carácter inibitório de radicais livres (Shaal et al., 2007). Apresenta, contudo, características muito hidrofílicas, não possuindo biodisponibilidade oral aceitável, e da mesma forma não consegue penetrar eficazmente a barreira hematoencefálica (Duce and Bush, 2010).

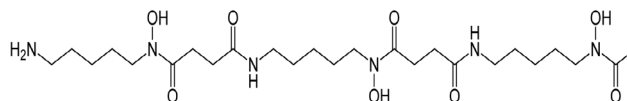


Fig. 29. Desferrioxamina (Wikipedia, the free encyclopedia, 2010).

Quelantes de metais têm sido experimentados em ratos com DA, com sucesso variável. O quelante hexadentado DP-109, derivado do BAPTA (ácido 1,2-bis(2-aminofeniloxi)etano-*N,N,N',N'*-tetra acético), administrado por via oral durante 3 meses, reduziu os níveis de agregados β A insolúvel nas placas amiloides formadas. No entanto, não atravessa facilmente a barreira hematoencefálica. Surge o DP-460, outro derivado diéster do BAPTA, que é um quelante de metal que se liga preferencialmente ao cálcio, cobre e zinco. Acompanhado do DP-109 registam características neuroprotetivas em modelos de esclerose lateral amiotrófica ou doença de Charcot, que é também uma outra doença neurodegenerativa associada ao desequilíbrio de metais (Duce e Bush, 2010; Lee et al., 2004). Os quelantes de metais têm um grande potencial para o tratamento da DA. Contudo, têm poucos alvos e baixa permeabilidade para o cérebro. Os quelantes podem bloquear a formação de ROS e inibir a agregação de β A (Zheng et al., 2010).

Com um fármaco de nome clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina) (Fig. 30) será possível inibir a oligomerização (Duara et al., 2009).

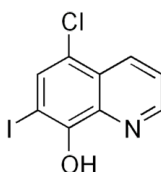


Fig. 30. Estrutura do clioquinol (Wikipedia, the free encyclopedia, 2010).

Estudos recentes revelam que o clioquinol tem a capacidade de quelar o cobre e o zinco das placas senis e da fenda sináptica, fazendo com que estes entrem nas células. O aumento de cobre intracelular provoca a diminuição da fosforilação da proteína tau e atenua o déficit cognitivo (Zheng et al., 2010). Esta acção torna-se importante porque de

acordo com observações feitas em doentes de Alzheimer, entende-se que este tipo de doença pode estar também relacionada com um excesso no ião cobre (Rauk, 2009). O clioquinol tem características altamente lipofílicas, sendo rapidamente absorvido, e a sua excreção é facilitada com a sua conversão em metabolitos, principalmente sob a forma de glucuronídeo, e em menor extensão na forma de sulfato. O tratamento oral com clioquinol em ratos com DA demonstrou que houve redução da deposição amilóide, sustentando a capacidade deste composto para dissolver o péptido β A. Demonstrou ser eficiente a atravessar a barreira hematoencefálica. Apresenta apenas afinidade moderada para os iões cobre e zinco, sendo eficiente para provocar a dissociação destes iões metálicos dos sítios de ligação do péptido β A. Reduz a oligomerização β A de modo a facilitar o processo sináptico. Contudo, outros estudos referem que o clioquinol tem capacidade de aumentar a neurotoxicidade oxidativa. Em certos estudos o clioquinol revelou diminuir a fosforilação da proteína tau, sem efeito na diminuição do β A42 no líquido cefalorraquidiano (LCR) (Duce e Bush, 2010).

Para melhorar as propriedades do clioquinol optou-se por o reformular para se obter 8-hidroxiquinolina (PBT2). Este derivado do clioquinol não tem iodo na sua estrutura e é mais facilmente sintetizado (Duara et al., 2009; Duce e Bush, 2010). Ambos têm mecanismo de acção ainda por esclarecer. Contudo, o PBT2 demonstra ter maior solubilidade e maior permeabilidade para a barreira hematoencefálica do que o clioquinol (Duce e Bush, 2010). Com níveis superiores de penetração e farmacocinética no cérebro, o PBT2 inibe em maior extensão a oligomerização β A, diminui a concentração de placas e reduz a perda basal de células dendríticas (Duara et al., 2009). Num estudo com ratos, o PBT2 comprovou ter eficácia na diminuição do β A solúvel e insolúvel num curto intervalo de tempo com a possibilidade de aumentar o rendimento cognitivo para níveis semelhantes aos anteriores ou para valores acrescidos (Duce e Bush, 2010).

Outros agentes quelantes têm sido estudados e verificam-se diferentes intensidades do seu efeito, no que refere ao stress oxidativo induzido pelo β A42, bem como na solubilização da proteína tau hipofosforilada e na diminuição do β A no cérebro (Duce e Bush, 2010). Será necessário fazer mais estudos *in vivo* neste âmbito para poder progredir com sucesso nesta via terapêutica (Duce e Bush, 2010).

5.6. Compostos não peptídeos

Existem compostos como o R-flurbiprofeno, tramiprosato, caprospinol e azul de metileno, que são compostos não peptídeos que surgem também com o objectivo de diminuir os níveis do péptido β A42, embora ainda não comercializados (Donev et al., 2009; 37; Rauk, 2009).

O R-flurbiprofeno (Flurizan) (Fig. 31) actua reduzindo os níveis de β A42, modulando a clivagem efectuada pela γ -secretase, com registo de melhorias ao nível cognitivo (Alzheimer's Association Update, 2007; Piau et al., 2010).

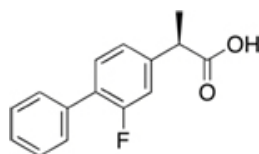


Fig. 31. R-flurbiprofeno (Drugs for Alzheimer's Disease, Consultado em 3 de Fevereiro de 2010).

O tramiprosato (Alzhemed) (Fig. 32) tem a capacidade para estabelecer directamente ligação com o péptido β A, inibindo a consequente formação de fibrilas e placas senis. Regista efeito na redução do β A ao nível do cérebro e níveis plasmáticos. A administração de tramiprosato por um longo período tem-se revelado segura e bem tolerada (Alzheimer's Association Update, 2007; Piau et al., 2010).

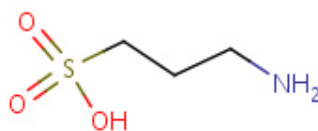


Fig. 32. Tramiprosato (Research chemical suppliers, catalogs and a searchable molecule database – MolPort, 2010).

O caprospinol (SP-233) (Fig. 33) tem a capacidade de estabelecer ligação com o péptido β A, o que por sua vez inibe a sua possível agregação (Rauk, 2009). Num estudo em que se utilizaram ratos, avaliou-se o efeito e a eficácia do tratamento com caprospinol. Os resultados foram positivos, havendo inibição satisfatória da formação de oligómeros amilóides neurotóxicos. Demonstrou-se que o caprospinol atenua os desequilíbrios cognitivos que afectam a memória. Verificou-se uma diminuição de agregados amilóides, assim como uma diminuição da hiperfosforilação da proteína tau e redução da neurodegeneração. Tem capacidade para transpor a barreira hematoencefálica e a sua biodisponibilidade relaciona-se com a dose e o tempo de administração (Lecanu et al., 2010).

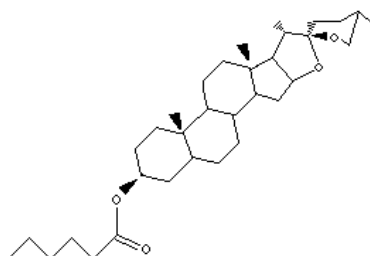


Fig. 33. Caprospinol (Rauk, 2009).

O azul de metileno (Rember) (Fig. 34) demonstra capacidade para retardar a progressão da DA. Quando comparado com um controlo-placebo, revela ser eficaz ao melhorar a capacidade cognitiva (Maccioni et al., 2010). Este composto potencia a inibição da hiperfosforilação da proteína tau, impedindo que essas proteínas formem grandes agregados e comuniquem, impedindo também a agregação do péptido β A (Neugroschl et al., 2009; Rauk, 2009).

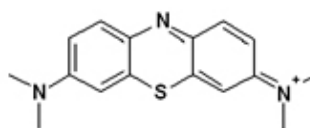


Fig. 34 Azul de metileno (Drugs for Alzheimer's Disease, 2010).

5.7. Outros fármacos

Existem fármacos que mesmo que não sejam produzidos directamente com o objectivo de retardar a DA, como os fármacos que são prescritos para baixar os níveis de colesterol, exibem também eficácia na redução do risco da DA. Neste campo é possível referir a sinvastatina que tem capacidade para atravessar a barreira hematoencefálica, demonstrando eficácia contra a progressão da doença (Rauk, 2009).

Devido à associação de problemas cerebrovasculares à DA, não surpreende então que fármacos que diminuam a pressão sanguínea possam ter um papel preventivo para esta. Existe concordância que o uso a longo prazo de anti-hipertensivos tem efeitos benéficos na redução da probabilidade da DA (Rauk, 2009).

A NEP (Fig. 35), protease importante que impede a agregação de β A, está inversamente relacionada com a idade. Com o avançar da idade regista-se uma diminuição dos níveis desta protease. Por sua vez, o aumento desta protease associa-se a uma diminuição no cérebro dos níveis do péptido β A. Torna-se, por isso, importante estimular a actividade da NEP. Com recurso a esta protease é possível reduzir a toxicidade provocada pelo péptido β A, pelo que a protease condiciona o péptido à forma de monómero, prevenindo a sua oligomerização (Rauk, 2009).

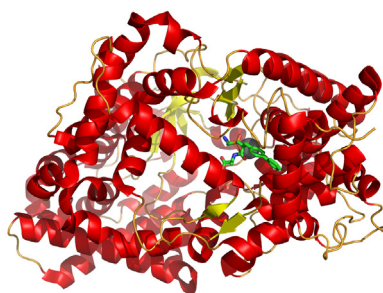


Fig. 35. Representação da NEP (Wikimedia Commons, 2010).

O tratamento com anticorpos tem assumido importância crescente visto que a sua actuação é direccionada para as formas monoméricas e oligoméricas, conseguindo diminuir a toxicidade do péptido β A. Contudo, o efeito adverso mais relevante está

associado ao enfraquecimento do sistema imunitário que é fundamental como defesa do organismo e no reconhecimento de agentes agressores. Este facto, juntamente com a demonstração de não atravessar facilmente a barreira hematoencefálica, constitui um grande obstáculo ao seu uso (Rauk, 2009).

VI. Conclusão

Nos últimos anos as doenças neurodegenerativas, como a DA, têm tomado um lugar de extrema relevância, com dimensões mundiais, no que toca à saúde. A demência, como consequência da DA, pode ser considerada um grave problema de saúde pública. A idade, o stress oxidativo e a acumulação de metais no cérebro são os principais factores envolvidos na etiologia da DA.

A DA é uma doença com um início insidioso e declínio progressivo, comprometendo a cognição e o comportamento. O reconhecimento crescente da ocorrência de declínio cognitivo aponta para a necessidade de avaliações precoces sensíveis para que se instituem programas de intervenção específicos. A idade avançada e a genética revelam ser os factores de vulnerabilidade inevitáveis. Os factores de risco vascular e determinadas doenças são agentes de vulnerabilidade evitáveis. A educação, o exercício mental e físico são potenciais factores de protecção. A identificação dos vários factores apontam caminhos adicionais de intervenção. A sobrecarga que a doença acarreta para os cuidadores é considerável, com impacto familiar, económico e na saúde. A intervenção com a família não deve, por isso, ser negligenciada.

É importante monitorizar a saúde e condições socioeconómicas dos idosos com impacto na resposta social, assim como avaliar a ausência ou presença de défice cognitivo ligeiro ou demência de Alzheimer, identificando os factores de risco e de protecção. Mapear sinais cognitivos, comportamentais e emocionais precoces, que indiquem a possibilidade de declínio ou de demência, são essenciais para um tratamento precoce.

A DA é caracterizada essencialmente pela presença de placas senis e emaranhados neurofibrilares, consequência da hiperfosforilação da proteína tau. Sendo um dos principais responsáveis pela DA, o péptido β A é o resultado do processamento da PPA, uma proteína membranar que existe dispersa por todo o cérebro. A α - e γ -secretases são os complexos proteicos responsáveis pelo processamento da PPA em β A.

O colesterol está relacionado com a DA como um factor de risco, uma vez que aumenta os níveis de β A e de stress oxidativo. A cafeína devido às suas características antioxidantes pode, por sua vez, prevenir a degeneração dos neurónios, reduzindo o declínio cognitivo mesmo em indivíduos sem demência, especialmente em idades avançadas. Deve ser uma substância a ser inserida na dieta e ser promovido o seu consumo diário moderado ao longo da idade adulta.

Os iões metálicos participam no metabolismo celular e são úteis para o bom funcionamento dos seres vivos ao nível da mnésica, neurotransmissão, actividades enzimáticas, funções mitocondriais e desenvolvimento. É de maior importância que as suas concentrações sejam bem controladas por causa da sua actividade redox que poderá contribuir para a produção de radicais livres que podem reagir com diversos substratos orgânicos gerando assim um aumento dos níveis do stress oxidativo. A alteração da sua homeostasia pode levar a variados estados de doença. Existem para isso mecanismos celulares que regulam as concentrações destes iões metálicos, mas quando há ruptura neste controlo ocorrem vários eventos em cascata ao nível da disfunção mitocondrial e do stress oxidativo. Ocorre uma dependência no metabolismo dos iões metálicos e a regulação da sua homeostasia que causa alterações na DA. Há registo de interacção entre os biometais e o péptido β A, revelando grande importância na patogénese da DA. As interacções entre estes iões metálicos e β A alteram o nível de precipitação deste péptido e da sua toxicidade.

A heterogeneidade clínica da DA e a sua relação com os variados metais foi o objectivo central deste estudo. É fascinante e um desafio irrecusável explorar este tema. Os metais desempenham um factor de risco para a DA. Os metais biológicos representam um alvo potente para a manipulação farmacológica limitar e até mesmo impedir a progressão da DA. As questões de especificidade e selectividade são factores relevantes quando se define um alvo terapêutico e requer, por isso, atenção e cuidado para realizar considerações fidedignas ao testar modelos experimentais. O melhor entendimento molecular da homeostase dos metais e o processo de regulação celular são essenciais para assim conseguir identificar e perceber melhor as causas da doença, possibilitando um melhor diagnóstico e tratamento.

Não existe consenso sobre um único alvo patogénico a ser tratado na DA, havendo o pressuposto que um tratamento com resultados efectivos irá precisar de conseguir atacar os vários alvos patofisiológicos. Deste modo, entende-se que é necessário haver acção sobre os agregados β A, emaranhados neurofibrilares provenientes da hiperfosforilação da proteína tau, perda neuronal e sináptica, bem como todos os mecanismos que promovem a deposição do péptido β -amilóide.

Quanto mais se conhecer sobre os mecanismos patofisiológicos da doença maior será a possibilidade de se encontrarem novos fármacos que venham a evitar a progressão da doença e, porque não, a sua cura.

VII. Bibliografia

- Alzheimer's Association Home Page. [Em linha]. Disponível em http://www.alz.org/alzheimers_disease_facts_figures.asp. [Consultado em 28 Dezembro de 2009].
- Alzheimer's Association Update. (2007). *Alzheimer's & Dementia*, 3, pp. 449-452.
- Alzheimer Portugal. [Em linha]. Disponível em <http://www.alzheimerportugal.org/scid/webAZprt/defaultCategoryViewOne.asp?categoryID=898>. [Consultado em 20 Janeiro de 2010].
- Arendash, G., W., et al. (2006). Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain β -amyloid production. *Neuroscience*, 142, pp. 941-952.
- Arya, U., et al. (2009). Reserpine ameliorates A β toxicity in the Alzheimer's disease model in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology*, 44, pp. 462-466.
- Barnham, K., Bush, A. (2008). Metals in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Chemical Biology*, 12, pp. 222-228.
- Beel, A., J., et al. (2010). Direct binding of cholesterol to the amyloid precursor protein: An important interaction in lipid-Alzheimer's disease relationships?. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1801, pp. 975-982.
- Bonda, D., J., et al. (2010). Oxidative stress in Alzheimer disease: A possibility for prevention. *Neuropharmacology*, 59, pp. 290-294.

- Botton, P., H., et al. (2010). Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. *Behavioural Brain Research*, 214, pp. 254-259.
- Cafeína | Informação Nutricional. [Em linha]. Disponível em <http://www.informacaonutricional.net/nutricao/cafeina/>. [Consultado em 29 Março de 2010].
- Castro-Caldas, A., Mendonça, A. (2005). *A doença de Alzheimer e outras demências em Portugal*. Lisboa, Lidel.
- Coenzyme Q10 – Benefits and Side Effects – Unbiased Evidence for use in chronic fatigue syndrom. [Em linha]. Disponível em <http://www.natural-remedies-review.com/coenzyme-q10.html>. [Consultado em 4 de Abril de 2010].
- Contestabile, A. (2010). The history of the cholinergic hypothesis. *Behavioural Brain Research*, no prelo.
- Costa, M., S., et al. (2008). Caffeine prevents age-associated recognition memory decline and changes brain-derived neurotrophic factor and tirosine kinase receptor (TrKB) content in mice. *Neuroscience*, 153, pp. 1071-1078.
- Chauhan, V., Chauhan, A. (2006). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Pathophysiology*, 13, pp. 195–208.
- Cummings, J., L., et al. (2005). Effects of Rivastigmine Treatment on the Neuropsychiatric and Behavioral Disturbances of Nursing Home Residents with Moderate to Severe Probable Alzheimer's Disease: A 26-Week, Multicenter, Open-Label Study. *The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy*, 3(3), pp. 137-148.

- Danysz, W., et al. (2000). Neuroprotective and Symptomatological Action of Memantine Relevant for Alzheimer's Disease – A Unified Glutamatergic Hypothesis on the Mechanism of Action. *Neurotoxicity Research*, 2, pp. 85-97.
- Devlin, T., M. (2002). *Textbook of Biochemistry*. 5ª Edição. New York, Wiley-Liss, pp. 1056-1057.
- Duara, R., et al. (2009). The basis for disease-modifying treatments for Alzheimer's disease: The sixth Annual Mild Cognitive Impairment Symposium. *Alzheimer's & Dementia*, 5, pp. 66-74.
- Duce, J., A., Bush, A., I. (2010). Biological metals and Alzheimer's disease: Implications for therapeutics and diagnostics. *Progress in Neurobiology*, 92, pp. 1-18.
- Doença De Alzheimer e Tratamento Fisioterápico. [Em linha]. Disponível em http://2.bp.blogspot.com/_Fw4Cp_hfKgQ/SSE7zQ2xYEI/AAAAAAAAAVc/-9YfwR445Pg/s400/alzheimer2.jpg. [Consultado em 11 de Janeiro de 2010].
- Donepezil (120014-06-4). [Em linha]. Disponível em [http://www.cerrison.com/Donepezil%20\(120014-06-4\).html](http://www.cerrison.com/Donepezil%20(120014-06-4).html). [Consultado em 20 de Fevereiro de 2010].
- Donev, R., et al. (2009). Neuronal death in Alzheimer's disease and therapeutic opportunities. *Cellular and Molecular Medicine*, 13, pp. 11-12.
- Dong, H., et al. (2009). Effects of donepezil on amyloid- β and synapse density in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Research*, 1303, pp. 169-178.

- Dr. H. Z. Sun Lab. [Em linha]. Disponível em <http://chem.hku.hk/~chemhome/staff/hzsun/labpage/research.html>. [Consultado em 2 de Fevereiro de 2010].
- DrugBank: Showing Rivastigmine (DB00989). [Em linha]. Disponível em <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00989>. [Consultado em 4 de Julho].
- Drugs for Alzheimer's Disease. [Em linha]. Disponível em http://www.edinformatics.com/news/alzheimers_drugs.htm. [Consultado em 3 de Fevereiro de 2010].
- Drugs for Alzheimer's Disease. [Em linha]. Disponível em http://www.edinformatics.com/news/alzheimers_drugs.htm. [Consultado em 2 de Fevereiro de 2010].
- Early-onset Alzheimer's disease: Facts, Discussion Forum, and Encyclopedia Article. [Em linha]. Disponível em http://www.absoluteastronomy.com/topics/Early-onset_Alzheimer's_disease. [Consultado em 4 de Fevereiro de 2010].
- Eskander, M., F., et al. (2005). Rivastigmine is a potent inhibitor of acetyl- and butyrylcholinesterase in Alzheimer's plaques and tangles. *Brain Research*, 1060, pp. 144-152.
- Feng, Y., et al. (2009). Resveratrol inhibits beta-amyloid oligomeric cytotoxicity but does not prevent oligomer formation. *NeuroToxicology*, 30, pp. 986-995.
- Ferris, S., et al. (2009). Effects of Gender on Response to Treatment With Rivastigmine in Mild Cognitive Impairment: A Post Hoc Statistical Modeling Approach. *Gender Medicine*, 6(2), pp. 345-355.

- Fehlbauer-Beurdeley, P., et al. (2010). Toward an Alzheimer's disease diagnosis via high-resolution blood gene expression. *Alzheimer's & Dementia*, 6, pp. 25-38.
- Figure 1: Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease: *Nature Reviews Neuroscience*. [Em linha]. Disponível em http://www.nature.com/nrn/journal/v8/n7/fig_tab/nrn2168_F1.html. [Consultado em 12 de Fevereiro de 2010].
- Findeis, M. (2007). The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 116, pp. 266-286.
- Genetics: 200 family members having dementia-mutation studied for 13 years | *Neurological Correlates*. [Em linha]. Disponível em <http://neurologicalcorrelates.com/wordpress/2008/01/16/genetics-200-family-members-having-dementia-mutation-studied-for-13-years/>. [Consultado em 7 de Março de 2010].
- Genetics | Association for Frontotemporal Dementias. [Em linha]. Disponível em <http://www.ftd-picks.org/frontotemporal-dementias/genetics>. [Consultado em 14 de Março de 2010].
- Giordano, M., et al. (2009). Combination of intensive cognitive rehabilitation and donepezil therapy in Alzheimer's disease (AD). *Archives of Gerontology and Geriatrics*, no prelo.
- Gonzalez, D., et al. (2009). Analysis of SPECT brain images for the diagnosis of Alzheimer's disease using moments and support vector machines. *Neuroscience Letters*, 461, pp. 60-64.
- Hampel, H., et al. (2009). Biological markers of amyloid β -related mechanisms in Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*, no prelo.

- Hermann, D., et al. (2009). Synaptic Transmission is impaired prior to plaque formation in amyloid precursor protein-overexpressing mice without altering behaviorallt-correlated sharp wave-ripple complexes. *Neuroscience*, 162, pp. 1081-1090.
- Hoernke, M., et al. (2010). Influence of the hydrophobic interface and transition metal ions on the conformation of amyloidogenic model peptides. *Biophysical Chemistry*, 150, pp. 64-72.
- Hureau, C., Faller, P. (2009). A β -mediated ROS production by Cu ions: Structural insights, mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochimie*, 91, pp. 1212-1217.
- Hureau, C., et al. (2010). Two Functions, One Molecule: A Metal-Binding and a Targeting Moiety to Combat Alzheimer's Disease. *ChemBioChem*, 11, pp. 950-953.
- Kada, S. (2010). Radiographers' attitudes towards persons with dementia. *European Journal of Radiography*, xx, pp. 1-6.
- Knels, C., Danek, A. (2010). Loss of word-meaning with spared object semantics in a case of mixed primary progressive aphasia. *Brain & Language*, 113, pp. 96-100.
- Kozlowski, H., et al. (2009). Copper, iron, and zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport, distribution and regulatioin). *Coordination Chemistry Reviews*, 253, pp. 2665-2685.
- Koolman, J., Roehn, K., H. (2005). *Color Atlas of Biochemistry*. 2^a Edição. New York, Editora Thieme, pp. 286-287.

- Lecanu, L., et al. (2010). Caprospinol reduces amyloid deposits and improves cognitive function in a rat model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 165, pp. 427-435.
- Lee, J., Y., et al. (2004). The lipophilic metal chelator DP-109 reduces amyloid pathology in brains of human β -amyloid precursor protein transgenic mice. *Neurobiology of Aging*, 25, pp.1315-1321.
- Liu, G., et al. (2009). Nanoparticle-chelator conjugates as inhibitors of amyloid- β aggregation and neurotoxicity: A novel therapeutic approach for Alzheimer disease. *Neuroscience Letters*, 455, pp. 187-190.
- Maccioni, R., B., et al. (2010). The Revitalized Tau Hypothesis on Alzheimer's Disease. *Archives of Medical Research*, 41, pp. 226-231.
- Marino, T., etl al. (2010). On the Metal Ion (Zn^{2+} , Cu^{2+}) Coordination eith Beta-Amyloid Peptide: DFT Computational Study. *Interdiscip Sci Comput Life Sci*, 2, pp. 57-60.
- Maslow, K. (2010). 2010 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 6, pp. 158-194.
- Maynard, C., et al. (2006). Gender and genetic background effects on brain metal levels in APP transgenic and normal mice: Implications for Alzheimer β -amyloid pathology. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100, pp. 952-962.
- McGuinness, B., et al. (2010). Apolipoprotein ξ 4 and neuropsychological pergormance in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neuroscience Letters*, no prelo.

- Mecanismo de acción de la noradrenalina. [Em linha]. Disponível em http://www.noradrenalina.com/mecanismo_de_accin_de_la_noradrenalina. [Consultado em 28 Maio de 2010].
- Memantina | memantina.org. [Em linha]. Disponível em <http://memantina.org/new/taxonomy/term/2/0>. [Consultado em 28 Julho de 2010].
- Molinuevo, J., L., et al. (2009). Donepezil provides greater benefits in mild compared to moderate Alzheimer's disease: Implications for early diagnosis and treatment. Archives of Gerontology and Geriatrics, no prelo.
- Morelli, M., Simola, N. (2010). Can dietary substances protect against Parkinson's disease? The case of caffeine. Experimental Neurology, 225, pp. 246-249.
- Neugroschl, J., et al. (2009). An Update on Treatment and Prevention Strategies for Alzheimer's Disease. Current Neurology and Neuroscience Reports, 9, pp. 368-376.
- Novas...Um pouco do saber para todos: DOENÇA DOS PÉZINHOS. [Em linha]. Disponível em http://www.novas.blogspot.com/2010/06/doenca-dos-pezinhos_17.html. [Consultado em 24 de Março de 2010].
- Palumaa, P., et al. (2005). Metal binding of metallothionein-3 versus metallothionein-2 lower affinity and higher plasticity. Biochimica et Biophysica Acta, 1747, pp. 205-211.
- Perez, J., et al. (2010). Soluble oligomeric forms of beta-amyloid (A β) peptide stimulate β A production via astrogliosis in the rat brain. Experimental Neurology, 223, pp. 410-421.

- Phytochemicals as Nutraceuticals. [Em linha]. Disponível em <http://www.benbest.com/nutrceut/phytochemicals.html>. [Consultado em 28 de Março de 2010].
- Piau, A., et al. 2010. Progress in the development of new drugs in Alzheimer's disease. The Journal of Nutrition, Health & Aging, no prelo.
- Pimplikar, S., W. (2009). Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 41, pp. 1261-1268.
- Pitt, J., et al. (2009). Alzheimer's-associated A β oligomers show altered structure, immunoreactivity and synaptotoxicity with low doses of oleocanthal. Toxicology and Applied Pharmacology, 240, pp. 189-197.
- Prasanthi, J., R., P., et al. (2010). Caffeine protects against oxidative stress and Alzheimer's disease-like pathology in rabbit hippocampus induced by cholesterol-enriched diet. Free Radical Biology & Medicine, 49, pp. 1212-1220.
- Prostanoids. [Em linha]. Disponível em <http://www.cyberlipid.org/prost1/pros0001.htm>. [Consultado em 22 de Março de 2010].
- Rauk, A. (2009). The chemistry of Alzheimer's disease. Chemical Society Reviews, 38, pp. 2698-2715.
- Ray, B., et al. (2010). Memantine treatment decreases levels of secreted Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) and amyloid beta (A β) peptide in the human neuroblastoma cells. Neuroscience Letters, 470, pp. 1-5.
- Research chemical suppliers, catalogs and a searchable molecule database - MolPort. [Em linha]. Disponível em <http://www.molport.com/buy->

[chemicals/moleculelink/3-aminopropane-1-sulfonic-acid/1792142](http://chemicals.moleculelink.com/3-aminopropane-1-sulfonic-acid/1792142). [Consultado em 28 de Março de 2010].

- Rinaldi, M., C., et al. (2010). Lack of awareness of spatial and verbal constructive apraxia. *Neuropsychologia*, 48, pp. 1574-1582.
- Rivera-Mancía, S., et al. (2010). The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. *Chemico-Biological Interactions*, no prelo.
- Salay, L., et al. (2009). Membrane interactions of a self-assembling model peptide that mimics the self association, structure and toxicity of A β (1-40). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788, pp. 1714-1721.
- Silva, R., S., et al. (2008). Maternal caffeine intake affects acetylcholinesterase in hippocampus of neonate rats. *Developmental Neuroscience*, 26, pp. 339-343.
- Silvestrelli, G., et al. (2006). Treatment of Alzheimer's disease: From pharmacology to a better understanding of disease pathophysiology. *Mechanisms of Ageing and Development*, 127, pp. 148-157.
- Struzynska, L. (2009). A glutamatergic component of lead toxicity in adult brain: The role of astrocytic glutamate transporters. *Neurochemistry International*, 55, pp. 151-156.
- Strozyk, D., et al. (2009). Zinc and copper modulate Alzheimer A β levels in human cerebrospinal fluid. *Neurobiology of Aging*, 30, pp. 1069-1077.
- Sugimoto, H., (2008). The new approach in development of Anti-Alzheimer's disease drugs via the cholinergic hypothesis, *Chemico-Biological Interactions*, 175, pp. 204-208.

- Shaal, S., et al. (2007). Desferrioxamine and zinc-desferrioxamine reduce lens oxidative damage. *Experimental Eye Research*, 84, pp. 561-568.
- Sheng, B., et al. (2009). Inhibition of γ -secretase activity reduces BA production, reduces oxidative stress, increases mitochondrial activity and leads to reduced vulnerability to apoptosis: Implications for the treatment of Alzheimer's disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 46, pp. 1362-1375.
- The Dementia Dozin: Foods to Avoid « Fire Earth. [Em linha]. Disponível em <http://feww.wordpress.com/2009/12/21/the-dementia-dozen-foods-to-avoid/>. [Consultado em 27 de Fevereiro de 2010].
- Uranga, R., M., et al. (2010). Effect of transition metals in synaptic damage induced by amyloid beta peptide. *Neuroscience*, 170, pp. 381-389.
- Valenzuela, R., et al. (2008). Copper catechol-driven Fenton reactions and their potencial role in Word degradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61, pp. 345-350.
- Van Beek, A., H., E., A., Claassen, J., A., H., R. (2010). The cerebrovascular role of the cholinergic neural system in Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, no prelo.
- Vetrivel, K., Thinakaran, G. (2010). Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production. *Biochimica et Biophysica Acta*, no prelo.
- Vigo, F., S., et al. (2009). Amyloid- precursor protein mediates neuronal toxicity of amyloid β through Go protein activation. *Neurobiology of Aging*, 30, pp. 1379-1392.
- Viitanen, M., et al. (2009). Comparison of A β levels in the brain of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 55, pp. 243-252.

- Weiner, M., W., et al. (2010). The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: Progress report and future plans. *Alzheimer's & Dementia*, 6, pp. 202-211.
- West, A., K., et al. (2008). Metallothionein in the central nervous system: Roles in protection, regeneration and cognition. *NeuroToxicology*, 29, pp. 489-503.
- White, L., D., et al. (2007). New and evolving concepts in the neurotoxicology of lead. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 225, pp. 1-27.
- Wikimedia Commons. [Em linha]. Disponível em http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PBB_Protein_APOE.jpg. [Consultado em 24 de Março de 2010].
- Wikimedia Commons. [Em linha]. Disponível em <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Acrolein-skeletal.png>. [Consultado em 20 de Maio de 2010].
- Wikimedia Commons. [Em linha]. Disponível em <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Galantamine.svg>. [Consultado em 22 de Maio de 2010].
- Wikimedia Commons. [Em linha]. Disponível em http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Neprilysin_1r1h.png. [Consultado em 25 de Julho de 2010].
- Wikipedia, the free encyclopedia. [Em linha]. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Acetylcholine.svg>. [Consultado em 12 de Janeiro de 2010].
- Wikipedia, the free encyclopedia. [Em linha]. Disponível em <http://en.wikipedia.org/wiki/Ferritin>. [Consultado em 20 de Agosto de 2010].

- Wikipedia, the free encyclopedia. [Em linha]. Disponível em <http://en.wikipedia.org/wiki/Transferrin>. [Consultado em 15 de Agosto de 2010].
- Wikipedia, the free encyclopedia. [Em linha]. Disponível em <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a5/Deferoxamine-2D-skeletal.png>. [Consultado em 20 de Setembro de 2010].
- Wikipedia, the free encyclopedia. [Em linha]. Disponível em <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cf/Clioquinol.png>. [Consultado em 20 de Setembro de 2010].
- Wilson, B., et al. (2008). Poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease. *Brain Research*, 1200, pp. 159-168.
- Zatta, P., et al. (2009). Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30, pp. 346-348.
- Zawia, N., H., et al. (2009). Epigenetics, oxidative stress, and Alzheimer disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 46, pp. 1241-1249.
- Zetterberg, H., et al. (2010). Amyloid β and APP as biomarkers for Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology*, 45, pp. 23-29.
- Zheng, H., et al. (2010). Site-Activated Chelators Targeting Acetylcholinesterase and Monoamine Oxidase for Alzheimer's Therapy. *Acs Chemical Biology*, 5(6), pp. 603-610.