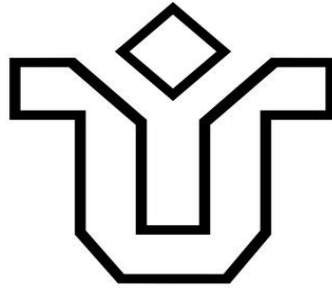


UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
(UNIRIO)

LUCAS CUNHA BARBOSA

INIBIDORES DE BACE-1 PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER:  
REVISÃO DE LITERATURA

RIO DE JANEIRO  
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UNIRIO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS  
INSTITUTO BIOMÉDICO - IB  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Lucas Cunha Barbosa

INIBIDORES DE BACE-1 PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER:  
REVISÃO DE LITERATURA

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação,  
apresentado ao Instituto Biomédico da  
Universidade Federal do Estado do Rio de  
Janeiro, como requisito parcial para a obtenção  
do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Patrícia Cristina dos Santos  
Costa

RIO DE JANEIRO

2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

C Cunha Barbosa, Lucas  
INIBIDORES DE BACE-1 PARA TRATAMENTO DA DOENÇA  
DE ALZHEIMER: REVISÃO DE LITERATURA / Lucas Cunha  
Barbosa. -- Rio de Janeiro, 2019.  
67

Orientadora: Patrícia Cristina dos Santos Costa.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro,  
Graduação em Biomedicina, 2019.

1. Alzheimer. 2. BACE1. 3. Fármacos . 4. Proteína  
Beta Amilóide . 5. Inibidores. I. Cristina dos  
Santos Costa, Patrícia, orient. II. Título.

LUCAS CUNHA BARBOSA

INIBIDORES DE BACE-1 PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER:  
REVISÃO DE LITERATURA

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado ao Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em junho de 2019.

Banca examinadora

---

Profa. Dra. Patrícia Cristina dos Santos Costa, Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

---

Prof. Dr. Ângelo Telesforo Malaquias, Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

---

Msc. Diana Chaves Pereira Mejido, Biologia Parasitária, Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

## AGRADECIMENTOS

Nesse espaço desejo agradecer imensamente, e primeiramente, a Deus e a todos os espíritos de luz e da natureza, que me acompanharam e que me permitiram viver um dia de cada vez. Agradeço por fazerem parte de mim e por sempre estarem ao meu lado, me compondo e me guiando.

Agradeço a Lúcia Cunha Barbosa e Bartolomeu Barreto Barbosa, meus pais. Aqueles que lutaram para que eu chegasse aonde muitos duvidaram, e aonde até eu mesmo duvidei. Agradeço imensamente os conselhos, os auxílios, os dias mal dormidos por não me ter perto, mas que ainda assim me ajudavam a ficar mais forte por saber que isso iria valer a pena em algum momento. Amo vocês! A vocês devo todos esses anos de luta, e os próximos que virão. Agradeço a minha irmã Liliane, que sempre me apoiou e sei que sempre vai ser meu norte quando eu me sentir perdido. Te amo! Agradeço ao meu tio Elias, por sempre ter me ajudado e me apoiado nas minhas decisões. Agradeço ao meu primo Marconi (e sua família) que, mesmo sem nos conhecermos pessoalmente, foi a pessoa que fez isso tudo acontecer. Sem ele eu não teria conseguido iniciar meus estudos na UNIRIO, já que Deus permitiu que ele fizesse a minha matrícula e que eu participasse do seu lar nos primeiros meses duros nesse mundo novo. Agradeço a cada familiar do catumbi, pois sem aquela “mundiça” eu não teria conseguido me adaptar num lugar tão novo e diferente.

Agradeço aos meus melhores amigos Samuel, Thaynan, Letícia, Keyla, Laís, Carol, Léo e Maicon, que foram e continuam sendo a minha base. Hoje, depois desses anos, sei que carrego em mim um pedaço de cada um de vocês. Vocês me emprestaram o que vocês são nas horas em que eu mais precisei, e sei que o tempo pode passar, mas nossas histórias vão ficar e novas histórias hão de chegar. E estarei esperando de braços abertos. Amo vocês! Agradeço ao lugar que foi meu lar por muito tempo, o 149, onde comecei a dar meus primeiros passos e a tomar minhas primeiras decisões. Lá fui me moldando e conhecendo quem sou com base nas minhas escolhas e atitudes. Agradeço imensamente a Márcio Romero, que me ensinou que não devo agir buscando agradar ao próximo, e que é uma das pessoas que mais me ajudou durante a minha estadia no Rio de Janeiro. Te agradeço por ter me mostrado o que é ser uma pessoa íntegra e verdadeira, no meio de tantos que não são. Agradeço também a Wang Dzak e Juliana Heitor, meus melhores amigos, da minha amada Bahia, e meu porto seguro. Nas horas mais difíceis vocês estavam comigo, mesmo que distante. Os nossos caminhos nos separaram fisicamente, mas nada vai distanciar a nossa história e a nossa amizade. Agradeço também a

César Agostinho, que em meio ao meu deserto emocional surgiu para me mostrar que eu ainda era capaz, me trazendo palavras de ânimo e força para derrubar os meus obstáculos. Seja lá quem te mandou, meu amor te recebeu. A você a minha mais sincera gratidão.

Agradeço a UNIRIO, o lugar que hoje posso chamar de lar. Nesse lugar passei os meus melhores e piores momentos, e sei que cada sentimento serviu para moldar a pessoa que me tornei ao longo desses anos. Agradeço a todo corpo de professores e funcionários dessa casa, que sempre foram muito atenciosos e levavam o nome da UNIRIO no peito, com orgulho. E esse mesmo orgulho me foi passado. Agradeço em especial à coordenadora Patrícia e a secretária Gláucia, que me viram nos meus piores momentos, pensando até em desistir, mas que sempre estavam lá pra me dar palavras de conforto e me ensinar que tudo na vida passa, inclusive as partes tristes, e que a cada manhã tudo se renova. Obrigado pela energia positiva e por acreditarem em mim. A vocês a minha mais sincera gratidão.

Por fim, agradeço a vida. A vida que, apesar de ser uma doce ilusão, me deu a oportunidade de ser feliz. A vida que ninguém sabe se é maravilha, sofrimento, alegria ou lamento. Que ninguém sabe dizer se é um nada no mundo, que é uma gota ou um misero tempo que não cabe num segundo. Que pode ser considerada um grande mistério profundo, ou apenas o sopro do criador numa atitude repleta de amor. A vida é luta e prazer? A vida é viver? A vida é sofrer? Deixemos a pergunta seguir rodando, até que alguém explique o que é a vida, além de bonita, bonita e bonita. Pra mim a vida é sentir, e isso foi o que eu mais fiz nesses últimos 5 anos. Então posso afirmar que vivi, e como vivi. E sei que estou só começando!

“Moi je t'offrirai des perles de pluie venues de pays où il ne pleut pas...”

Jacques Brel

BARBOSA, Lucas Cunha. **Inibidores de BACE-1 para tratamento da doença de Alzheimer: revisão de literatura**. 2019. 72 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

## RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é considerada uma doença neurodegenerativa crônica que se manifesta lentamente e vai se agravando ao longo do tempo. Seus sintomas mais comuns são a perda de memória, que pode ser confundida com um processo natural do envelhecimento. Além de causar problemas cognitivos mais sérios, problemas comportamentais, de humor, sintomas psicológicos e no corpo. A ação da enzima BACE-1 vai fazer com que a via amiloidogênica seja ativada, e isso faz com que haja uma liberação de peptídeo A $\beta$ 42, que se acumula em áreas do cérebro, alterando os mecanismos neuronais e causando toxicidade.---- A hipótese da cascata amilóide indica que o acúmulo de oligômeros neurotóxicos do tipo A $\beta$  é o principal evento molecular na patogênese da DA. A BACE-1 é responsável pelo processamento proteolítico da proteína precursora amilóide (APP) e isso gera uma limitação na velocidade de geração de A $\beta$ . -----Essa enzima é então considerada como um grande alvo terapêutico, pois os seus inibidores possuem grande chance de modificar positivamente o curso da DA. Os estudos analisados demonstraram que há diminuição nos níveis dos peptídeos A $\beta$ 42, com base na utilização de drogas desenvolvidas. Esse resultado, porém, não vem acompanhado do aumento nas capacidades cognitivas, provando que o acúmulo crônico desses peptídeos neurotóxicos vai afetar diretamente, e de maneira irreversível, a capacidade cognitiva. É possível evidenciar que o uso de medicamento, antes da fase sintomática, é uma possível forma de combater o acúmulo desses peptídeos, levando a uma possível melhora nos quadros cognitivos. Nesse estudo serão mostrados os desafios e resultados obtidos com a utilização desses inibidores.

**Palavras-chave:** Alzheimer; Inibidor; BACE1; Tratamento.



BARBOSA, Lucas Cunha **Alzheimer's disease treatment with BACE-1 inhibitors:**

**Literature review.** 2019. 72 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina)

– Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,

2019.

### **ABSTRACT**

Alzheimer's disease (AD) is considered a chronic neurodegenerative disease that manifests itself slowly and is worsening over time. Its most common symptoms are memory loss, which can be confused with a natural aging process. In addition to causing more serious cognitive problems, behavioral problems, mood swings, psychological symptoms and in the body. The action of the enzyme BACE-1 will cause the amyloidogenic pathway to be activated, and this leads to a release of the A $\beta$ 42 peptide, altering neuronal mechanisms and increasing toxicity. The amyloid cascade hypothesis indicates that the accumulation of A $\beta$ -type neurotoxic oligomers is the main molecular event in the pathogenesis of AD. BACE-1 will perform the proteolytic processing of the amyloid precursor protein (APP) and this generates a limitation on the generation rate of A $\beta$ . This enzyme is then considered as a major therapeutic target, as its inhibitors have a high chance of positively modifying the course of AD. The studies analyzed have shown that there is a decrease in the levels of the A $\beta$ 42 peptides, based on the use of developed drugs. This result, however, is not accompanied by an increase in cognitive abilities, proving that the chronic accumulation of these neurotoxic peptides will directly and irreversibly affect cognitive ability. It is possible to show that the use of medication, before the symptomatic phase, is a possible way to combat the accumulation of these peptides, leading to a possible improvement in the cognitive frameworks. This study will show the challenges and results obtained with the use of these inhibitors.

**Keywords:** Alzheimer; Inhibitor; BACE1; Treatment.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Principais estruturas cerebrais e suas funções.
- Figura 2. Esquema com os diferentes tipos de memória.
- Figura 3. Diferentes funções da Amígdala.
- Figura 4. Esquema de uma célula neuronal.
- Figura 5. Esquema de célula neuronal e citoesqueleto.
- Figura 6. O impacto global da Demência.
- Figura 7. Corte sagital do cérebro com áreas identificadas e evidenciando em vermelho regiões mais afetadas pela doença de Alzheimer.
- Figura 8. Mudanças conformacionais em peptídeos A $\beta$  e proteína Tau na doença de Alzheimer.
- Figura 9. Corte cerebral coronal de cérebro saudável (A) e cérebro de paciente com DA (B) evidenciando parte do córtex cerebral e ventrículo lateral.
- Figura 10. Imagem de ressonância magnética em corte sagital do crânio de paciente com doença de Alzheimer.
- Figura 11. Imagens do cérebro de paciente com perda progressiva de memória.
- Figura 12. Demonstração de emaranhados fibrilares.
- Figura 13: Corte histológico da região do córtex frontal, corada com hematoxilina e eosina.
- Figura 14. Principais isoformas da proteína Tau no cérebro adulto.
- Figura 15. Corte histológico de córtex cerebral.
- Figura 16. Estrutura do peptídeo amilóide.
- Figura 17. Mecanismos de processamento da proteína precursora amilóide (APP).
- Figura 18. Placas com neuritos distróficos ao redor de núcleos amilóides.
- Figura 19. Estrutura de CNP520.
- Figura 20: Seções de cérebro coradas com dupla imunofluorescência com NT12 e IBA1 ou GFAP.

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Nível sanguíneo e cerebral de CNP520 em modelo murino após dose oral do medicamento.

Gráfico 2. Níveis de A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 dose-tempo dependente, avaliados em sangue, LCR e tecido cerebral de modelos animais

Gráfico 3. Concentração de CNP520 em sangue e tecido cerebral e níveis de A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 em doses diferentes.

Gráfico 4. Quantificação da microglia total para IBA1 (A) e quantificação da área total de astrócitos positivos para GFAP(B).

Gráfico 5. Concentração de CNP520 em plasma e LCR

Gráfico 6. Níveis de A $\beta$ 40, sAPP $\beta$  e sAPP $\alpha$  em relação a diferentes doses de CNP520, e sua relação dose-resposta.

Gráfico 7. Alteração nos níveis de AB40 no LCR, em relação aos valores basais, em 3 meses de tratamento com dose diária.

Gráfico 8. Relação gráfica de dose-resposta para níveis de AB40 em LCR.

Gráfico 9. Concentração plasmática de peptídeo A $\beta$  em resposta a dose única de LY2886721.

Gráfico 10. Concentração plasmática de peptídeo A $\beta$  em resposta a múltiplas doses de LY2886721.

Gráfico 11. Efeito temporal de Verubecestat na avaliação cognitiva e funcional.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Efeito inibitório de CNP520 em diferentes proteases.

Tabela 2. Redução da proteína beta amiloide ( $A\beta_{40}$ ) em diferentes doses de CNP520 e NB-360, e concentração na pele dessas drogas.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS: Aminoácidos

APOE: Apolipoproteína E

APP: Proteína precursora amilóide

A $\beta$ : Beta amilóide

BACE1: Beta secretase 1

BHE: Barreira Hematoencefálica

CDR: Clinical dementia rating

CHO: Chinese hamster ovary

DA: Doença de Alzheimer

IC50: Metade da concentração inibitória máxima

LCR: Líquido cefalorraquidiano

NFTs: Emaranhados neurofibrilares

PD: Farmacodinâmica

PET: tomografia por emissão de pósitrons

P-gp: Glicoproteína P

PK: Farmacocinética

sAPP $\alpha$  e sAPP $\beta$ : Proteína precursora amilóide solúvel  $\alpha$  e  $\beta$

SNC: Sistema nervoso central

SNP: Sistema nervoso periférico

Thy-1: Mesmo que CD90 – Proteína de superfície celular fortemente glicosilada

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1. Sistema Nervoso .....	1
1.2. Doenças Neurodegenerativas.....	4
1.3. Doença de Alzheimer.....	6
1.3.1. Definição .....	6
1.3.2. Características Morfológicas .....	10
1.3.3. Marcadores Biológicos .....	14
1.3.4. Emaranhados Neurofibrilares .....	16
1.3.5. Proteína Amilóide.....	19
1.4. BACE1 .....	22
1.4.1. Elenbecestat .....	24
1.4.2. CNP520 .....	26
1.4.3. Características funcionais e estruturais do CNP520.....	26
1.4.4. Administração oral de CNP520 em ratos e cães.....	32
1.4.5. Tratamento terapêutico crônico de camundongos APP3 com CN520 .....	34
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>37</b>
2.1. Objetivo Geral.....	37
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>38</b>
<b>4. Desenvolvimento</b> .....	<b>39</b>
4.1. Farmacocinética de cnp520 em adultos com idade $\geq$ 60 anos .....	41
4.2. Efeitos da administração de CNP520 nos principais metabólitos de APP em LCR de participantes saudáveis com idade $\geq$ 60 anos .....	42
4.3. Efeitos da administração de CNP520 sobre AB40 no LCR, por 3 meses em participantes saudáveis com idade $\geq$ 60 anos .....	44
<b>5. Conclusão</b> .....	<b>51</b>
<b>6. REFERÊNCIA</b> .....	<b>52</b>

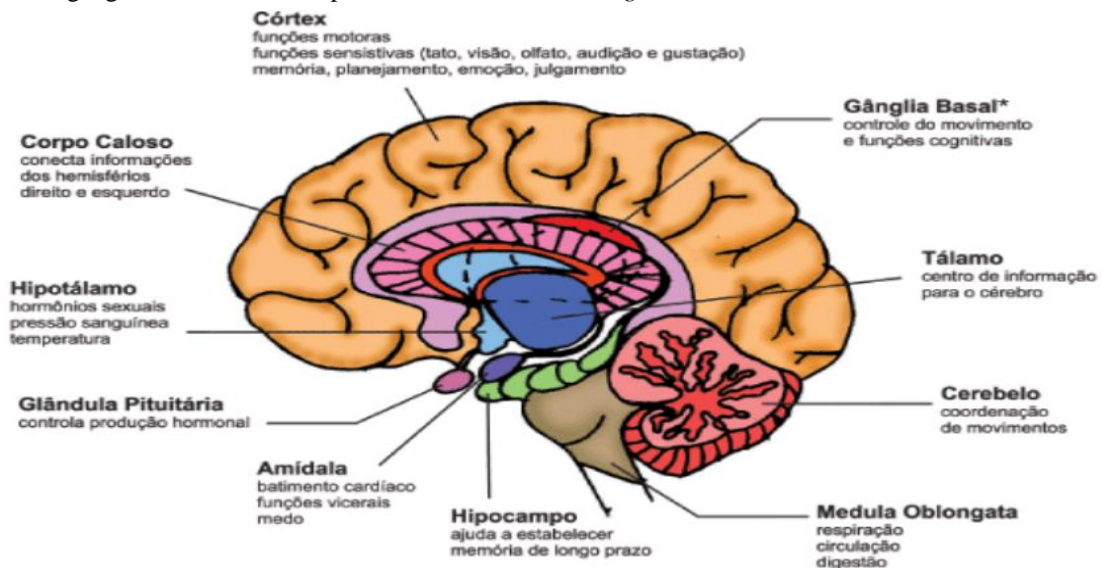
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Sistema Nervoso

O sistema nervoso é responsável pela coordenação de funções fundamentais ao corpo humano, executando tarefas específicas e auxiliando no funcionamento do organismo. Pode ser dividido em sistema nervoso central (SNC), composto pelo encéfalo e medula espinal, e sistema nervoso periférico (SNP), composto por fibras nervosas e gânglios que conectam o SNC aos órgãos do corpo.

O cérebro é dividido em regiões diferentes, onde cada uma delas tem funções características que dão suporte ao funcionamento do organismo (**Figura 1**). O cérebro adulto possui em torno de  $10^{11}$ - $10^{12}$  neurônios e o dobro de células da glia (microglia, astrócitos e oligodendrócitos), que vão servir como auxílio no suporte e proteção (BARBOSA, 2006).

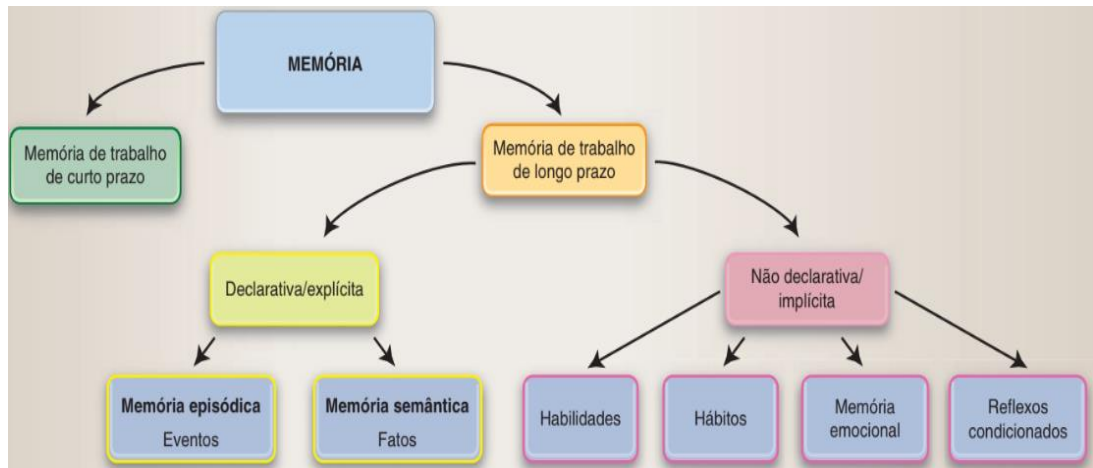
**Figura 1: Principais estruturas cerebrais e suas funções.** Esquema de corte sagital, demonstrando o córtex, hipotálamo, glândula pituitária, amígdala, hipocampo, medula oblongata, cerebelo e tálamo, onde o gânglio basal é formado por: *striatum*, *substantia nigra* e núcleo subtalâmico.



Fonte: Barbosa (2006)

De acordo com Krebs (2013) o hipocampo possui a função de mediar o aprendizado e formar novas memórias, que vão possuir múltiplas formas (**Figura 2**).

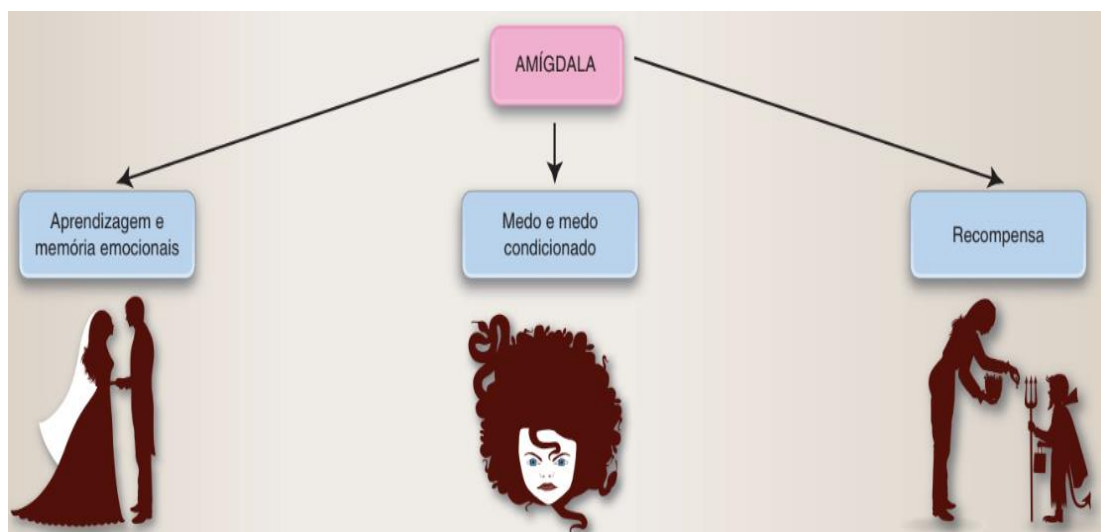
**Figura 2: Esquema com os diferentes tipos de memória**



Fonte: KREBS (2013)

Estas se subdividem em memórias declarativas, relacionadas à eventos e fatos, ou não declarativas, associadas à hábitos e comportamentos emocionais entre outros. Estas formas serão dependentes de diferentes conjuntos de estruturas do SNC que participam da expressão de emoções e comportamentos emocionais. O córtex entorrinal, por exemplo, é uma região que, junto ao hipocampo, está relacionada à produção de memória de curta duração (IZQUIERDO, 2006). Adicionalmente, a amígdala tem um papel importante nos comportamentos relativos a ações impulsivas e no processamento de emoções relacionadas a tais comportamentos, medo e medo condicionado e emoções relacionadas à recompensa (Figura 3). Assim estão ligados a memória de longo prazo implícita ou não-declarativa (KREBS, 2013).

**Figura 3: Diferentes funções da Amígdala**

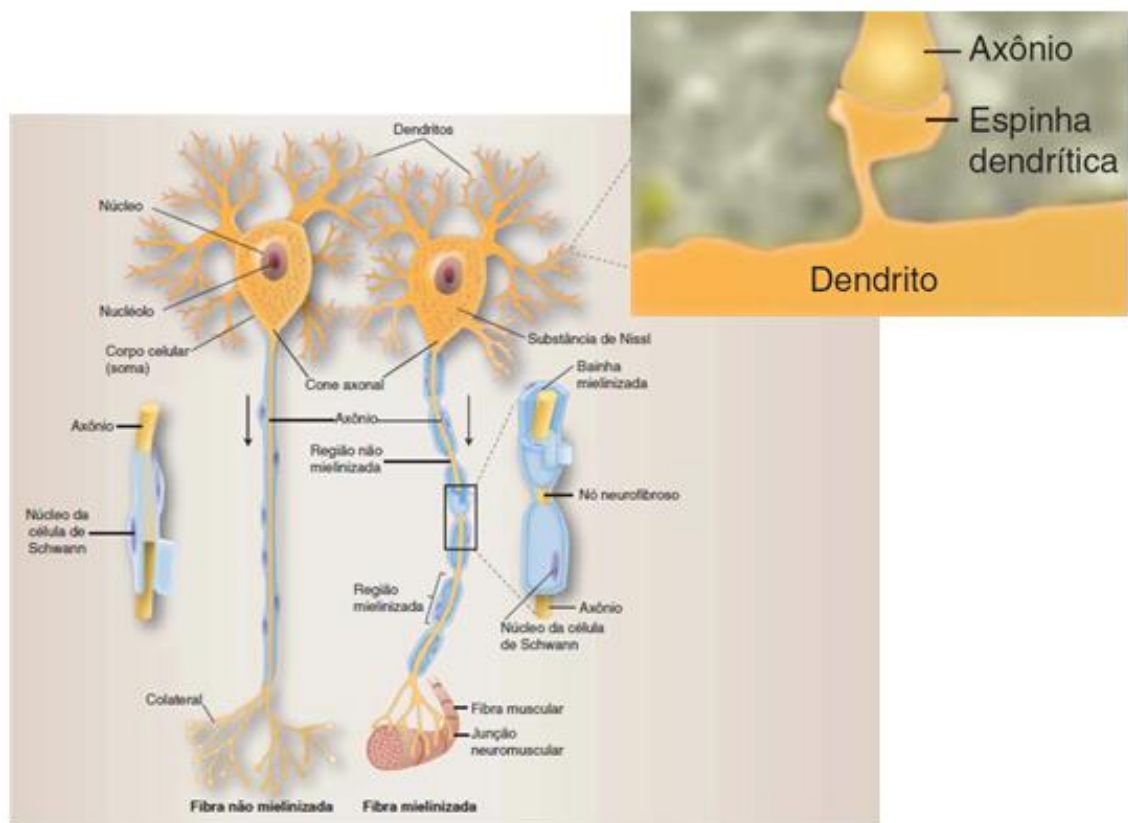


Fonte: KREBS (2013)



Quando se fala em sistema nervoso é necessário falar sobre uma das suas principais células, o neurônio, a célula excitável do sistema nervoso, capaz de propagar sinais por meio de potenciais de ação, ou impulsos elétricos, comunicam-se por sinapses, formando uma rede funcional para o processamento e armazenamento das informações ao longo da superfície neuronal (KREBS, 2013). Existem diferentes tipos de neurônios, mas todos possuem componentes estruturais que vão lhe permitir o processamento de informações (**Figura 4**).

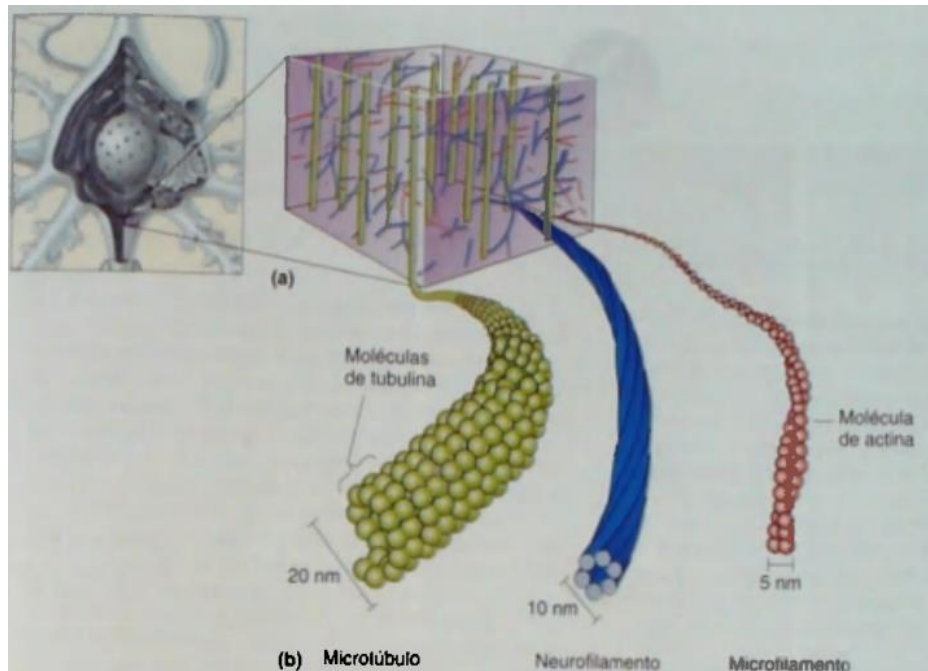
**Figura 4: Esquema de uma célula neuronal.** Estruturas que compõem o neurônio, demonstrando as pequenas espinhas dendríticas, que se encontram nos dendritos, e é onde ocorrem os contatos sinápticos com axônios. Os processos cilíndricos surgem do cone axonal e podem estar envoltos com uma camada protetora de mielina. (KREBS, 2010)



**Fonte:** KREBS (2010)

De acordo com Bear (2002) o citoesqueleto é o que vai dar a forma característica dos neurônios, onde ele vai ser sustentado por microtúbulos, microfilamentos e neurofilamentos. (**Figura 5**).

**Figura 5: Esquema de célula neuronal e citoesqueleto.** A) Demonstração do citoesqueleto. B). Componentes do citoesqueleto O formato característico dos neurônios se dá pela disposição dos microtúbulos, neurofilamentos e microfilamentos.



Fonte: BEAR (2002)

Bear (2002), em seu livro denominado “Neurociências: desvendando o sistema nervoso” informa que os microtúbulos medem em torno de 20nm de diâmetro, são considerados grandes e percorrem os neuritos de maneira longitudinal. A parede dos microtúbulos é composta por pequenas fitas que são entrelaçadas e compostas pela união de várias proteínas chamadas de tubulina, que possui um formato pequeno e globular. O processo de junção dessas proteínas, para constituir uma longa fita, é chamado de polimerização, que vai ser regulado por proteínas associadas aos microtúbulos (microtubule-associated proteins – MAPs). As MAPs vão ter a função de aderir os microtúbulos entre si e a outras partes de neurônios. Quando ocorrem alterações patológicas nas MAPs, sendo chamadas de proteínas Tau, vão ser relacionadas à demência que acompanha a Doença de Alzheimer (DA). Dentre essas alterações existem outras que serão discutidas no decorrer deste trabalho.

## 1.2. Doenças Neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas são condições que vão afetar os neurônios no cérebro humano. Essas células, quando submetidas a condições adversas, normalmente não são substituídas, sendo então submetidas a danos permanentes.

De acordo com o Programa Conjunto de pesquisa em doença neurodegenerativa (do inglês Joint Programme – Neurodegenerative Disease Research – JPND) doenças neurodegenerativas (DNs) são condições incuráveis e debilitantes que resultam da degeneração progressiva e/ou morte das células nervosas. Juntamente com a deposição de determinadas proteínas que irão ter a suas propriedades físico-químicas alteradas, sendo chamadas de proteínas mal dobradas (KOVACS, 2017). Isso causa problemas de movimento (ataxias), ou no funcionamento mental (demências). As demências são responsáveis pela maior parte das doenças neurodegenerativas, como DA, que representa aproximadamente 60-70% dos casos de demência, Doença de Parkinson (DP), Doença de Huntington, Atrofia muscular espinhal, etc

O aumento da expectativa de vida da população, somado à índices crescentes de qualidade de vida resulta em maior longevidade da sociedade moderna. Desta forma, doenças como o Alzheimer, que eram classificadas como menos frequentes, já são classificadas como de grande importância (FELIPPE, 2014). Já é estimado que o número de pessoas que vivem com demência triplique – de 50 milhões para 152 milhões até 2050 (OMS, 2017). Outro dado importante, confirmado pela Organização Mundial da Saúde em 2017, é que o custo anual estimado para a demência seja de US\$ 818 bilhões, o que é equivalente a mais de 1% do produto interno bruto (PIB) global. Essa quantia inclui despesas médicas, assistência social e cuidados informais, sendo esperado que esse valor supere o seu dobro até o ano de 2030, podendo causar danos ao processo de desenvolvimento sócio-econômico e acarretar numa sobrecarga nos serviços relativos a população e saúde, como os sistemas de cuidados de longo prazo (PAHO e OMS, 2017). Dessa forma é importante analisar as possibilidades de melhoria nas áreas de saúde pública e gestão de gastos da DA (GUTIERREZ *et al.*, 2014).

Kovacs 2017, com base em Carrell e Lomas - 1997, informa ainda que a maioria dos distúrbios neurodegenerativos, mas não todos, são caracterizados por depósitos proteicos, e que o conceito de doenças conformacionais implica que a conformação estrutural de uma proteína vai ser modificada, resultando na alteração da sua função ou na acumulação intra ou extracelular, causando uma potencial toxicidade.

A classificação das doenças neurodegenerativas é baseada nas seguintes características (KOVACS 2014, 2015):

- 1 – Sintomas clínicos determinados pela região anatômica, que apresenta disfunção neuronal;

2 – Proteínas mostrando várias modificações bioquímicas e acumulando-se em neurônios ou células gliais, ou de forma extracelular.

Segundo Robbins & Cotran (2010) as doenças neurodegenerativas podem diferir em relação a distribuição das alterações neuropatológicas e de suas características específicas, como emaranhados e placas por exemplo, podendo ser divididas em duas formas:

1 – Anatômico/sintomático: que relaciona as regiões do sistema nervoso central (SNC) que são afetadas primariamente, refletindo nos sintomas clínicos;

2 – Patológico: que relaciona os tipos de atividades e a observação das proteínas e enzimas que estão fora do seu comportamento normal.

Com base nessas classificações é possível compreender melhor as características envolvidas nas doenças neurodegenerativas como as modificações anatômicas, alterações bioquímicas e cognitivas relacionadas.

Devido à importância do estudo a respeito das DNs, e sua alta influência socioeconômica, falaremos a seguir sobre as características da doença de Alzheimer e sobre o seu impacto mundial.

### **1.3. Doença de Alzheimer**

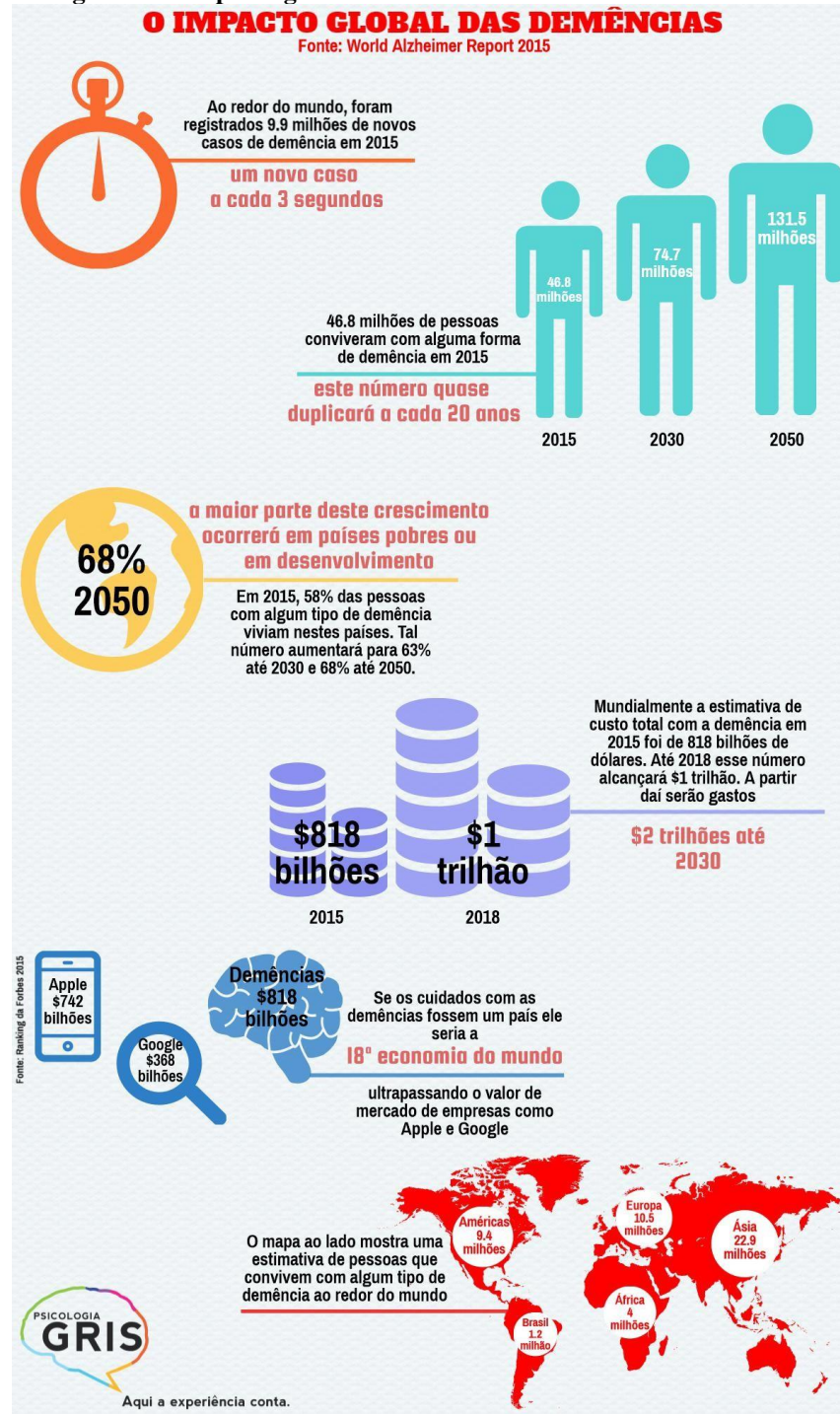
Alois Alzheimer foi um professor nascido na Bavaria, Alemanha, e, ao final da sua vida, tinha se estabelecido como um grande psiquiatra clínico e a principal autoridade na histopatologia do córtex cerebral, como foi citado por Toodayan (2013) a partir do estudo de Graeber (2003) em *History of Neuroscience: Alois Alzheimer (1864-1915)*. Em 1907 ele observou em sua paciente, Auguste Deter, alguns sintomas de demência, em especial a perda de memória recente. A partir dessas observações clínicas ele caracterizou os achados da doença no cérebro, onde descreveu uma grande distribuição de emaranhados neuronais e placas amilóides no cérebro, que junto a outros fatores, como astrogliose, distrofia e perda neuronal, formam características constituintes no distúrbio (DE STROOPER, 2016).

#### **1.3.1. Definição**

A DA é caracterizada como uma Taupatia (RAJ, 2015) e uma doença neurodegenerativa (DN) mais prevalente (não só no Brasil, como em países pobres ou em desenvolvimento) (OLIVEIRA, 2015) complexa e a causa mais comum da demência (LUCEY, 2014). Ela afeta milhões de pessoas em todo o mundo (CHAKRABORTY, 2016), além de ser considerada por Kanekivo (2014) a forma mais comum de neurodegeneração na

vida tardia em humanos. Dessa forma é responsável por cerca de 60% a 80% dos casos de demência (THIES E BLEILER, 2013). Segundo o World Alzheimer Report (2015) a demência é considerada uma doença economicamente onerosa (**Figura 6**) que induz uma preocupação global sobre a saúde pública, e que possui um custo de US\$818 bilhões, e com o passar dos anos esse valor pode chegar na faixa dos trilhões de dólares, indicando um maior custo quando comparado com valores de mercado de empresas como a Apple (US\$ 742 bilhões) e o Google (US\$ 368 bilhões). Uma redução confiável e até modesta no risco de DA teria um tremendo impacto na saúde pública (LUCY, 2014).

Figura 6: O impacto global da Demência

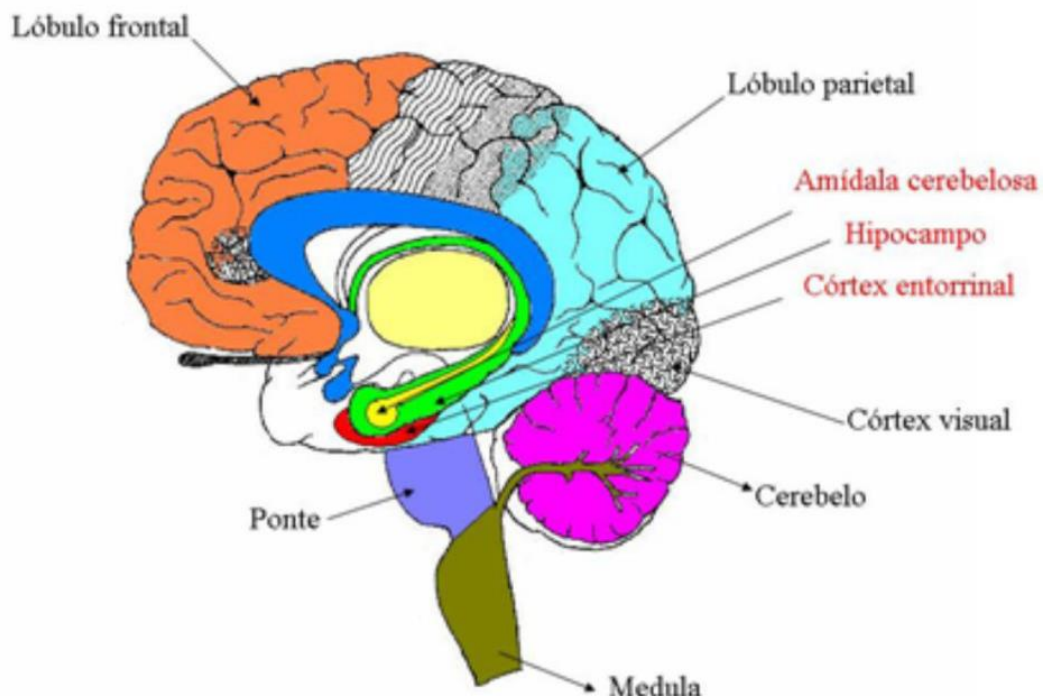


Fonte: WORLD ALZHEIMER REPORT (2015)

Segundo Lazarov (2016) a doença de Alzheimer é caracterizada por uma perda progressiva de memória, onde sua formação mais recente se encontra debilitada e as lembranças mais antigas são preservadas até certo nível da doença. Além da perda sináptica e morte neuronal, que vão ser observadas nas regiões cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas, sobretudo a amígdala cerebelosa, o hipocampo e o córtex entorrinal do lóbulo

temporal (SERENIKI *et al.* 2008, FALCO *et al.* 2016) (**Figura 7**) ocorre a incapacidade de aprender ou reter novas informações. Isso ocorre por conta da deficiência na capacidade de reflexão, juízo e concentração (OLIVEIRA *et al.* 2005) e a deterioração da função cognitiva. Essas alterações acabam afetando a orientação, atenção, linguagem, capacidade de resolver problemas e habilidades para desempenhar atividades diárias (LAZAROV, 2016), além de causar alterações de personalidade e comportamentais. Essas alterações levam ao declínio cognitivo geral (CHAKRABORTY, 2016), mas pouco se conhece sobre o desenvolvimento desses quadros no decorrer da DA.

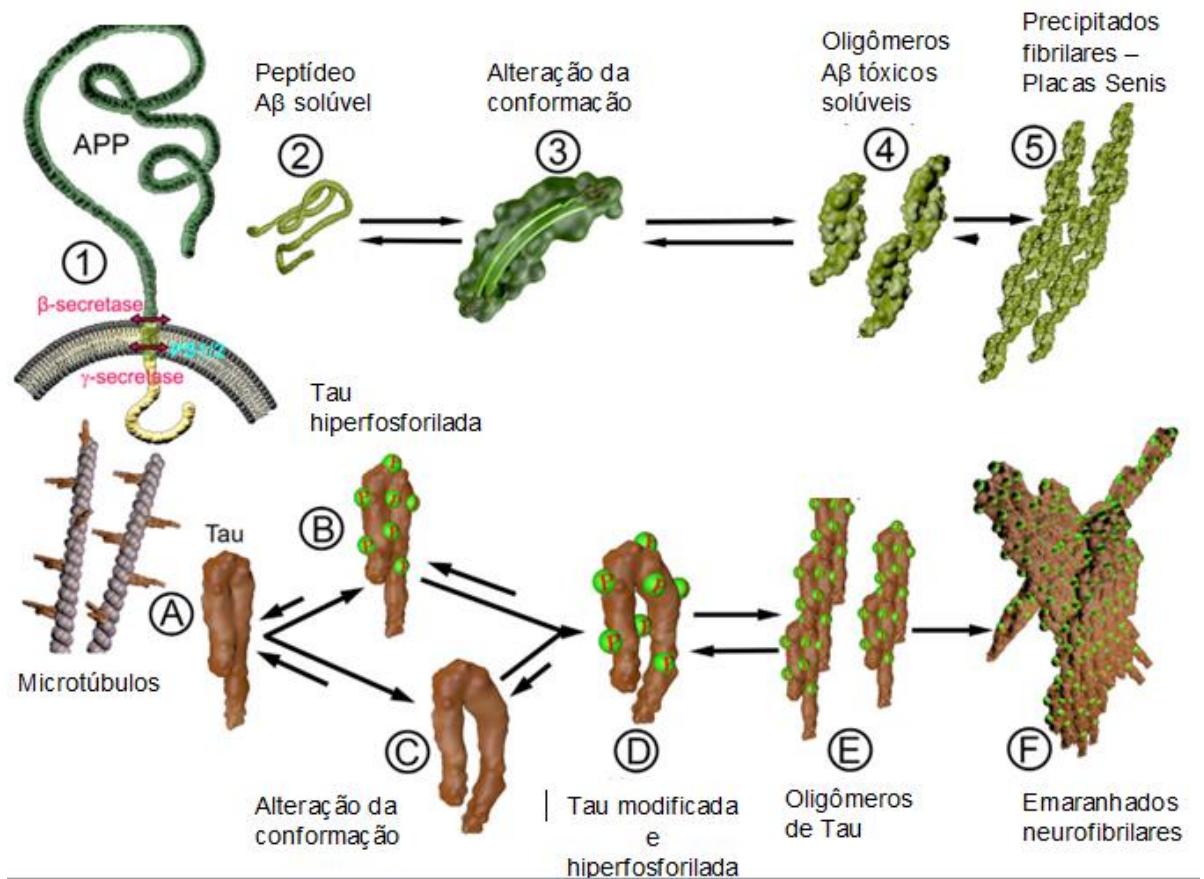
**Figura 7:** Corte sagital do cérebro com áreas identificadas e evidenciando em vermelho regiões mais afetadas pela doença de Alzheimer (FALCO *et al.* 2016).



Fonte: Falco (2016)

Historicamente a DA tem sido caracterizada como uma doença neurodegenerativa, definida principalmente por sua assinatura patológica, incluindo depósitos de amilóide na forma de placas extracelulares de proteínas Beta amilóides ( $A\beta$ ) e agregados de proteína tau na forma de emaranhados neurofibrilares (NFTs) intracelulares (WIANIEWSKI, 2015) (**Figura 8**).

**Figura 8: Mudanças conformacionais em peptídeos A $\beta$  e proteína Tau na doença de Alzheimer.** (1-5) (1) O APP sofre clivagem normal para produzir (2) peptídeo A $\beta$  solúvel normal. Esse pode sofrer uma mudança conformacional (3) que se agrega ainda mais para formar (4) oligômeros A $\beta$  tóxicos solúveis. Nesse caso vão formar (5) precipitados fibrilares que compõe as placas senis. (A-F) (A) Tau é uma proteína de ligação nos microtúbulos e pode sofrer (B) hiperfosforilação ou (C) mudança conformacional. Ela ainda pode sofrer (D) alteração conformacional junto a hiperfosforilação, levando a formação de (E) oligômeros de Tau, que formam os (F) emaranhados neurofibrilares.



Fonte: WISNIEWSKI (2015)

Durante o curso da DA, a plasticidade sináptica é alterada, e muitos dos mecanismos envolvidos na plasticidade normal tornam-se desregulados, levando à disfunção e colapso da sinapse (SPIRES-JONES, 2014).

Em virtude das alterações observadas no decorrer da DA, abordaremos as alterações morfológicas, anatômicas, histológicas e celulares constatadas nessa disfunção.

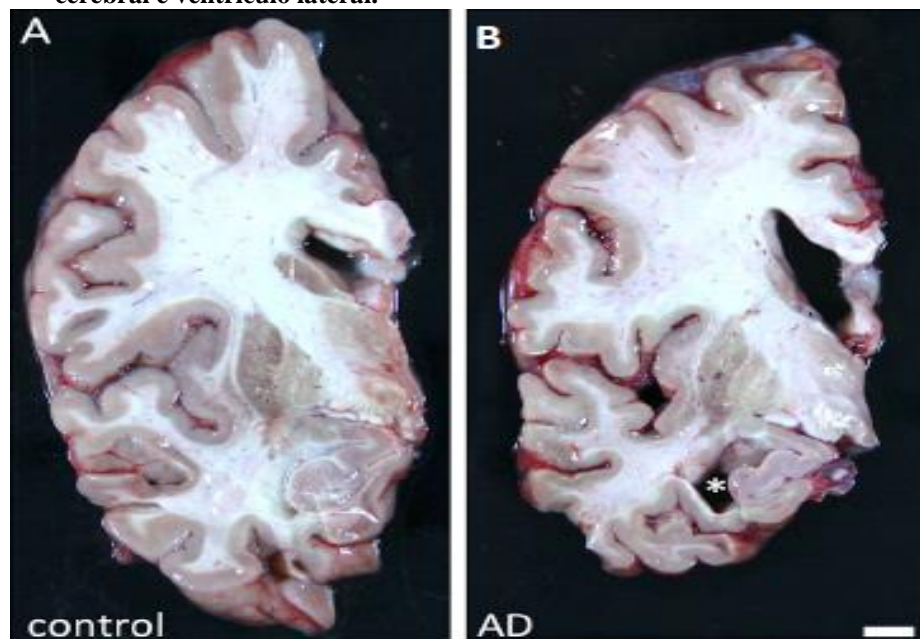
### 1.3.2. Características Morfológicas

A DA provoca danos estruturais e funcionais significativos do sistema nervoso central (CHAKRABORTY, 2016). Os cérebros com DA são caracterizados por uma acentuada atrofia cortical e acentuado aumento do tamanho dos sulcos cerebrais, que será mais visto nos lobos frontais, temporais e parietais (ROBBINS & COTRAN, 2010), devido a essa



modificação estrutural é possível verificar um aumento dos ventrículos e redução do volume cerebral quando comparadas com cérebros sem DA (**Figura 9**). Quando se trata de níveis celulares a DA é caracterizada por uma disfunção progressiva e perda de neurônios, que vai ocasionar certo grau de declínio cognitivo, resultando em uma perda de memória (CHAKRABORTY, 2016) que é vista em virtude de uma deposição de proteínas Beta-amilóide e a presença de emaranhados fibrilares, formados por proteínas TAU que foram hiperfosforiladas (SPIRE-JONES, 2014).

**Figura 9 – Corte cerebral coronal de cérebro saudável (A) e cérebro de paciente com doença de Alzheimer (B) evidenciando parte do córtex cerebral e ventrículo lateral.**

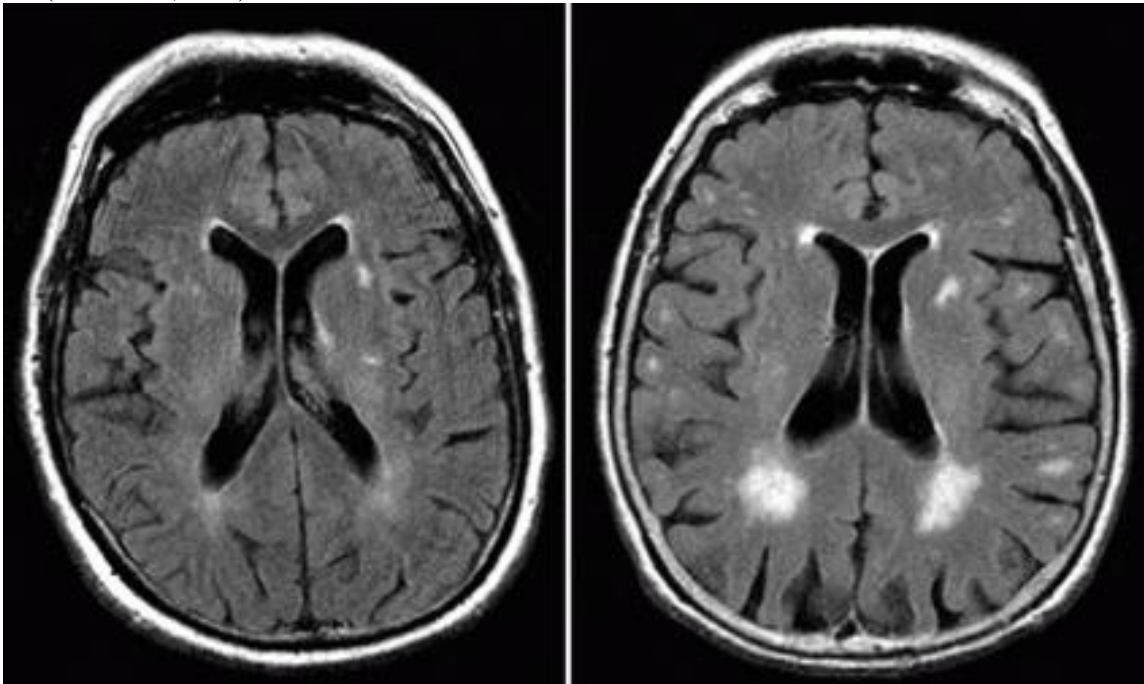


Fonte: SPIRES-JONES (2014)

Com uma visão histopatológica foi desenvolvido um modelo que consegue separar em estágios. Segundo Raj (2015) nos estágios I e II os NFTs são primeiramente encontrados no córtex e no hipocampo, que vão de espalhar na amígdala e no lóbulo basolateral temporal, caracterizando os estágios III e IV, seguidos por áreas de associação isocortical, que serão confirmados os estágios V e VI. As alterações morfológicas que vão acompanhar esta progressão patológica podem ser vistas claramente por ressonância magnética (RM), onde também será observado o aumento na concentração de substâncias brancas em hiperintensidade (WMHs). A concentração dessas substâncias podem ser um fator chave que contribui para a apresentação da DA, sendo essa hiperintensidade causada pela deposição significativa de amilóide (**Figura 10**). Isso fornece uma segunda característica necessária para

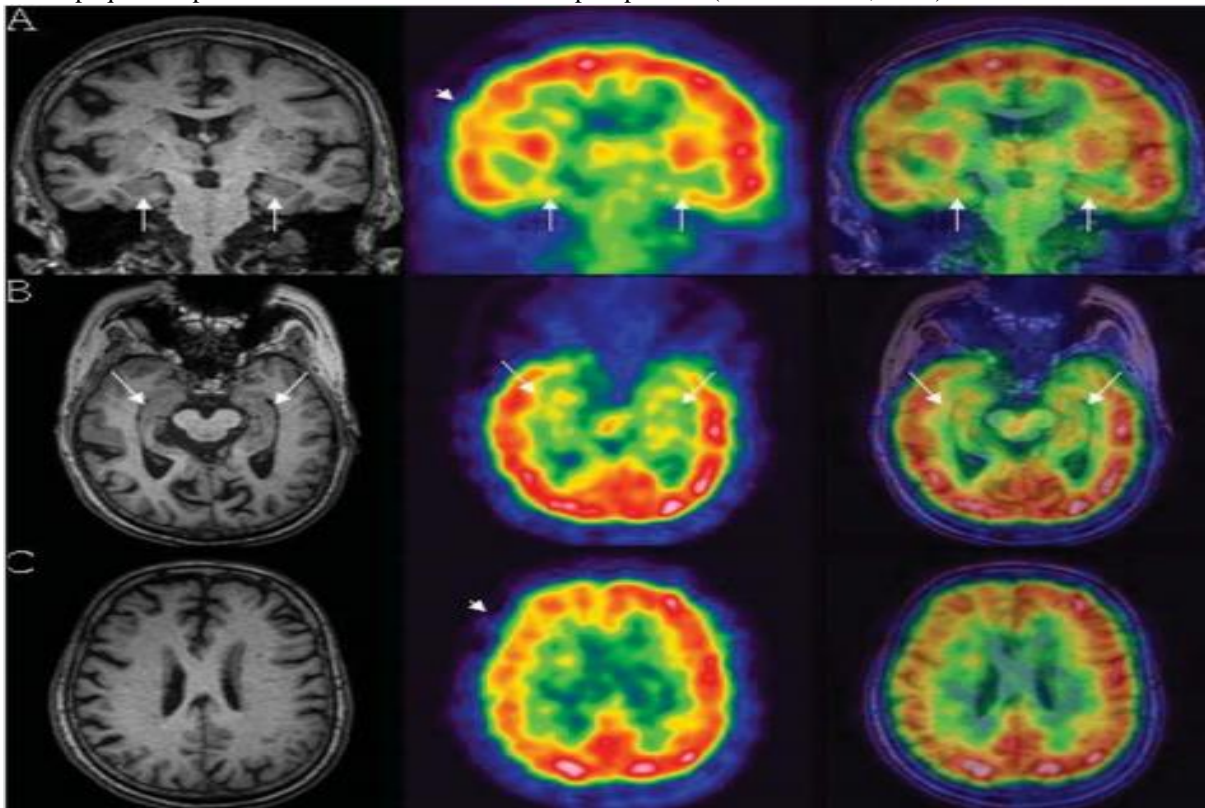
a manifestação clínica da doença (DEBETTE, 2010) ou pela fusão da RM com tomografia por emissão de pósitrons (PET) que, apesar de ser uma modalidade de imagem mais sensível e específica na detecção de mudanças metabólicas, apresenta uma visualização espacial limitada (FILHO *et al.* 2010). Sendo assim essa junção auxilia na identificação de alterações metabólicas em pequenas estruturas que são consideradas de difícil localização anatômica pelo PET, como o hipocampo (**Figura 11**), que está diretamente ligado a um futuro declínio cognitivo na DA (FILHO *et al.* 2010).

**Figura 10: Imagem de ressonância magnética corte sagital do crânio de paciente com doença de Alzheimer.** Demonstração de dois pacientes com 80 anos de idade. Visto um menor acúmulo de substâncias brancas em hiperintensidade (esquerda) e com maior acúmulo (direita), confirmando uma maior hiperintensidade das áreas com maior deposição amilóide, predominando na região (DEBETTE, 2010).



Fonte: DEBETTE (2010)

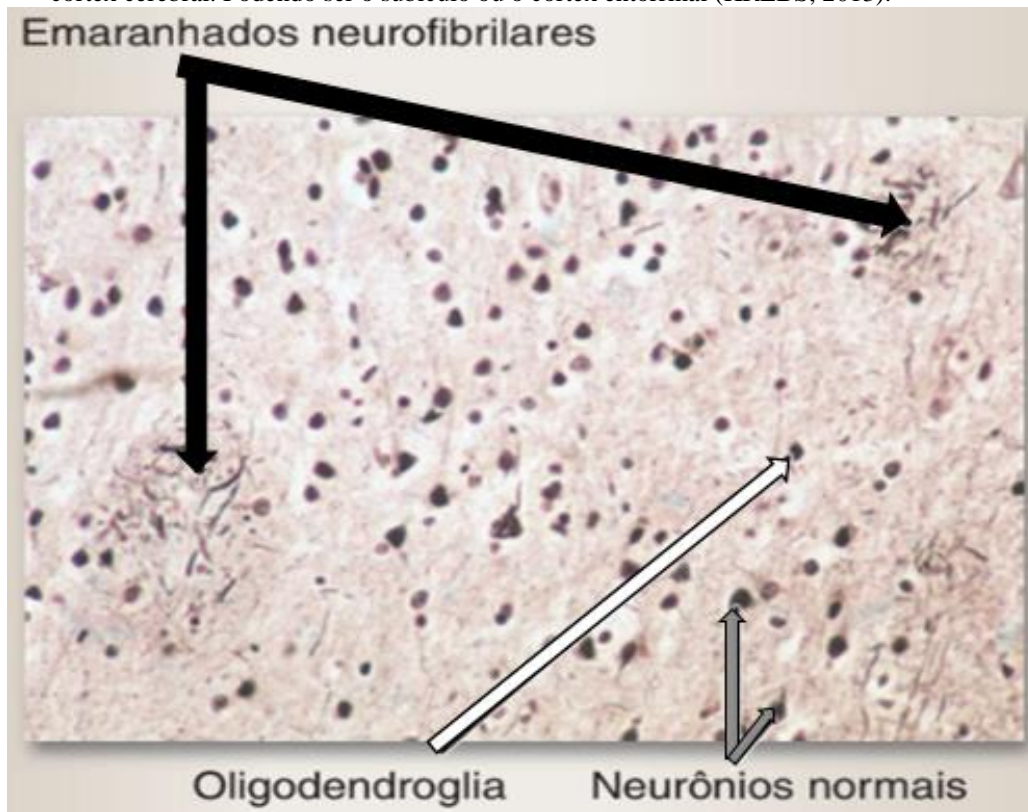
**Figura 11: Imagens do cérebro de um paciente com perda progressiva de memória.** É possível ver em cada linha os 3 tipos de exames realizados. RM, PET e PET-RM, respectivamente, onde é possível confirmar uma discreta redução no metabolismo do hipocampo (setas em A e B) e um pequeno hipometabolismo no córtex frontotemporo-parietal (FILHO *et al.*, 2010)



Fonte: FILHO (2010)

Acredita-se que a formação de NFTs (proteína TAU anormal que vai causar o colapso dos microtúbulos) (**Figura 12**) e placas amilóides (Beta amilóide, um fragmento de proteína retirado de uma proteína precursora de amilóide – APP - que se acumula formando placas rígidas e insolúveis) vai auxiliar para a degradação dos neurônios e para os subsequentes sintomas da doença. Além disso, as moléculas de A $\beta$  podem se agregar e formar oligômeros solúveis, que são as principais toxinas responsáveis pelos problemas encontrados na DA.

**Figura 12 – Demonstração de emaranhados fibrilares.** Um estudo microscópico de córtex cerebral. Podendo ser o subículo ou o córtex entorrinal (KREBS, 2013).



Fonte: KREBS (2013)

Segundo Oliveira (2015) os estudos das fases tardias da doença vão causar sintomas reconhecíveis que vem sido correlacionados com as manifestações clínicas da DA, porém a evolução dos estudos nessas fases vem sendo cada vez mais carregados de dificuldades, por conta da grande extensão de células alteradas. Oliveira ainda afirma que nas fases iniciais da doença as circunstâncias se tornam mais claras, e os indivíduos que não possuem sintomas clínicos conseguem apresentar alterações patológicas que vão ser associadas a DA, como a presença da proteína TAU em sua forma hiperfosforilada. Dessa forma, apesar das placas amilóides e da proteína TAU fosforilada manterem um papel essencial da patologia da DA, os acúmulos que vão formar as placas correlacionam-se mal com o estado clínico dos pacientes, de acordo com Wisniewski (2015) que citou Nelson *et al.*, 2012 e Terry, 1996.

### 1.3.3. Marcadores Biológicos

Segundo Vos (2016) biomarcadores foram incorporados nos critérios de pesquisa atualmente propostos para a DA, para aumentar a confiança de que um comprometimento

cognitivo é devido à DA ou para identificar a doença em seus estágios pré-clínicos antes do início da demência.

Blennow (2015) informa sobre três formas de definição de biomarcadores. A primeira definição foi feita por um grupo a respeito de biomarcadores no Instituto Nacional de Saúde (National Institutes of Health – NIH), onde um biomarcador é estabelecido como alguma característica que é medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos, ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica. A segunda definição é feita com base no Instituto nacional do Câncer, que define um biomarcador como uma molécula biológica encontrada no sangue, outros fluidos corporais, ou tecidos que é um sinal de um processo normal ou anormal, ou de uma condição ou doença. A terceira é feita com base na Organização Mundial de Saúde (OMS) que define um biomarcador como quase todas as medições que refletem uma interação entre um sistema biológico e um perigo potencial.

Enquanto o tratamento e o diagnóstico da DA são limitados, a detecção pré-sintomática da DA é necessária para uma intervenção precoce, onde pode ser conseguida através da detecção das moléculas segregadas no líquido cefalorraquidiano (LCR), e/ou plasma dos pacientes (Chakraborty, 2016). Durante a última década, um enorme progresso foi realizado na pesquisa de biomarcadores na DA (Vos, 2016), onde é possível confirmar que biomarcadores de CSF vem mostrando uma grande especificidade quando relacionado a DA, sendo esses biomarcadores mais específicos para determinar se um indivíduo tem chances de desenvolver a DA, mesmo vários anos antes do início clínico da doença (DOBUIIS, 2014). O uso de biomarcadores de LCR pode melhorar a seleção de pacientes com comprometimento cognitivo leve, além de rastrear a progressão da doença, a medição das concentrações de biomarcadores apresenta menor variância de erros do que testes neuropsicológicos (FRISONI, 2013).

Biomarcadores podem ter diferentes níveis de sensibilidade, ou seja, alguns têm menor sensibilidade à patologia do que outros. Assim, seria necessário que maior número de neurônios seja afetado até que seus níveis se tornem anormais. Adicionalmente estas diferenças podem se refletir em mudança em seu papel com os diferentes estágios da doença conforme dados mostrados em estudos transversais (FRISONI, 2013).

Os biomarcadores utilizados como moduladores do metabolismo e agregação e de proteínas beta amilóides, por exemplo, são importantes para um estudo mais detalhado do envolvimento desse tipo de proteína na patogênese da DA (BLENNOW, 2015).

O Instituto de pesquisa de Ronald e Nancy Reagan, da Associação de Alzheimer e o Grupo de Trabalho do Instituto Nacional do Envelhecimento criaram uma definição de critérios para um biomarcador de diagnóstico de DA ideal, onde afirmaram que o biomarcador deve ser capaz de detectar uma característica fundamental da neuropatologia de Alzheimer, é preciso um grau de precisão capaz de detectar a DA no início de seu curso e distingui-la de outras demências, é preciso ser confiável, não invasiva e simples, para uma execução barata (BLENNOW, 2015).

De acordo com Dubois (2016) a DA é definida pela positividade dos biomarcadores tanto da amiloidopatia (A+) como da tauopatia (T+), de acordo com a definição patológica da doença. Portanto, duas fases da doença podem ser distinguidas:

- Um estágio clínico definido pela ocorrência de fenótipo clínico da DA (típico ou atípico) e que engloba tanto os estágios prodrômico e demência;
- Um estágio pré-clínico antes do início do fenótipo clínico. O desenvolvimento dos biomarcadores da patologia de Alzheimer torna possível reconhecer a DA antes do início do fenótipo clínico específico.

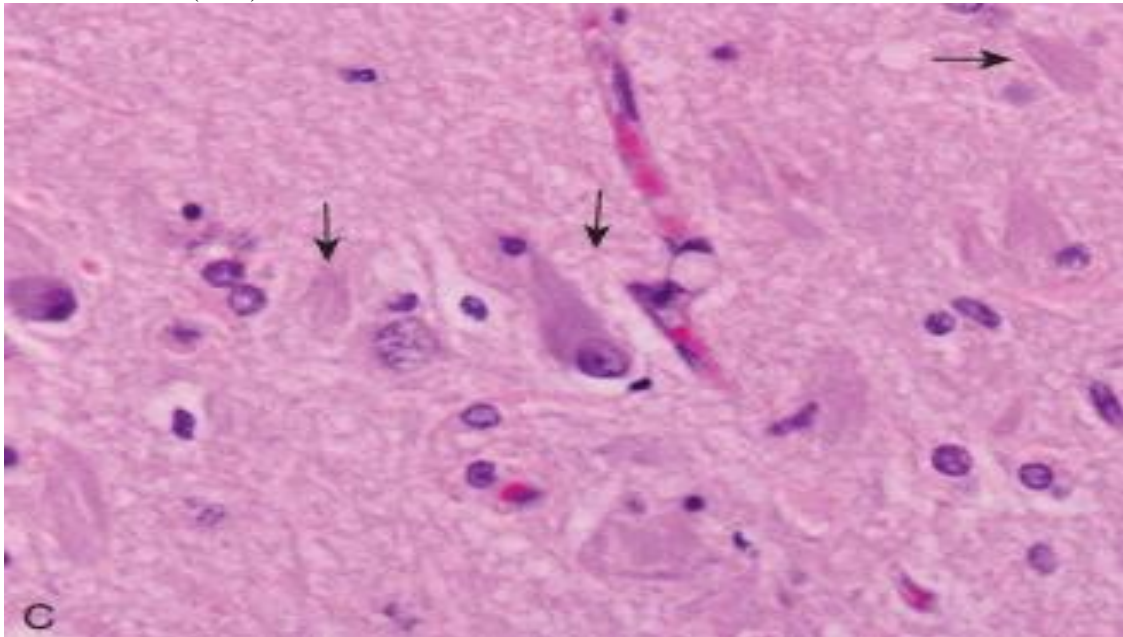
Atualmente a combinação de marcadores de LCR ou PET pode melhor estratificar indivíduos de baixo e alto risco, facilitando na seleção de um bloco de alterações em DA que pode ser adaptado para estudos individuais (DOBUIS, 2016).

Uma conclusão provisória para biomarcadores fisiopatológicos informa que a evidência in vivo de biomarcadores de tauopatia e amiloidopatia permite o diagnóstico de DA no estágio pré-clínico. A literatura existente confirma que a presença de uma amiloidopatia isolada (no cérebro ou LCR) ou tauopatia (no cérebro) caracteriza apenas um estado de risco assintomático para DA, embora seja reconhecido que as alterações de tau no LCR possam ocorrer tardiamente na fase pré-clínica (DOBUIS, 2016).

#### **1.3.4. Emaranhados Neurofibrilares**

No caso dos emaranhados fibrilares é possível afirmar que não possuem solubilidade e são resistentes ao processo de renovação in vivo, sendo formados por filamentos helicoidais, dispostos ao redor de outros filamentos que possuem composição semelhante (HAASS, 2007). Esses filamentos (**Figura 13**) são formados, em sua maior parte, por uma proteína axonal que está relacionada a microtúbulos e a sua montagem, a proteína tau, em uma forma hiperfosforilada, que não é considerada sua forma normal (ERIKSEN, 2008).

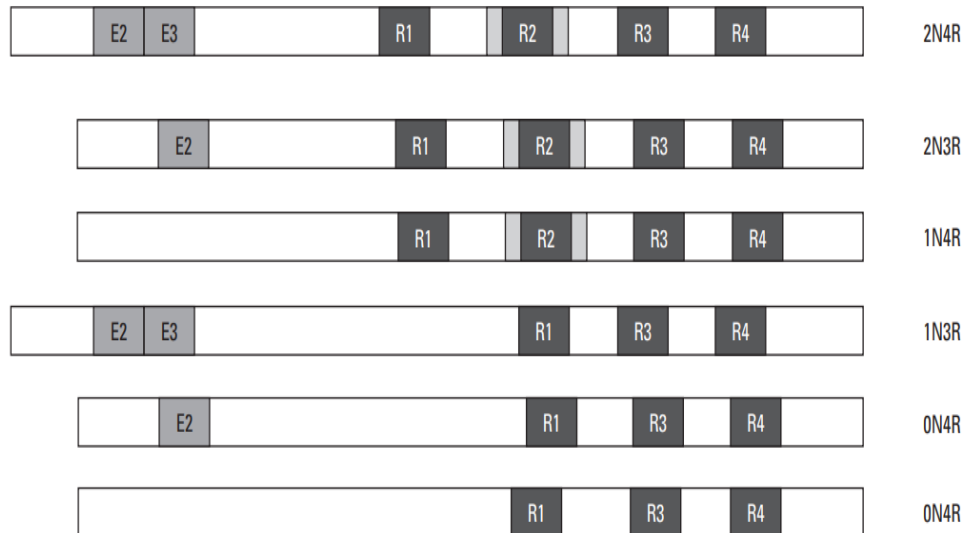
**Figura 13: Corte histológico da região do córtex frontal, corada com hematoxilina e eosina.** Presença de emaranhado neurofibrilar dentro de um neurônio, junto a vários emaranhados extracelulares (setas).



**Fonte:** ROBBINS & COTRAN (2010)

A proteína tau faz parte da família das proteínas associadas a microtúbulos (*microtubule-associated proteins* – MAP) muito expressa em neurônios e possui um papel crucial na estabilização do citoesqueleto neuronal, pela agregação da tubulina (KIKKAWA *et al.* 1994). No cérebro humano essa proteína é solúvel e, por conta do splicing alternativo do mRNA (GOEDERT, 2004), dos éxons 2,3 e 10, irá apresentar seis isoformas diferentes. Cada forma contém respectivamente, nenhuma, uma ou duas inserções no segmento aminoterminal (PAULA *et al.* 2009) (**Figura 14**). A sua estrutura é subdividida em quatro regiões: uma região ácida na parte do terminal N, uma região rica em prolina, uma região responsável pela ligação de tau a microtúbulos, contendo quatro domínios de repetição R1, R2, R3 e R4 também chamados de domínios de ligação de microtúbulos, e uma região terminal C (MARTIN, 2012). A fosforilação da tau é regulada pela relação entre a tau quinase e as atividades da fosfatase. Caso haja algum desequilíbrio isso pode dar origem a uma fosforilação anormal dessa proteína, podendo favorecer para a agregação de tau (ROBBINS e COTRAN, 2010).

**Figura 14: Principais isoformas da proteína Tau no cérebro adulto.** Diferem pela presença ou não de domínios aminoterminais ricos em prolina (E2 e E3) e também de quatro domínios de ligação aos microtúbulos.

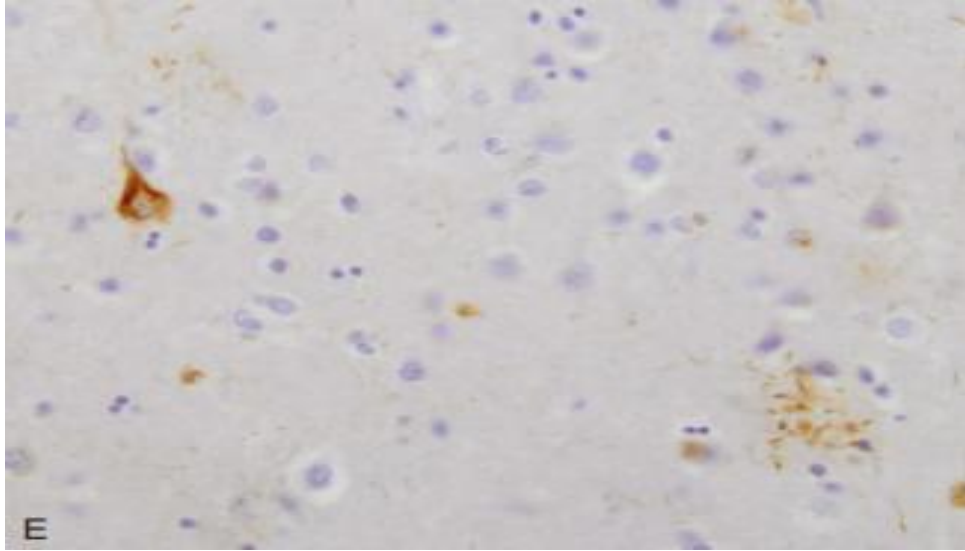


Fonte: PAULA (2009)

Então quando existe algum nível de desequilíbrio que afete, diretamente ou indiretamente, esses fatores de ativação ou formadores dessas proteínas, existe uma maior chance de ocorrer a desregulação e, por fim, o acúmulo desses compostos no organismo (**Figura 15**), prejudicando assim o funcionamento dos neurônios, causando a sua inativação e morte. A importância desse monitoramento na fase pré-clínica da DA é capaz de auxiliar no diagnóstico final, por conta das alterações quantitativas que vão ocorrer, causando uma fisiopatologia caracterizada pelo acúmulo de proteínas.



**Figura 15: Corte histológico de córtex cerebral.** Imunohistoquímica para Tau, evidenciando a presença de emaranhado (superior esquerdo) e neuritos ao redor de uma placa (superior direito).



Fonte: ROBBINS & COTRAN (2010)

### 1.3.5. Proteína Amilóide

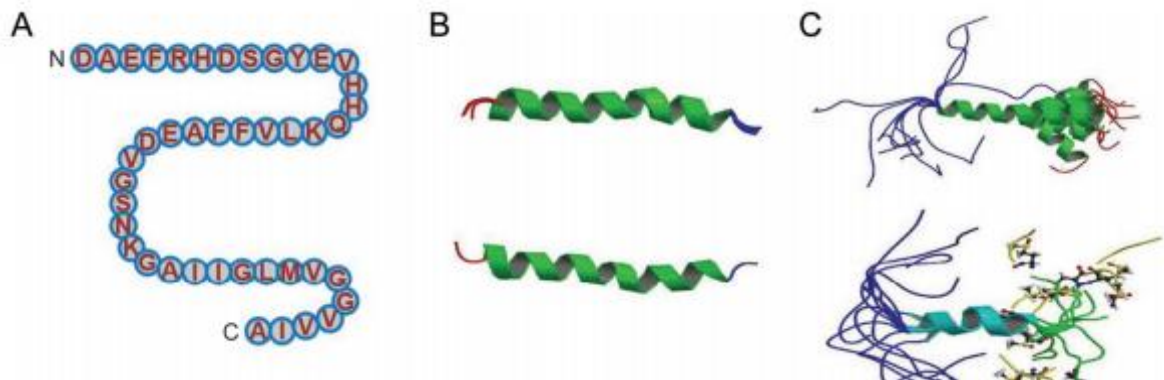
Os depósitos amilóides (**Figura 16**) se encontram dispostos no espaço extracelular em vários tecidos e órgãos do corpo, em várias situações (ROBBINS & COTRAN, 2010). A aglomeração de amilóide pode existir e com isso é preciso fazer a sua identificação, que é feita com base no uso de microscópio óptico e colorações específicas, para que haja uma diferenciação de outros depósitos hialinos, como colágeno por exemplo (HAASS, 2007).

De acordo com Robbins & Contran (2010) A natureza química do amilóide é composta em aproximadamente 95% de proteínas fibrilares, e suas formas mais comuns são:

- Amilóide de cadeia leve (AL), derivada das cadeias leves das Igs (imunoglobulinas) produzidas nos plasmócitos;
- Proteína Associada ao amilóide (PAA), derivada de uma proteína não Ig peculiar sintetizada pelo fígado;
- Proteína amilóide A $\beta$ , produzida pela proteína precursora do  $\beta$ -amilóide, que é encontrada nas lesões cerebrais da DA.

Os peptídeos  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ ) envolvidos na patologia da DA possuem 36-43 aminoácidos e são liberados pela proteólise de uma proteína precursora importante, a APP (ROBBINS & COTRAN, 2010).

**Figura 16: Estrutura do amilóide.** (A) Sequência de aminoácidos primária da isoforma A $\beta$ 42. (B) Estrutura do peptídeo A $\beta$ , em forma alfa-helicoidal, predominantemente. (C) Estrutura de peptídeo A $\beta$  (1-40).



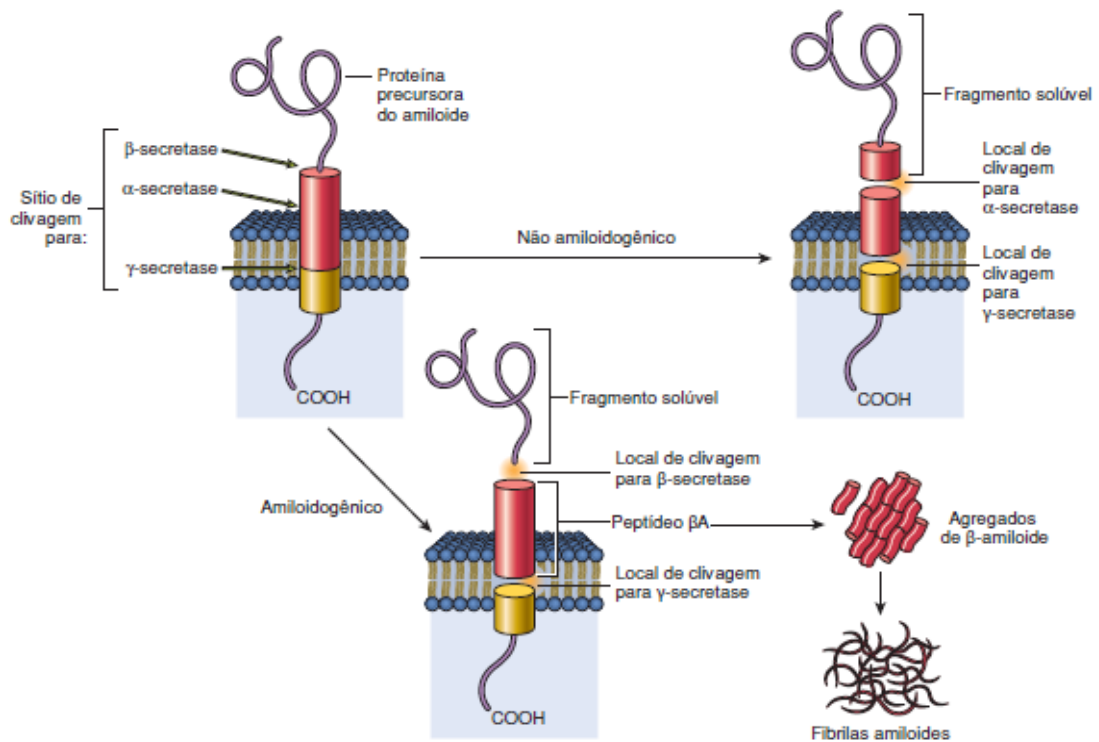
Fonte: CHEN (2017)

Segundo Robbins & Cotran (2010) o processamento se dá a partir da clivagem da parte extracelular, e em seguida ocorre a clivagem na parte transmembranaral da APP. Existem duas vias potenciais, que são determinadas pelo tipo de evento proteolítico. Se o primeiro corte ocorrer pela  $\alpha$ -secretase, então o peptídeo  $\beta$ A não será formado, caracterizando a via não amiloidogênica. Isso acontece com maior frequência, já que um maior número de enzimas com atividade de  $\alpha$ -secretase estão envolvidas com o processamento de proteínas de superfície. A proteína precursora amilóide (APP) da superfície pode ser clivada pela beta secretase 1 (BACE1), que vai cortar a porção terminal da APP, caracterizando a via amiloidogênica.

Após a clivagem em qualquer um desses dois sítios, o complexo  $\gamma$ -secretase vai atuar clivando a porção localizada na região transmembranaral. Quando combinada com o corte da  $\alpha$ -secretase, vai criar um fragmento solúvel, mas quando combinada com o corte da BACE1 vai ocorrer a formação do peptídeo  $\beta$ A (**Figura 17**).

A maioria das mutações que ocorrem no gene da APP relativas a DA resultam na reposição de aminoácidos (AAs) dispostos dentro ou externamente ao fragmento A $\beta$  (BERTRAM & TANZI 2003) predispondo o domínio da via amiloidogênica, acarretando numa grande produção do peptídeo  $\beta$ A, principalmente o que possui 42 aminoácidos, pois formam fibrilas mais facilmente e é mais amiloidogênico. Além do aumento da atividade das secretases, como a BACE1. (NITRINI e TAKADA, 2011).

**Figura 17: Mecanismos de processamento da proteína precursora amilóide (APP).** Evidência da proteína precursora amilóide e os sítios de clivagem (região superior esquerda), a via não amiloidogênica (região superior direita) e a via amiloidogênica (inferior). (, 2010)



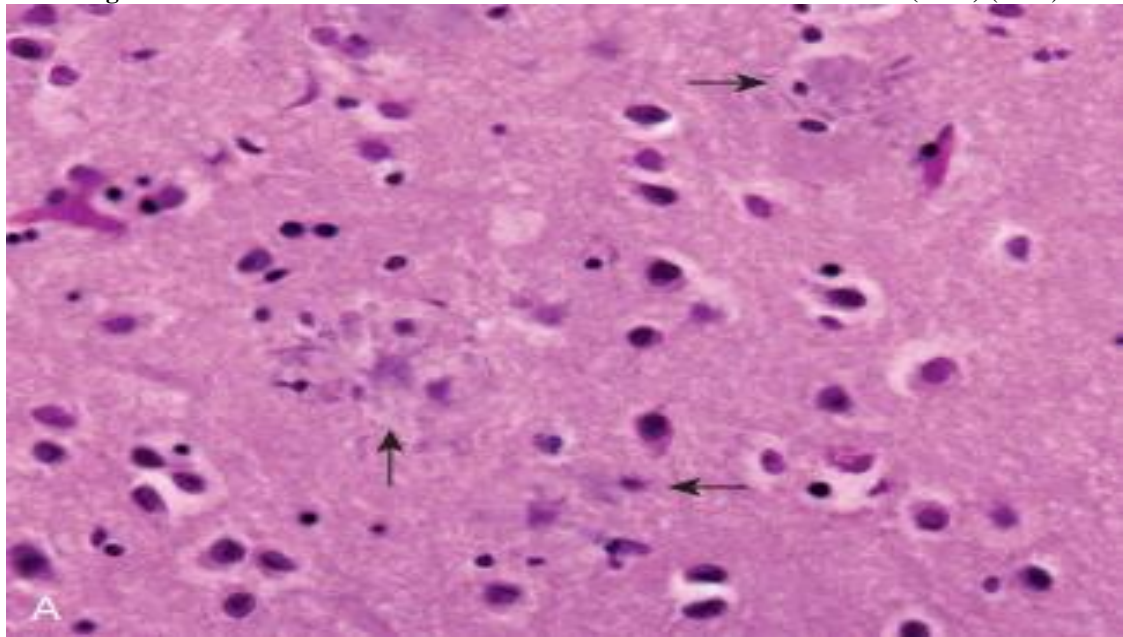
**Fonte:** ROBBINS & COTRAN (2010)

A formação desses peptídeos induz efeitos tóxicos em cultura de células, aumentando o potencial de AAs excitatórios, aumento de cálcio intracelular, formação de radicais livres e ativação da microglia, além de possuir toxicidade sobre sinapses (SELKOE, 2006).

De acordo com estudos que surgiram no período da década de 90 foi possível identificar uma hipótese de que a DA se dá por conta do acúmulo de placas derivadas da proteína beta amilóide (RIBEIRO, 2013) e dos NFTs (ROBBINS & COTRAN, 2010). As placas amiloides vão ser caracterizadas como formas esféricas derivadas de processos neuríticos distróficos, que são encontrados ao redor de um núcleo central de amilóide. As placas são encontradas na região do hipocampo, amígdala e no neocórtex, em geral não sendo encontradas no córtex motor e sensorial (HENEKA, 2007).

Existem componentes importantes que fazem parte da formação das placas neuríticas (**Figura 18**), o que possui maior prevalência é o peptídeo beta amilóide ( $\beta$ A), dividido em duas espécies dominantes ( $\beta$ A40 e  $\beta$ A42), que vão ser formados devido a acontecimentos específicos derivados da formação de uma molécula maior, a proteína precursora amilóide (APP) (ROBBINS & COTRAN, 2010).

**Figura 18: Placas com neuritos distróficos ao redor de núcleos amilóides (setas) (2010).**



Fonte: ROBBINS & COTRAN (2010)

Existem situações em que ocorre a deposição de peptídeos  $A\beta$  que possuem uma cor característica de amilóide na ausência de reação neurítica atuante, dando início a formação das placas difusas, que são encontradas nas porções mais externas do córtex cerebelar, onde, de acordo com pesquisas feitas em pacientes com trissomia do 21 (Síndrome de Down), essas placas difusas vão representar a fase inicial da formação da placa (ROBBINS & COTRAN, 2010). Nessas placas existe a maior dominância de  $\beta A42$  (ROVELET-LECRUX *et al.* 2006).

Segundo Das e Yang (2017) a BACE1 é uma enzima limitadora da velocidade na cascata amilóide, e pode ser considerado um alvo promissor para a terapia da DA. Como o processo de formação das placas constituídas por peptídeo  $\beta A$  já é conhecido, é possível então traçar um plano para se entender de que forma ocorre esse procedimento de acúmulo, com base no funcionamento da BACE1, e de que forma isso vai afetar o organismo no decorrer da DA.

#### 1.4. BACE1

A Beta-Secretase1, BACE1, é uma protease transmembrana que é responsável por clivar a APP no sítio  $\beta$ , o que leva a produção e liberação do peptídeo  $A\beta$  no cérebro. Por conta disso é possível afirmar que os estudos das secretases amiloidogênicas se fazem necessários para que haja um entendimento mais claro em relação aos métodos terapêuticos que vem sendo utilizados, para que ocorra uma mudança significativa no quadro da DA, em relação à deposição e acúmulo de peptídeos  $A\beta$  (COIMBRA *et al.*, 2018).

O fragmento C-terminal ligado a membrana é clivado pela  $\gamma$ -secretase, gerando o peptídeo A $\beta$  (HARDY e SELKOE., 2002; STROOPER e WOLFE., 2012). Essa clivagem ocorre em múltiplos locais, condicionando o peptídeo A $\beta$  em curto, mais solúvel e em formas benignas (TAKAMI *et al.*, 2009). Uma clivagem ineficiente acaba resultando na liberação de A $\beta$ 42, que é mais longa e propensa a agregação (STROOPER e WOLFE., 2012; GUTIERREZ *et al.*, 2012), e não da sua forma primária (A $\beta$ 40), podendo assim causar a formação da placa amilóide neurotóxica. Devido a esse papel fundamental na produção de A $\beta$ , o estudo de inibidores de BACE1 tem sido o foco principal do desenvolvimento de fármacos para DA (PRINCE *et al.*, 2013). Já que a DA ainda não tem cura existem medicações aprovadas para o seu tratamento, como a memantina. Porém esse medicamento não tem respaldo para a utilização nos estágios iniciais da doença.

Já foi visto em pesquisas que o desenvolvimento de inibidores baseados na sequencia do local de clivagem de APP possui uma capacidade de inativar a BACE1. Algumas limitações são enfrentadas quanto a utilização desses inibidores, como a localização da BACE1 no cérebro, já que ele precisa atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e as membranas neuronais para que chegue ao alvo (BEN HALIMA *et al.*, 2016). Também já foi visto que, embora os inibidores peptidomiméticos sejam muito potentes *in vitro*, suas características farmacológicas são ainda responsáveis por sua baixa eficácia *in vivo*, e isso se dá por problemas relacionados a transição desses inibidores para pequenas moléculas penetrantes no cérebro (OEHLRICH *et al.*, 2014). Efeitos tóxicos de inibição cruzada se mostraram presentes em alguns estudos, e foi verificado que, para prevenir esses efeitos, é preciso garantir que os inibidores de BACE1 possuam características seletivas em relação a outras proteases aspárticas, já que essas enzimas estão relacionadas entre si (GHOSH e OSSWALD, 2014).

Em experimentos realizados com ratos que tiveram a ação da BACE1 inibida, foram apresentados problemas como disfunção sináptica, retinopatia e ataques epiléticos. Esses acontecimentos se deram por conta da anulação da clivagem da BACE1, onde não havia a liberação do seu substrato. Sendo assim os inibidores de BACE1 ainda podem exibir uma toxicidade por conta do seu mecanismo (BARÃO *et al.*, 2016). Então, além de mais estudos relacionados aos inibidores de BACE1, é preciso haver uma atenção maior quanto à dose que será administrada.

O foco dos estudos relacionados a inibidores de BACE1 vem desenvolvendo soluções que possam atuar seletivamente em BACE1, em testes pré-clínicos. Segundo Yan, 2016 e

Mullard, 2017 algumas drogas já foram desenvolvidas e já estão sendo testadas em pacientes com risco de DA e pacientes diagnosticados com DA moderada. Essas drogas são:

- Atabecestat;
- CNP520;
- Elenbecestat;
- Lanabecestat;
- Verubecestat.
- LY2886721
- NCT01350362 (Tideglusib; Nypta® )

A Verubecestat foi a primeira droga a chegar a fase clínica 3, porém o seu estudo foi interrompido por conta da sua ineficácia na resolução do declínio cognitivo e por possuir uma taxa de risco bastante elevado (STAFF, 2017; MERCK, 2018). Para esse estudo foram escolhidas duas drogas que estão em fases de teste 2 e 3, que são a CNP520 e Elenbecestat.

Apesar dessas consequências desagradáveis evidências já comprovam que a inibição de BACE1, por deleção, em modelos animais adultos tratados para possuírem características da DA, mostrou uma reversão completa da patologia amilóide (COIMBRA *et al.*, 2018). Com base nos conhecimentos estruturais sobre a BACE1 foi possível prosseguir com as pesquisas acerca de novos inibidores.

#### **1.4.1. Elenbecestat**

É um inibidor de BACE 1 que está em desenvolvimento pela Eisai Co. Ltd. Que é uma das principais companhias farmacêuticas mundiais. Ele é um inibidor oral que vem sendo investigado em estudos clínicos de fase III para a DA. Ao inibir a BACE, principal enzima envolvida na produção dos peptídeos A $\beta$ , o Elenbecestat auxilia na redução da produção de A $\beta$ , guiando a uma redução na formação de placas amilóides, que são causadas pela agregação de oligômeros tóxicos e protofibrilas no cérebro. (EISAI GLOBAL, 2018)

Segundo dados da própria companhia farmacêutica, atualmente já existem dois estudos clínicos globais, de fase III, com essa droga. Ela está sendo analisada para utilização no início da DA, onde inclui comprometimentos cognitivos leves, e os estágios iniciais da DA leve. Essa droga está sendo desenvolvida e testada nos EUA, onde a Food and Drug Administration (FDA), que é uma agência federal do Departamento de Saúde e Serviços humanos dos Estados Unidos, concedeu um processo que determina um grau de prioridade

para medicamentos que são classificados como um grande potencial para tratar doenças graves e atender às principais necessidades médicas não atendidas. (EISAI GLOBAL, 2018)

A companhia farmacêutica divulgou na Conferência Internacional da Associação de Alzheimer dois estudos de fase I demonstrando que essa droga reduziu as concentrações de A $\beta$  no cérebro e LCR de ratos e cobaias, e também ocorreu redução de A $\beta$  no LCR de primatas não humanos (PANZA *et al.*, 2018). Um desses estudos, caracterizado como double-blind, controlado por placebo de forma oral, era administrado em dose única crescente (doses de 5 a 800mg) em uma quantidade de 73 voluntários adultos saudáveis, e demonstrou uma redução significativa de A $\beta$  no plasma, de maneira dose-dependente. Elenbecestat demonstrou também uma tolerabilidade aceitável, em estudos clínicos de fase II em todas as doses utilizadas, mas apresentou efeitos adversos comuns, como dor de cabeça e tontura. Os resultados demonstraram uma diferença estatisticamente significativa em níveis de A $\beta$  no cérebro, que foram medidos PET. Este estudo, realizado com 70 pacientes, é o primeiro estudo de um inibidor de BACE realizado para demonstrar uma diferença significativa de A $\beta$  no cérebro. (EISAI GLOBAL, 2018)

A própria companhia desenvolvedora dessa droga denominou os testes com o Elenbecestat como “estudo 202” (ClinicalTrials.gov identificador NCT02322021). Esse é um estudo de fase II que possui o tempo inicial de 18 meses. Ele é multicêntrico, randomizado, double-blind e controlado por placebo em pacientes com comprometimento cognitivo leve devido a DA, ou leve a moderada, que foram caracterizadas como uma patologia amilóide confirmada por meio de exame PET. (EISAI GLOBAL, 2018)

Dos 70 pacientes que foram randomizados, parte deles foram testados com a droga em questão, em medidas crescentes (5, 15 e 50mg) ou placebo, de maneira diária. Durante o período de testes, parte dos pacientes que estavam utilizando as doses de 5mg e 15mg de elenbecestat passaram a utilizar 50mg e, junto com os que já utilizaram 50mg, totalizaram 38 indivíduos, onde eles ficaram aproximadamente 11 meses utilizando 50mg de elenbecestat por dia. O resultado final da utilização da droga demonstrou um perfil aceitável de segurança e tolerabilidade ao longo de 18 meses de administração. Os eventos adversos ocorreram no grupo que ingeria 50mg do fármaco, e variavam desde dermatite, infecção do trato respiratório superior até cefaleia e diarreia. Não foram observadas reações adversas graves de toxicidade hepática. (EISAI GLOBAL, 2018)

Ao falar sobre esses testes realizados pela companhia farmacêutica, é necessário falar que também foi analisada uma escala numérica para quantificar a gravidade dos sintomas de

demência, a Clinical Dementia Rating (CDR). Essa classificação se dá por um profissional de saúde que é qualificado para avaliar o desempenho cognitivo e funcional de um paciente em seis áreas diferentes: memória, orientação, julgamento e solução de problemas, assuntos comunitários, casa e hobbies e cuidados pessoais. A pontuação total das seis áreas analisadas é a pontuação CDR-SB, que é um método apropriado para avaliar a eficácia de fármacos terapêuticos direcionados ao estágio inicial da DA. A CDR-SB foi utilizada nesse estudo para determinar a eficácia em termos de sintomas clínicos, e o estudo demonstrou um declínio numericamente menor na CDR-SB para os pacientes que fizeram uso de 50mg de Elenbecestat. (EISAI GLOBAL, 2018)

#### **1.4.2. CNP520**

As empresas farmacêuticas Novartis e Amgen, juntamente com a Banner Alzheimer's Institute (BAI) anunciaram em 2017 uma colaboração a respeito de uma ação chamada Alzheimer's Prevention Initiative (API) (NOVARTIS, 2018). A partir dessa iniciativa, com base em um estudo denominado "Estudo de geração 1" (iniciado em 2015), eles decidiram dar continuidade à análise de um inibidor de BACE1, o CNP520, que é um inibidor seletivo oral de BACE1 com finalidade de prevenir ou retardar o aparecimento dos sintomas da doença de Alzheimer em uma população de alto risco, por conta da sua idade avançada e por carregarem uma ou duas cópias do gene APOE4. Já que os que os que possuem uma cópia vão dispor de uma maior atividade cerebral amilóide (NOVARTIS, 2018).

#### **1.4.3. Características funcionais e estruturais do CNP520**

O "Estudo de geração 1" é um estudo de fase II/III, double-blind, controlado por placebo, que avaliou a segurança tolerabilidade, farmacocinética (PK) e farmacodinâmica (PD) de CNP520 em doses variadas (1mg, 10mg, 25mg e 75mg). Esse estudo buscou avaliar principalmente os efeitos da terapia analisando as características amilóides e cognitivas (ClinicalTrials.gov Identificação: NCT02565511). Indivíduos cognitivamente saudáveis, com dois genes APOE4 (apolipoproteína 4) e com idade entre 60 e 75 anos, foram selecionados como uma população de risco de progressão para comprometimento cognitivo leve e/ou demência devido à doença de Alzheimer (Clinical Trials, 2018). Os participantes também tinham que atender aos requisitos para participarem dos testes e, além de passarem por dois exames PET durante o andamento do estudo, eles faziam exames PET adicionais, coleta de



sangue e LCR, de maneira voluntária. Segundo o site ClinicalTrials.gov, esse estudo tem uma data de conclusão primária para 30 de Agosto de 2024.

Os critérios para participação nesse teste foram:

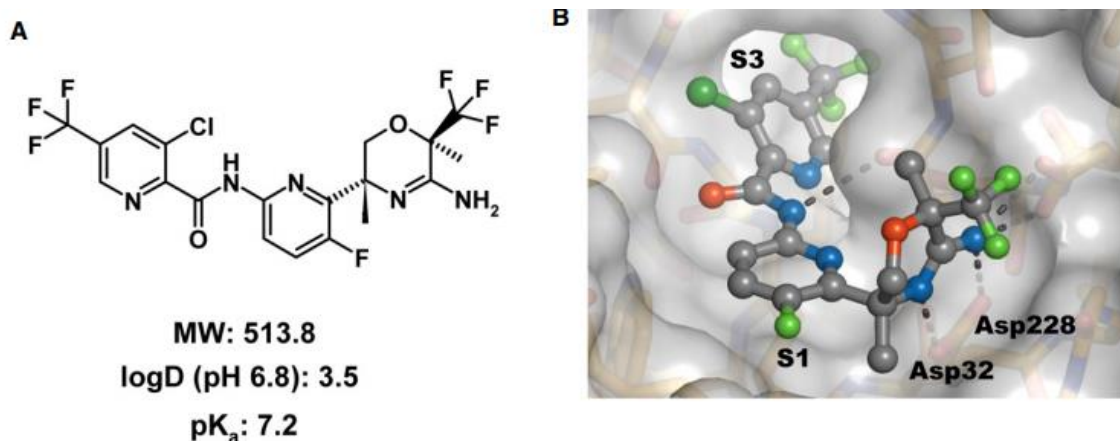
- Consentimento para receber a divulgação de suas estimativas de risco para desenvolvimento de sintomas clínicos da DA com base em seu genótipo APOE;
- Homens ou mulheres, com idade entre 60 e 75 anos. As mulheres devem consideradas pós-menopáusicas e não ter potencial para engravidar;
- Ter pontuação total do mini exame de estado mental (MEEM) maior ou igual a 24, até 3 meses antes do início do estudo, e ter atividade cognitiva não comprometida, com base nas avaliações e testes de memória realizados anteriormente ao início do estudo;
- Possuir genótipo APOE4 homozigótico;
- O Participante precisa dispor de boa vontade para participar do estudo com os outros participantes.

Outro estudo (NEUMANN *et al.*, 2018) afirmou que o perfil de CNP520 possui seletividade, PD e uma distribuição adequada para estudos de prevenção de DA. Além de demonstrarem uma redução de A $\beta$  em LCR de ratos e cães, juntamente com a redução da deposição de placas beta amilóides em camundongos APP-transgênicos. Para isso foi utilizado CNP520 sintetizado pela Global Discovery Chemistry junto aos departamentos de pesquisa e desenvolvimento técnico da Novartis, Basel, Suíça e Xangai, na República popular da China, segundo Badiger *et al* (2013), onde houve uma observação quanto ao bom desempenho do processo de fabricação clínica.

As prioridades desse estudo foram o desenvolvimento de uma substância com uma alta qualidade de penetração cerebral, com o ideal de minimizar a exposição periférica e o risco associado aos efeitos colaterais, com seletividade ideal para BACE2 e cateptinas, buscando evitar interações relevantes com esses não alvos, e uma substancia sem elementos estruturais que possam ser mutagênicos ou genotóxicos (NEUMANN *et al.*, 2018).

Esse mesmo estudo demonstrou que as características estruturais e funcionais de CNP520 são diferentes dos inibidores estudados anteriormente, e isso foi descoberto, pois eles conseguiram apresentar a estrutura de CNP520 pela primeira vez (**Figura 19A**), o que resultou em uma extensa otimização a respeito da compreensão as ligação de CNP520 e BACE1 (**Figura 19B**).

**Figura 19:** A) Estrutura molecular de CNP520. O coeficiente de partição ( $\log D/\text{Com tampão } 6,8$ ) de 3,5 é considerado disponível para desenvolvimento de um fármaco oralmente disponível e penetrante no cérebro; B) Estruturas de raio-X de CNP520 ligado ao sítio ativo de BACE1, com ligação em S1 e S3, além de resíduos catalíticos Asp31 e Asp228.

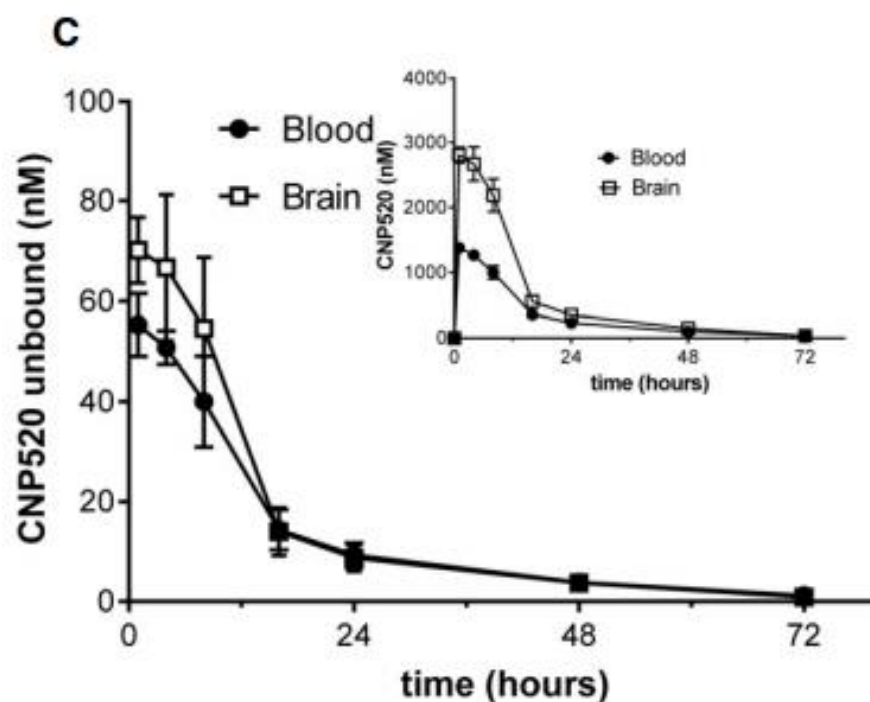


Fonte: NEUMANN (2018)

Um grupo amino-oxazina vai intervir nas principais interações de ligação entre Asp32 e Asp228 em BACE1 e, por ser a parte mais polar da molécula, vai determinar as características de permeabilidade, já que, de acordo com os inibidores encontrados anteriormente, foi possível afirmar que compostos com uma característica básica mais fraca vão demonstrar boa permeação passiva de membrana (LERCHNER *et al.*, 2010). Sendo assim a basicidade da amidina cíclica de CNP520 foi ajustada para o  $pK_a=7.2$  pela introdução de um grupo trifluorometil que tem como função retirar elétrons. Além disso, eles analisaram a existência de um grupo na posição 2 do anel de oxazina que poderia diminuir a ligação de CNP520 à P-gp (glicoproteína P), que é um importante transportador de drogas localizado na BHE responsável pelo efluxo de drogas, e esse transporte de drogas para o cérebro é determinado pelo equilíbrio entre a permeação passiva dos vasos sanguíneos e o transporte para fora é mediado pela P-gp (MEREDITH *et al.*, 2008). Isso foi comprovado com base num experimento realizado *in vitro*, onde indicava as propriedades de CNP520 em células Madin-Darby de rim canino (MDCK), onde elas também expressam P-gp humana (RUEEGER *et al.*, 2011). Esse estudo demonstrou que a taxa de transporte apical para basolateral de  $5,6 \times 10^{-6}$  cm/s indicou uma boa permeação passiva de membrana, enquanto a taxa de transporte basolateral para apical, de  $14,3 \times 10^{-6}$  conduzida por P-gp, não foi substancialmente superior (NEUMANN *et al.*, 2018). Dados *in vitro*, do mesmo estudo, agora realizado com ratos, mostrou que as concentrações de CNP520 não ligadas são comparáveis no cérebro e no sangue, o que confirma que o efluxo significativo não ocorreu, onde foi medido os níveis de

sangue e tecido cerebral de CNP520 num rato após uma dose oral de 30 $\mu$ mol/kg (15,4mg/kg). Isso foi demonstrado no **Gráfico 1**, demonstrando a fração não ligada e os níveis totais de CNP520 no sangue e no cérebro.

**Gráfico 1:** Nível sanguíneo e cerebral de CNP520 em modelo murino após dose oral do medicamento.



Fonte: NEUMANN (2018)

Para os ensaios de inibição enzimática *in vitro*, buscando determinar a potência de CNP520 em vias aspartil-proteases foram utilizados domínios catalíticos recombinantes e substratos pépticos desativados por fluorescência, segundo Neumann *et al*, 2015. Os ensaios celulares de AB foram realizados em células CHO (Chinese hamster ovary) que foram transfectadas com APP humano e humano wild-type, também descrito por Neumann *et al*, 2015, assim como os métodos empregados nos estudos de PK/PD (PK/PD) em ratos e cães. Os ratos machos (Sprague Dawley, entre 3 e 4 meses de idade) e camundongos C57BL / 6J (machos com 5 meses de idade) foram mantidos em grupos em condições controladas de temperatura, sob um horário claro/escuro 12/12 (NEUMANN *et al*, 2018). Os estudos de PK/PD dos cães foram realizados em cães Beagle machos (4 meses de idade), onde foram alojados individualmente sob condições climatizadas em jaulas, com espaço para exercício e iluminação fornecida por 12 horas por dia. Camundongos transgênicos APP23, fêmeas e machos, foram utilizados, pois expressam APP751 humano com mutações suecas, sob o

controle de Thy-1 (mesmo que CD90 – Proteína de superfície celular fortemente glicosilada) promotor (STURCHLER-PIERRAT & STAUFENBIEL, 2000).

Os estudos toxicológicos *in vivo* foram realizados de acordo com a orientação da International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) e de acordo com as Diretrizes Institucionais de Cuidados e Uso de Animais para o laboratório contratado e patrocinador. Após o experimento, para o desenvolvimento dos resultados, era feita a necropsia, e os tecidos eram fixados em imersão tamponada neutra a 10% ou solução de Davidson, e então eram processados por métodos de rotina para bloqueio de parafina e lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina. (NEUMANN *et al.*, 2018)

Para os animais serem tratados com o CNP520 foi preciso juntar o fármaco à alimentação ou então administrar oralmente. O veículo (0.1% de Tween-80 em 0.5% de metilcelulose em água) foi administrado oralmente num volume de 10 ml/kg uma vez por dia (no período da manhã) durante 8 semanas.

Alguns ensaios de inibição enzimática mostraram que CNP520 se mostrou um potente inibidor seletivo de BACE1, em relação a outras proteases aspárticas semelhantes a pepsinas humanas, incluindo BACE1 e CatD (Tabela 1) (NEUMANN *et al.* 2018). Na tabela 1 é possível verificar proteases aspárticas humanas e para BACE1 de ratos, onde os valores de IC50 (metade da concentração inibitória máxima) são médias de 3 grupos que usaram CNP520, cada grupo medido em duplicata. Os valores de IC50 para a inibição de AB40 de células CHO transfectadas com APP foram medidas entre 6 diferentes grupos que fizeram uso de CNP520 (cada um em triplicata, para wild-type APP) e três grupos diferentes (em triplicata, para “Swedish” APP).

**Tabela 1. Efeito inibitório de CNP520 em diferentes proteases.**

Enzimas	IC50 ± SEM (nM)
BACE1 Humana	11 ± 0.4
BACE1 Rato	10 ± 0.3
BACE2 Humana	30 ± 1.0
Catepsina D Humana	205,000 ± 28,200
Catepsina E Humana	66,400 ± 13,000
Pepsina porcina	> 250,000
Células CHO (APP wild-type)	2.8 ± 0.2
Células CHO (APP "Swedish")	44 ± 0.4

NEUMANN *et al.*, 2018

Em seguida foi descoberto que CNP520 não causa efeitos colaterais relevantes. Essa ocorrência se dá pela alta especificidade de CNP520 para BACE1, onde foram testadas doses do fármaco em camundongos C57/BL6 por 8 semanas e os resultados foram comparados com a utilização de NB-360 (classe de inibidor), como controle positivo, que é um inibidor de BACE1 e BACE2, que leva a uma despigmentação capilar em camundongos, devido ao processamento reduzido de PMEL17, que é uma proteína de melanócitos específica de células responsáveis pela pigmentação (SHIMSHEK *et al.*, 2016) retirada do artigo legal.

O inibidor NB-360, utilizado nos animais controle, demonstrou alta despigmentação em todos os animais utilizados, tendo início entre a segunda e terceira semana. Diferentemente do CNP520, que não demonstrou quaisquer alterações em órgãos como folículo piloso, coróide e epitélio pigmentado da retina (NEUMANN *et al.*, 2018). Esse resultado surpreendeu os pesquisadores, pois não se esperava que a seletividade para BACE1 fosse suficiente para causar um resultado tão marcante. Dessa forma, eles pensaram que as concentrações dos inibidores, já conhecidas, relacionadas com suas respectivas potências para BACE2, teriam um papel na determinação do nível de inibição de BACE2 e se ocorreria a despigmentação. Para isso foi necessário determinar as concentrações totais dos inibidores na pele de camundongos tratados, e calcular as razões entre essas concentrações para que atingisse 50% de inibição (IC50) de BACE2 (**Tabela 2**).

**Tabela 2: Redução da proteína beta amilóide (A $\beta$ 40) em diferentes doses de CNP520 e NB-360, e concentração na pele destas drogas.**

	Dose mg/kg	% de AB40 em cérebro de veículo sozinho	Concentração total na pele/IC50 em BACE2
CNP520	4	55%	160
	25	8%	460
NB-360 (controle)	9	66%	1700
	45	32%	11400

NEUMANN *et al.*, 2018

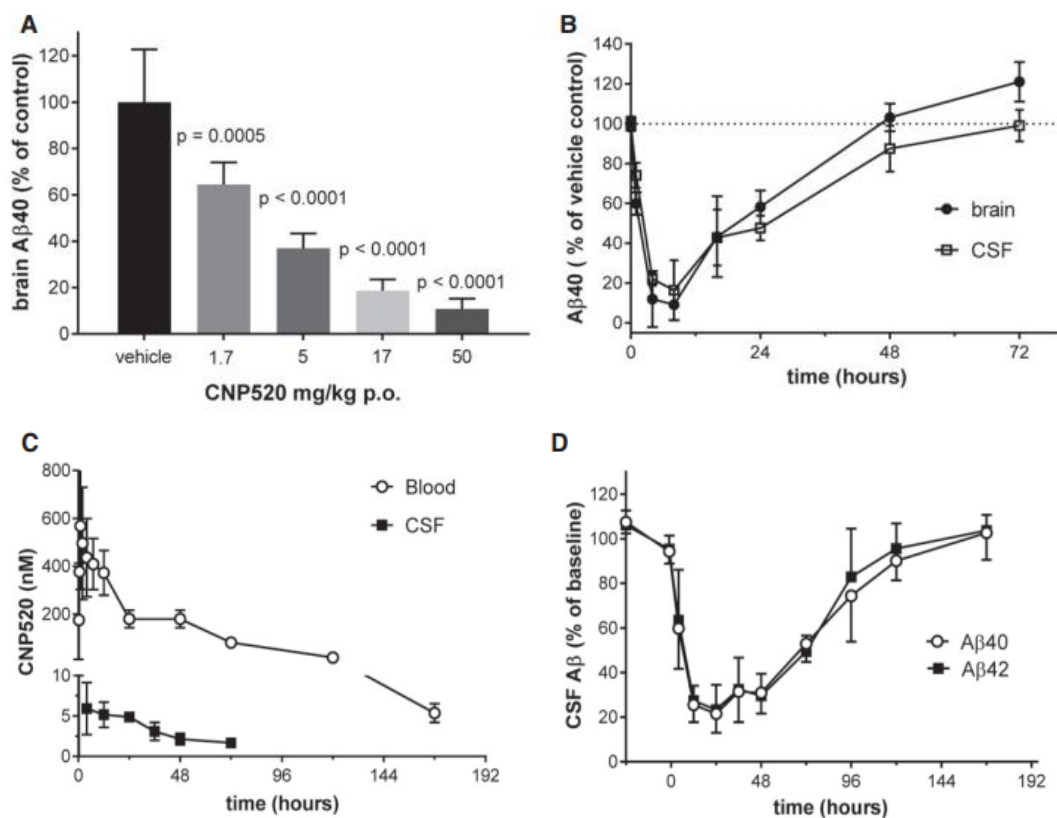
#### 1.4.4. Administração oral de CNP520 em ratos e cães

Os imunoenaios de eletroquimioluminescência foram realizados para determinar e avaliar AB40, Ab42, sAPP $\alpha$  (Proteína precursora amilóide solúvel  $\alpha$ ) e sAPP $\beta$  (Proteína precursora amilóide solúvel  $\beta$ ). Os estudos de AB40 endógenos nos ratos e camundongos com Triton X-100 a 1% de um kit de ensaio 4G8, para quantificação de acordo com o fabricante. O LCR foi coletado da cisterna magna e analisado pelo kit 4G8. Nos cães o LCR foi coletado e analisado com o kit Mesoscale Diagnostics. (NEUMANN *et al.*, 2018)

Foi mensurada também a quantidade de A $\beta$ 40 em tecido cerebral de ratos, após 4 horas da administração oral de CNP520 em doses diferentes, onde foi visto um comportamento dose-dependente que demonstrou uma redução, quando comparado com os animais controle (**Gráfico 2A**). Segundo Neumann, 2018, a dose oral necessária para reduzir AB40 em cérebros de ratos foi de 2.4 +/- 0.31 mg/kg. Foi visto também que CNP520 demonstrou uma ação de longa duração em ratos, como indicado pelo **gráfico 2B**, que mostra uma redução de 50% de A $\beta$ 40 24 horas após uma dose oral única de 30  $\mu$ mol/kg (15.4 mg/kg), em LCR e cérebro de ratos analisados. Além disso foi possível observar uma característica semelhante das curvas na, o que demonstra que a PD existente no LCR reflete muito a do tecido cerebral. Seguindo nesse mesmo contexto, Neumann, 2018, utilizou um modelo canino para identificar mais detalhadamente essa semelhança entre as curvas, já que foi visto por Mattsson *et al.*, 2012, que a BACE1 canina apresenta cerca de 82,4% de identidade de sequência com a humana, o que é considerado alto por Neumann, e os efeitos dos inibidores no LCR de cães foram investigados por Mattsson. Foi então colhido LCR de cães da raça Beagle, de 3 meses de idade, ao longo de 7 dias após a administração oral de 3.1 mg/kg (6

1mol/kg) de CNP520, onde foi detectado o CNP520 no sangue por 192 horas e no LCR por 72 horas (**Gráfico 2C**). Foi então feita uma determinação da ligação inespecífica de CNP520 no plasma canino, que resultou em 97,5%, e se calculou a fração livre de CNP520 no sangue do cão. A relação entre o CNP520 não ligado ao LCR e o CNP520 não ligado ao sangue foi de 0.7, demonstrando que o fármaco é eficientemente distribuído para o compartimento central (NEUMANN *et al.*, 2018). Houve também uma redução de 75% nas concentrações de A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 no LCR 12-48 horas após o uso da dose, e os níveis retornaram lentamente durante os 7 dias seguintes (**Gráfico 2D**).

**Gráfico 2: Níveis de A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 dose-tempo dependente, avaliados em sangue, LCR e tecido cerebral de modelos animais.** A) Análise gráfica da administração de CNP520 em doses diferentes, onde os animais foram sacrificados 4 horas depois, para determinação de A $\beta$ 40 em tecido cerebral; B) Análise gráfica da redução de A $\beta$ 40, de forma tempo-dependente, em tecido cerebral e LCR após uma dose oral de 15.4 mg/kg do fármaco; C) Níveis de CNP520 no sangue e LCR canino, após a utilização oral de 3,1 mg/kg; D) Redução, tempo-dependente, de A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 no LCR canino, após uma dose oral de 3,1 mg/kg.

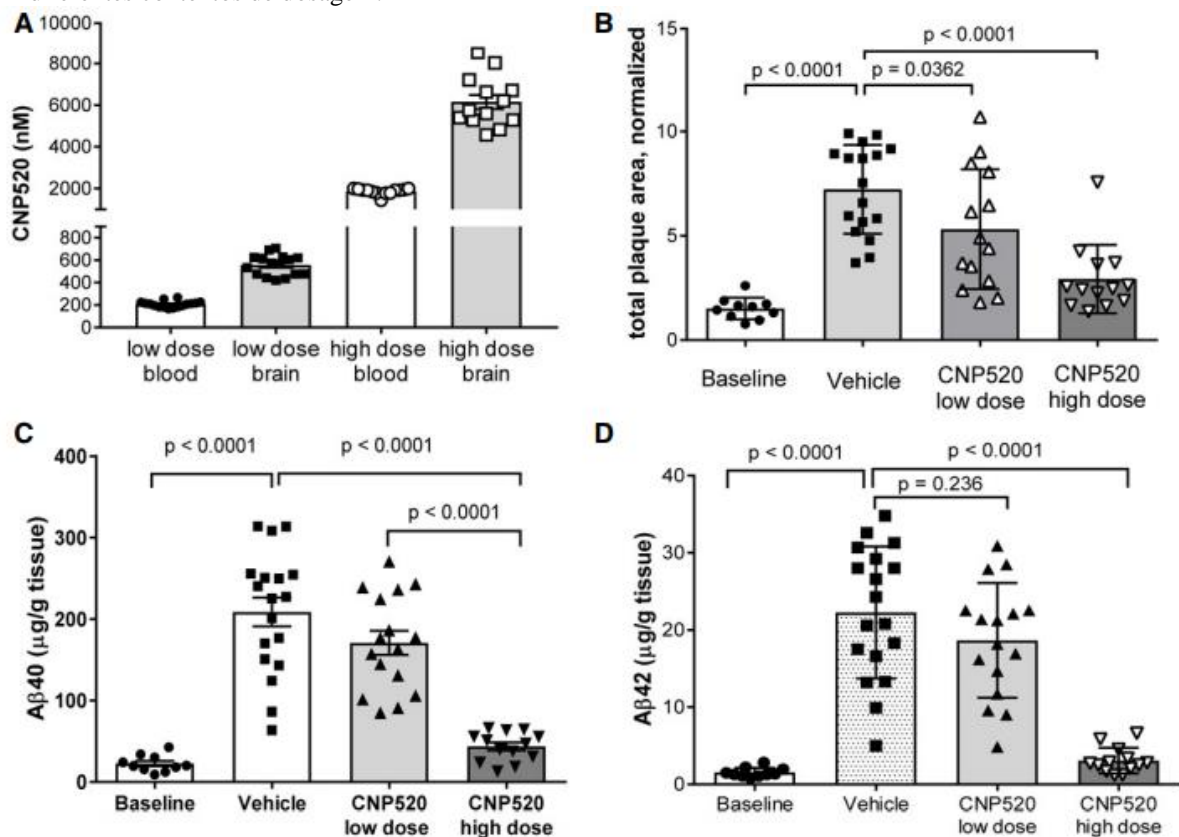


Fonte: NEUMANN (2018)

### 1.4.5. Tratamento terapêutico crônico de camundongos APP3 com CN520

Nesse mesmo estudo foi visto que CNP520 reduziu os níveis de A $\beta$  e a neuroinflamação em camundongos transgênicos. A concentração de CNP520 no sangue e no cérebro foi tida como proporcional à dose (**Gráfico 3A**). Nesse mesmo estudo foi feita uma técnica de imunohistoquímica, para examinar o Efeito do fármaco na deposição de A $\beta$ , com um anticorpo, NT12, que reconhece A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42. Foi visto que a área total de placas A $\beta$  (normalizada para a área da amostra) no córtex aumentou significativamente no grupo tratado com veículo, em comparação com os animais tratados, onde ocorreu uma diminuição nessas áreas de deposição (**Gráfico 3B**). A quantidade total de A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 foram determinadas por imunoenensaio de A $\beta$ . Comparado com camundongos tratados com veículo, a alta dose de CNP520 reduziu a deposição de A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42, mantendo-os próximos dos seus níveis basais (**Gráfico 3C e D**).

**Gráfico 3: Concentração de CNP520 em sangue e tecido cerebral e níveis de A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 em doses diferentes.** A) Níveis de CNP520 em sangue e tecido cerebral; B) Demonstração gráfica da área de placa cortical total corada com anticorpo NT-12; C) Níveis de A $\beta$ 40 em diferentes contextos de dosagem; D) Níveis de A $\beta$ 42 em diferentes contextos de dosagem.

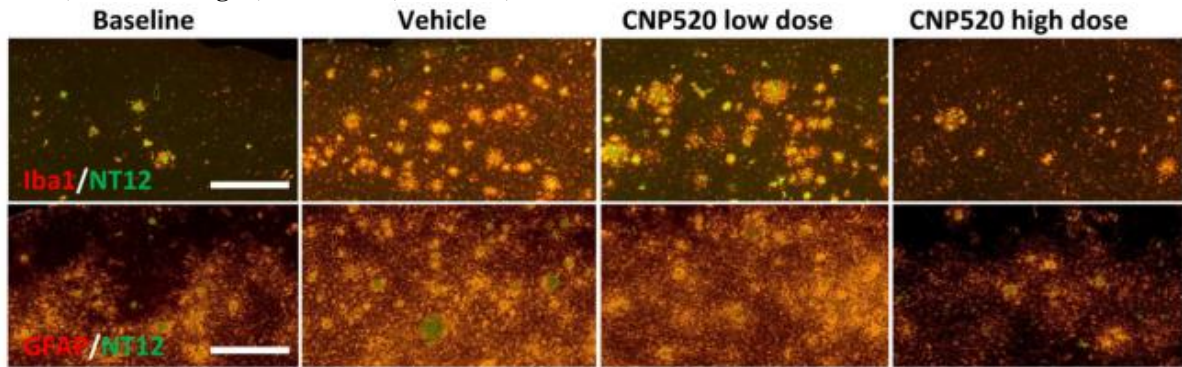


Fonte: NEUMANN (2018)



Para analisar os efeitos neuroinflamatórios foi feita uma coloração de dupla imunofluorescência com NT12 + anti IBA1 e NT12 + anti GFAP para verificar o número e localização da microglia e de astrócitos ativados, respectivamente (**Figura 20**).

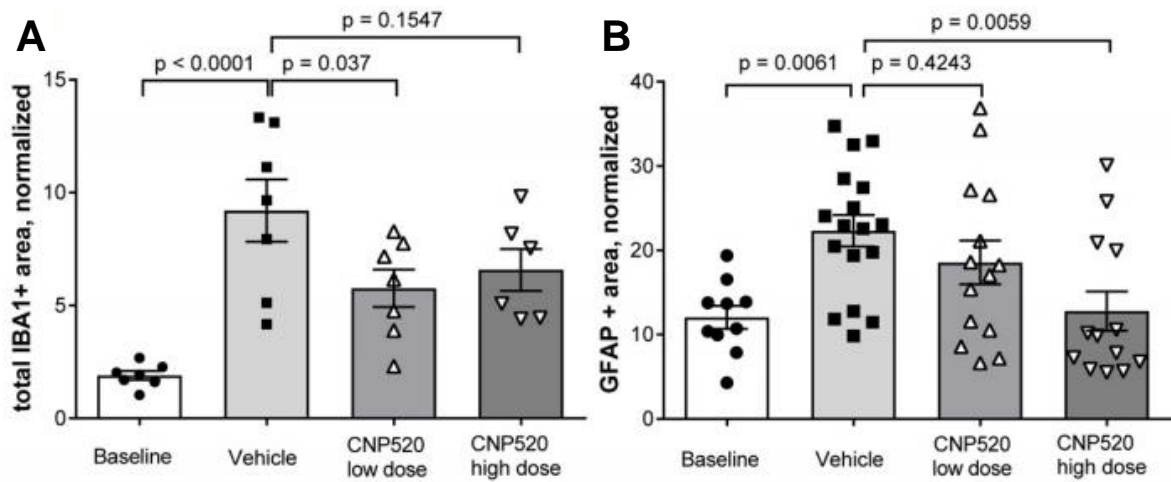
**Figura 20:** Seções de cérebro coradas com dupla imunofluorescência com NT12 (contra  $\beta$ -amilóide) e IBA1 (contra microglia) ou GFAP (astrócitos). Escala de 500nm.



Fonte: NEUMANN (2018)

Nos camundongos APP23 não tratados, os marcadores inflamatórios aumentaram aproximadamente 3 vezes quando comparados com os valores normais, indicando então que o CNP520 ajudou na prevenção do aumento de marcadores inflamatórios de uma forma dose-dependente, para astrócitos corados com anti-GFAP, mas não demonstrou o mesmo resultado para microglia corada com IBA1 (**Gráfico 4A e B**). Esse tipo de análise foi feita pois a superfície da placa  $A\beta$  é um local importante para a ativação das células da glia, então para o estudo de Neumann, 2018, foi decidida uma análise separada das respostas das atividades da microglia e astrócitos associados à placa, e não associados à placa com o tratamento de CNP520.

**Gráfico 4: Quantificação da microglia total para IBA1 (A) e quantificação da área total de astrócitos positivos para GFAP(B).**



Fonte: NEUMANN (2018)

Acredita-se que com base em pesquisas sobre a inibição da BACE1 no organismo é possível fazer com que indivíduos que já possuem a doença consigam diminuir a formação de placas  $\beta$ A, sem que isso cause alterações sinápticas num contexto mais generalizado. Decodificando os mecanismos moleculares que englobam a patogênese da DA é possível desenvolver abordagens terapêuticas que auxiliem no combate a progressão da DA.

Dessa forma é importante o questionamento a respeito do uso de medicamentos inibidores de BACE1 que vem sendo testados de forma clínica, de que forma eles são produzidos e como esses fármacos vão agir no organismo. Sendo assim, pretendemos investigar a eficácia de alguns medicamentos já testados, de acordo com a literatura, com base em seus resultados preliminares.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

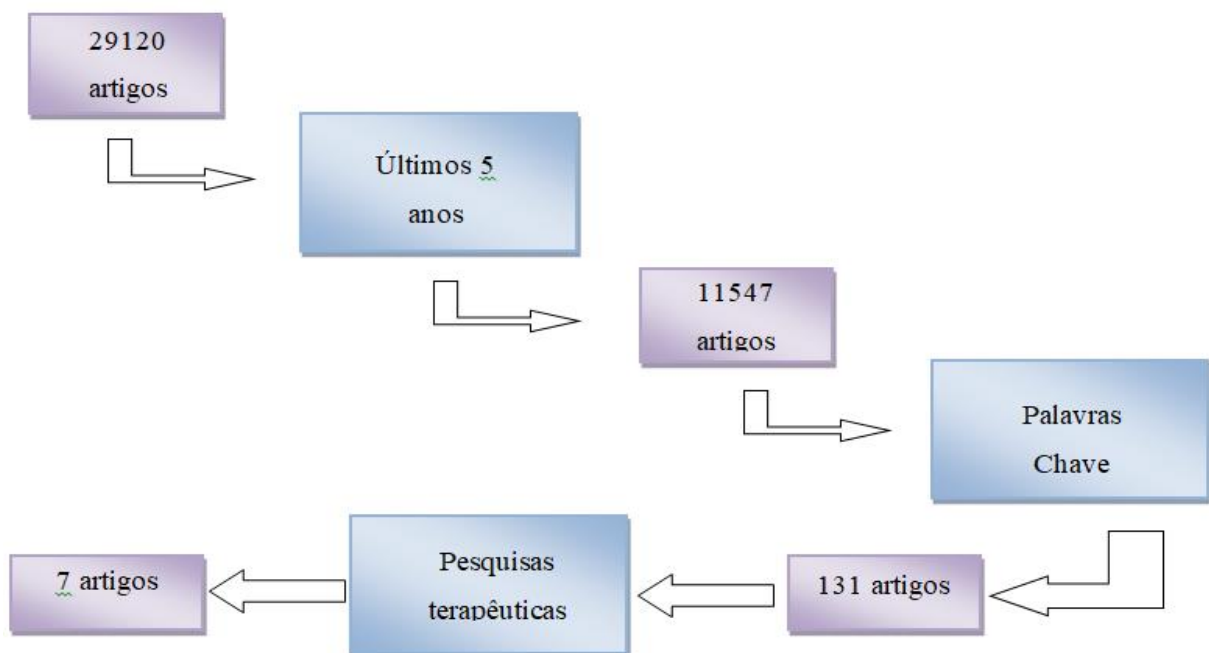
Realizar uma revisão de literatura sobre a utilização de fármacos que inibem BACE1 e seus efeitos em testes *in vitro* e *in vivo*, mostrando os avanços terapêuticos no contexto da doença de Alzheimer.

### 3. METODOLOGIA

A revisão de literatura foi desenvolvida para analisar o papel dos inibidores de BACE1, que uma enzima responsável pela formação de placas formadas por peptídeo beta-amiloide, como alvo de estudos terapêuticos para a DA.

Foram utilizadas plataformas de pesquisa como o **Períodicos CAPES** <[www.periodicos.capes.gov.br](http://www.periodicos.capes.gov.br)>; **ScienceDirect** <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)>; **PUBMED** <[www.ncbi.nlm.gov/pubmed/advanced](http://www.ncbi.nlm.gov/pubmed/advanced)>; **SciELO** <<http://www.scielo.br>>. Primeiramente a estratégia foi encontrar os assuntos relacionados, utilizando palavras chave. Nas plataformas foram utilizadas palavras como “biomarkers”, “markers”, “Alzheimer”, “tau protein”, “amyloid protein”, “cognition”, “neurodegenerative” e “aging” junto ao operador booleano “AND” e/ou “OR”, quando necessário, para combinar todas as buscas. Com isso foram encontrados um total de 29120 artigos. Quando restritos aos últimos 5 anos reduziram a 11547 artigos. A estratégia inicial foi encontrar os artigos dos últimos 5 anos, então utilizamos as palavras chave: biomarkers OR markers OR Tau protein OR  $\beta$ -amyloid peptide OR amyloid protein AND Alzheimer OR neurodegenerative AND BACE1 inibitor.

Foram encontrados 131 artigos, como resultado da busca. Seguiu-se a leitura dos resumos e seleção dos artigos onde foram testados inibidores de BACE em pesquisas com seres humanos. Destes, realizamos a apresentação de dados com enfoque no realizado terapêutico e discussão subsequente de 7 artigos com avaliação terapêutica.



#### 4. DESENVOLVIMENTO

Grande parte das pesquisas clínicas voltadas para DA vêm sendo exploradas para reduzir a evolução dos processos neurodegenerativos que precedem as manifestações clínicas da DA (BACHURIN *et al.*, 2017; CUMMINGS *et al.*, 2017). Tendo em vista esse tipo de análise, é possível compreender que a utilização de métodos que impeçam a formação de vias que vão auxiliar na progressão da DA, é um passo importante para pesquisas futuras.

Já foi visto que o acúmulo de proteínas A $\beta$  vai se apresentar de forma evidente no cérebro com DA e, com base na “hipótese da cascata amilóide”, esse acúmulo terá um papel fundamental na neuropatogenicidade da DA (KARRAN *et al.*, 2011; SELKOE e HARDY, 2016), já que esses agentes acumulados podem demonstrar uma intensa interação com receptores neuronais, podendo desencadear respostas como disfunção mitocondrial (HAUPTMANN *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2015), estresse oxidativo (CARVALHO *et al.*, 2016) e, como consequência, danos no DNA e neuroinflamação. Sendo assim, grupos de pesquisa vêm demonstrando a importância da utilização de substâncias que possam atuar como agentes anti-amiloidogênicos, que possam atuar na inibição da produção e agregação de Ab (KULSHRESHTHA e PIPLANI, 2016).

A tabela a seguir resume as principais informações extraídas dos sete estudos clínicos selecionados.

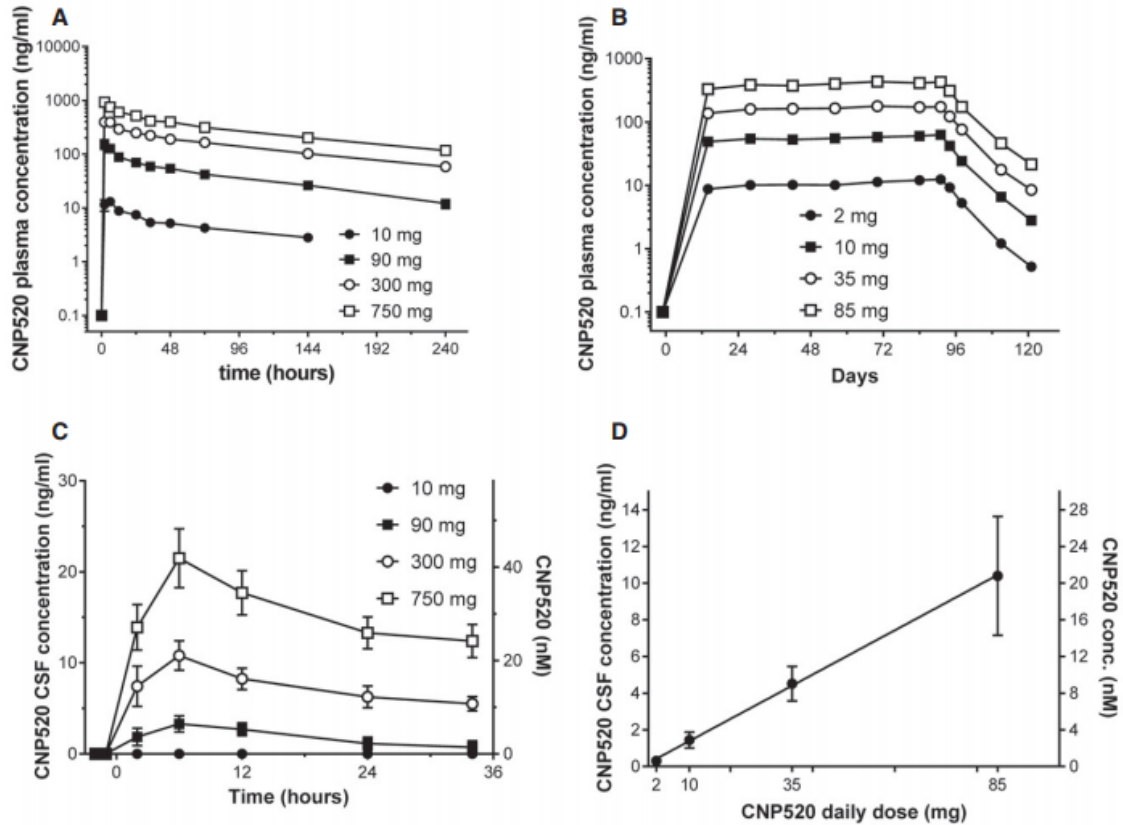
**Tabela 3: Dados sobre os artigos analisados para a discussão desse trabalho.**

<b>AUTOR/ ESTUDO</b>	<b>DROGA/VIA ORAL</b>	<b>DOSAGEM/ POSOLOGIA</b>	<b>NÚMERO DE PACIENTES/GRUPOS</b>	<b>TOXICIDADE/ EFEITOS ADVERSOS</b>	<b>RESULTADOS</b>
<b>May P.C. et al (2015)</b>	LY2886721 (Estudo em fase II - PAREXEL Early Phase)	Dose única: 10, 35 e 70mg.  Múltiplas doses: 5, 15, 35 ou 70mg 1x ao dia por 14 dias.	Foram escolhidos 93 voluntários que participaram dos 3 estudos.	Cefaleia, anormalidade no teste de campo visual, hipotensão ortostática, diminuição da libido, congestão nasal, dor torácica, herpes oral, infecção viral, espasmo muscular, tosse, insônia e erupção cutânea.	Inibição 10 vezes mais potente na inibição de BACE1.
<b>Lovestone S. et al (2015)</b>	NCT01350362 (Tideglusib; Nypta® - Estudo em fase II - ICON Clinical Research )	1000mg 1x por dia, 1000mg por 1 dia, 500mg 1x por dia e placebo. Entre 39 e 52 semanas de tratamento.	306 pacientes com doença de Alzheimer foram randomizados para o estudo.	Diarreia e resposta dose-dependente.	Redução nos níveis de BACE1 no LCR. Participantes com doença de Alzheimer moderada apresentaram respostas significativas em testes cognitivos (MMSE e ADAS-cog) e fluência de palavras.
<b>Cebers G. et al (2017)</b>	AZD3293 (Lanabecestat – Estudo em fase III - PAREXEL Early Phase)	Estudo com dose única ascendente: 1-750mg de AZD3293 ou placebo.  Estudo com dose múltipla ascendente: 15-50mg de AZD3293 1x por dia ou 70mg 1x por semana e 15,50 ou 150mg 1x por dia.	Voluntários jovens (18-55 anos), idosos (55-80 anos) e pacientes com doença de Alzheimer moderada (n=16). Total 119 participantes.	Não ocorreu eventos adversos graves e significativos.	Redução na concentração de Aβ40 e Aβ42 no plasma. Redução de peptídeo AB no plasma e LCR.
<b>Timmers M. et al (2017)</b>	JNJ-54861911 (Atabecestat – Estudo em fase I - Janssen Research and Development)	Estudo com dose múltipla ascendente de 5, 30, 50 ou 90mg, 1x por dia, de JNJ-54861911.	38 Voluntários saudáveis homens e mulheres com idade entre 55 e 75 anos.	Sem eventos adversos significativos.	Aumento nos níveis de BACE1 no LCR, em 8 pacientes não portadores do gene APOE4.
<b>Sakamoto K. et al (2017)</b>	AZD3293 (Lanabecestat – Estudo em fase I - AstraZeneca KK)	Estudo com dose única ascendente: 15, 50, 150mg e placebo. Administração no dia 1 em jejum.  Estudo com dose múltipla ascendente: 15 e 50mg e placebo. Administração 1x no dia 1 em jejum, seguido de doses repetidas 1x a partir do dia 3 durante 12 dias.	Voluntários saudáveis Jovens entre 20 e 55 anos (n=24) e idosos entre 55 e 80 anos (n=16)	Dor de cabeça, tontura postural, hipotensão ortostática, nasofaringite.	Perfil de segurança consistente, bem tolerado e obteve poucos efeitos adversos. Redução de peptídeos Aβ no plasma e LCR.
<b>Egan M.F. et al (2018)</b>	Verubecestat (Estudo em fase III - Merck Research Laboratories)	12mg por dia (grupo 1), 40mg por dia (grupo 2) e grupo placebo.	1958 pacientes foram submetidos a randomização. 653 para o grupo 1, 652 para o grupo 2 e 653 para o grupo placebo. Pacientes entre 55 e 85 anos com um padrão clínico para demência.	Erupções cutâneas, quedas e lesões, distúrbios do sono, ideias suicidas, perda de peso e mudança de cor do cabelo.	Não ocorreu redução do declínio cognitivo ou funcional em pacientes com doença de Alzheimer moderada, e foi associado a eventos adversos relacionados ao tratamento.
<b>Neumann U. et al, (2018)</b>	CNP520 (Estudo em fase III - Novartis Institute)	2,10, 35, 85 ( até essa quantidade -1x por dia por 3 meses), 90, 300 ( até essa quantidade - 1x ao dia por 2 semanas) e 750mg (dose única) de CNP520.	Adultos saudáveis com idade maior ou igual a 60 anos.	Eventos leves e transitórios de prurido.	Bom perfil de seletividade, alta penetração no cérebro e ausência de metabólitos tóxicos.

#### 4.1. Farmacocinética de cnp520 em adultos com idade $\geq$ 60 anos

Estudo farmacocinéticos em humanos saudáveis, com idade igual ou superior a 60 anos, mostrou que o CNP520 administrado em dose única apresentou uma taxa de absorção considerada moderada ( $T_{max}$  entre 1-8 horas após a dose), e o tempo médio de meia vida foi 61,3 – 83,8 horas em participantes adultos saudáveis e 81,4 – 109 horas em participantes com idade igual ou superior a 60 anos (**Gráfico 5A**). Essa taxa de meia vida longa demonstra que o fármaco é adequado para dosagem única diária em humanos (NEUMANN *et al.*, 2018). A exposição do CNP520 ao plasma aumentou no primeiro mês, nos participantes com idade igual ou superior a 60 anos, de acordo com o aumento da dose, após a administração de doses únicas e repetidas, porém permaneceu estável durante os dois meses adicionais de dosagem (**Gráfico 5B**). O LCR humano foi coletado de um cateter espinal interno inserido no canal medular inferior, ou por punção lombar, por pessoal treinado e conforme o procedimento operacional padrão. A análise deste mostrou que CNP520 foi distribuído de modo proporcional à dose (**Gráfico 5C e D**).

**Gráfico 5: Concentração de CNP520 em plasma e LCR.** A) Média de concentração plasmática X perfis de tempo após dose única; B) Média dos perfis de concentração plasmática para 91 dias de dosagem e concentrações pós-dose até o dia 121; C) Tempo X perfis de concentração de LCR após dose única de CNP520; D) Perfis de concentração Dose-LCR após 3 meses de dosagem.



Fonte: NEUMANN (2018)

#### 4.2. Efeitos da administração de CNP520 nos principais metabólitos de APP em LCR de participantes saudáveis com idade $\geq 60$ anos

Os níveis de  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$ ,  $sAPP\alpha$  e  $sAPP\beta$  no LCR foram quantificados com 0.2% (v/v) Tween-20, com o auxílio de métodos de eletroquimioluminescência. (NEUMANN *et al*, 2018)

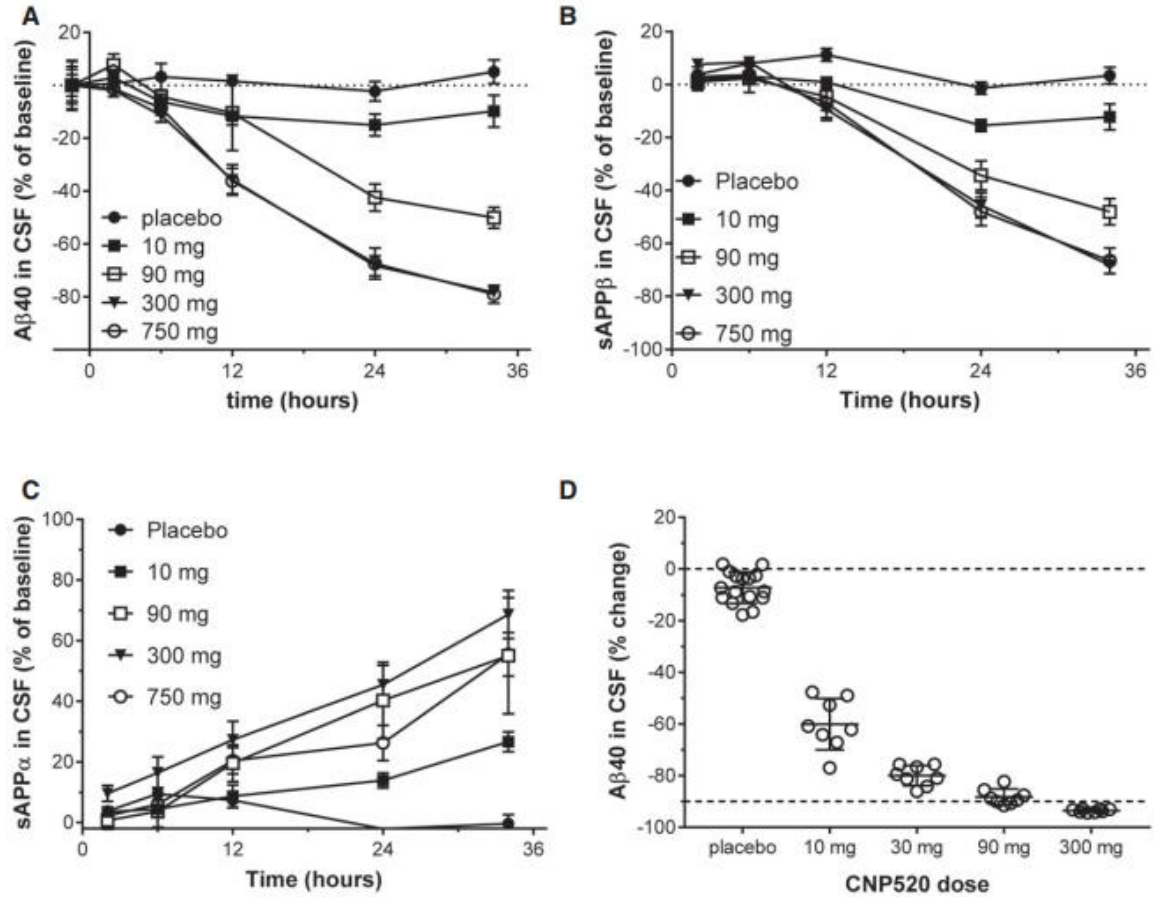
Segundo Blennow *et al*, 2010, a determinação dos produtos diretos de BACE1 e dos peptídeos  $A\beta$  no LCR permite uma avaliação do Efeito de CNP520 no processamento da APP no cérebro. Por conta disso, Neumann *et al*, 2018, decidiu analisar os níveis de  $A\beta$  e  $sAPP\beta$  no LCR de humanos por amostragem em série, utilizando um cateter intratecal. O CNP520 foi administrado em adultos com idade igual ou superior a 60 anos, em doses únicas (10, 90, 300



ou 750mg), e a coleta do LCR foi feita seis vezes, onde a primeira foi feita 2 horas antes da primeira dose, até 34 horas seguintes (NEUMANN *et al.*, 2018).

Foi observada uma redução nos níveis de A $\beta$ 40 no LCR, dependente da dose e do tempo (**Gráfico 6A**). O tratamento com CNP520 também levou a uma redução dose-dependente nos níveis de sAPP $\beta$  (**Gráfico 6B**) ao passo que houve um aumento de sAPP $\alpha$ , que é o produto da via não amiloidogênica do metabolismo da APP (**Gráfico 6C**). O posicionamento sobreposto das curvas relativas às doses mais altas (300mg e 750mg) sugere que o fármaco conseguiu inibir a BACE1 por nível de saturação, nas figuras 28A e C. O LCR foi analisado por punções lombares únicas no início e 24 horas após a última dose, onde foi possível analisar as mudanças nos níveis de concentração de AB também do início até o final do tratamento. Foi possível confirmar que houve uma redução dose-dependente de A $\beta$  nos participantes expostos ao fármaco, onde houve uma variação de  $59.8 \pm 9.88\%$  em uma dose diária de 10mg, e um máximo de  $93.9 \pm 2.09\%$  em uma dose diária de 300mg (**Gráfico 6D**) (NEUMANN *et al.*, 2018).

**Gráfico 6: Níveis de A $\beta$ 40, sAPP $\beta$  e sAPP $\alpha$  em relação a diferentes doses de CNP520, e sua relação dose-resposta.** A) Alterações nos níveis de A $\beta$ 40 em relação aos valores da linha de base; B) Alterações nos níveis de sAPP $\beta$  em relação aos valores da linha de base; C) Alterações nos níveis de sAPP $\alpha$  em relação aos valores da linha de base; D) Relação dose-resposta de A $\beta$ 40 quanto a administração de CNP520, em relação aos níveis basais de A $\beta$ 40 após duas semanas de dosagem, onde o LCR foi analisado a partir de um cateter lombar 2 horas antes da dosagem e 24 horas após a última dose (n=8 para o grupo em tratamento; n=16 para o grupo placebo).



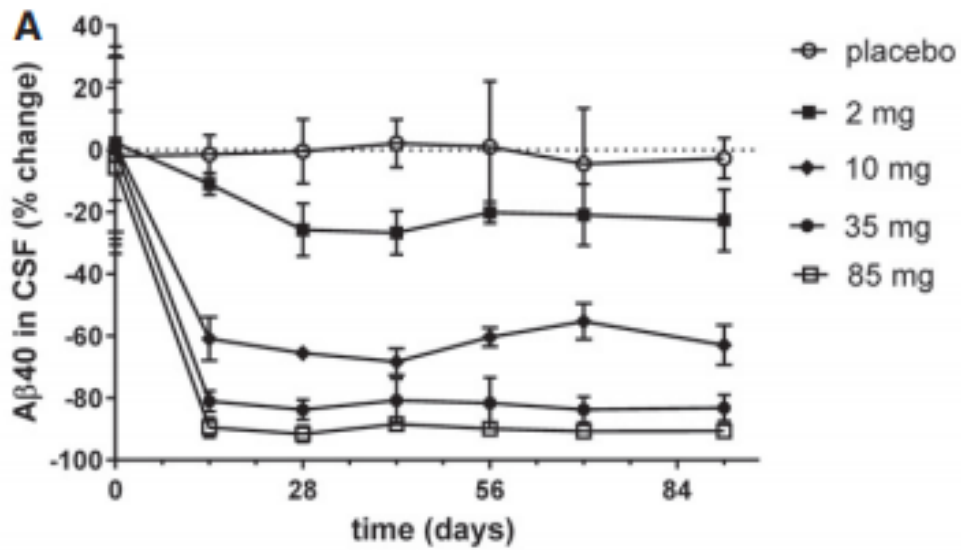
Fonte: NEUMANN (2018)

#### 4.3. Efeitos da administração de CNP520 sobre AB40 no LCR, por 3 meses em participantes saudáveis com idade $\geq 60$ anos

Após uma análise de relação PK/PD (PK/PD) já feita em humanos, o grupo partiu para um estudo de fase IIa, que foi realizado com 25 participantes saudáveis, por grupo, com idade igual ou superior a 60 anos, e teve a duração de 3 meses. Além da coleta do LCR ter sido feita no início e no período final do tratamento, ele também foi colhido em tempos intermediários (NEUMANN *et al*, 2018).

Até o período de 28 dias A $\beta$ 40 mostrou uma redução estável, o que se estendeu para o resto do período de tratamento de 3 meses em todos os grupos de doses (**Gráfico 7**).

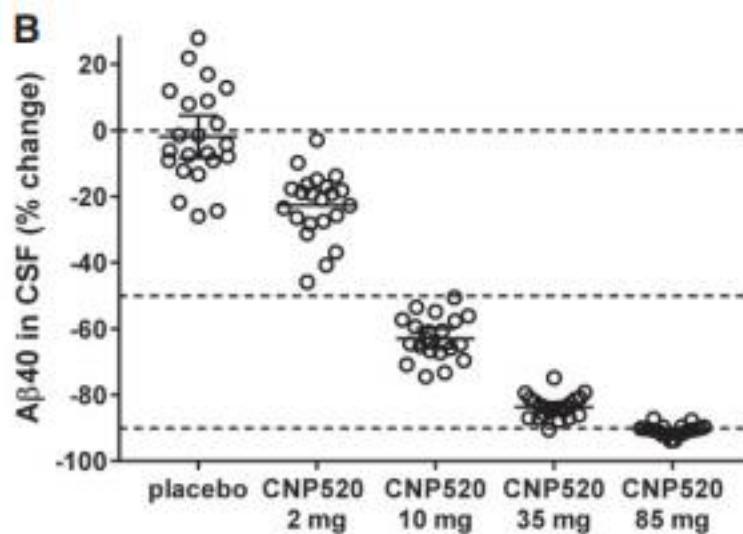
**Gráfico 7: Alteração nos níveis de A $\beta$ 40 no LCR, em relação aos valores basais, em 3 meses de tratamento com dose diária.**



Fonte: NEUMANN (2018)

Foi visto, ao final do tratamento, que ocorreu uma redução significativa nas concentrações de A $\beta$ 40 no LCR, quando comparada com o placebo, em todas as doses, apenas havendo variação de  $22.6 \pm 2,1\%$  numa dose diária de 2mg e  $90.7 \pm 0,37\%$  numa dose diária de 85mg (**Gráfico 8**).

**Gráfico 8: Relação gráfica de dose-resposta para níveis de A $\beta$ 40 em LCR.** Junto a variação percentual individual da linha de base, demonstrado como média e intervalo de confiança de 95%, com um n=21-25 por grupo de tratamento



Fonte: NEUMANN (2018)

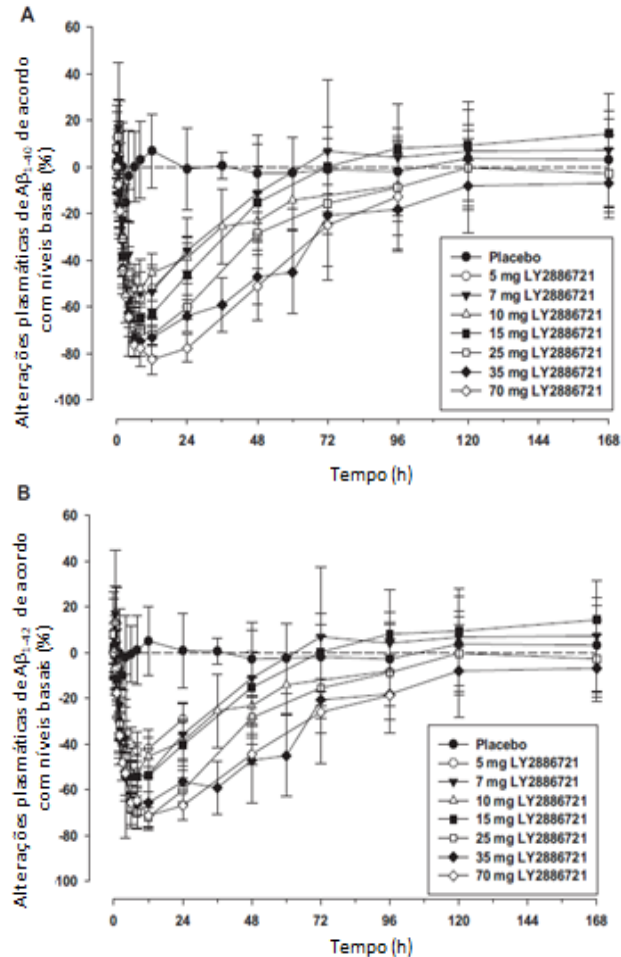
Tais estudos foram conduzidos para analisar a segurança, tolerabilidade e efeitos de PK e PD do CNP520 em seres humanos saudáveis, onde todos os testes realizados foram randomizados, double-blind e controlados por placebo. O CNP520 está atualmente sendo testado nos estudos de geração I e II, que estão registrados em ClinicalTrials.gov sob os identificadores NCT03131453 e NCT02565511, dispondo de consulta para maiores detalhes.

May e colaboradores 2015, em estudos feitos com 95 voluntários saudáveis (homens e mulheres) com idade média de 31 a 37 anos, realizados para analisar a farmacodinâmica e farmacocinética da droga LY2886721 observaram que a administração em dose única reduziu os níveis de A $\beta$ 1-42 de forma mais eficiente, quando comparada à administração de múltiplas doses da droga. A análise farmacodinâmica e farmacocinética foi avaliada no LCR e no plasma após a administração das doses da droga. A resposta à administração de dose única se mostrou de caráter dose independente. Num contexto geral, a droga reduziu os níveis dos peptídeos A $\beta$  como esperado.

A farmacocinética se mostrou linear em relação à dose utilizada, se mostrando consistente entre os estudos. A farmacodinâmica demonstrou que em doses únicas ocorreu uma diminuição significativa nos níveis dos peptídeos, e em seguida retornou para a linha de base. As doses múltiplas obtiveram um perfil semelhante.

De acordo com May *et al.* 2015, após doses únicas de LY2886721 as concentrações de A $\beta$ 1-40 (Gráfico 9A) e A $\beta$ 1-42 (Gráfico 9B) se mostraram significativamente reduzidas no plasma, chegando até seu ponto mais baixo entre 6 12 horas pós administração e retornando lentamente para os seus valores basais.

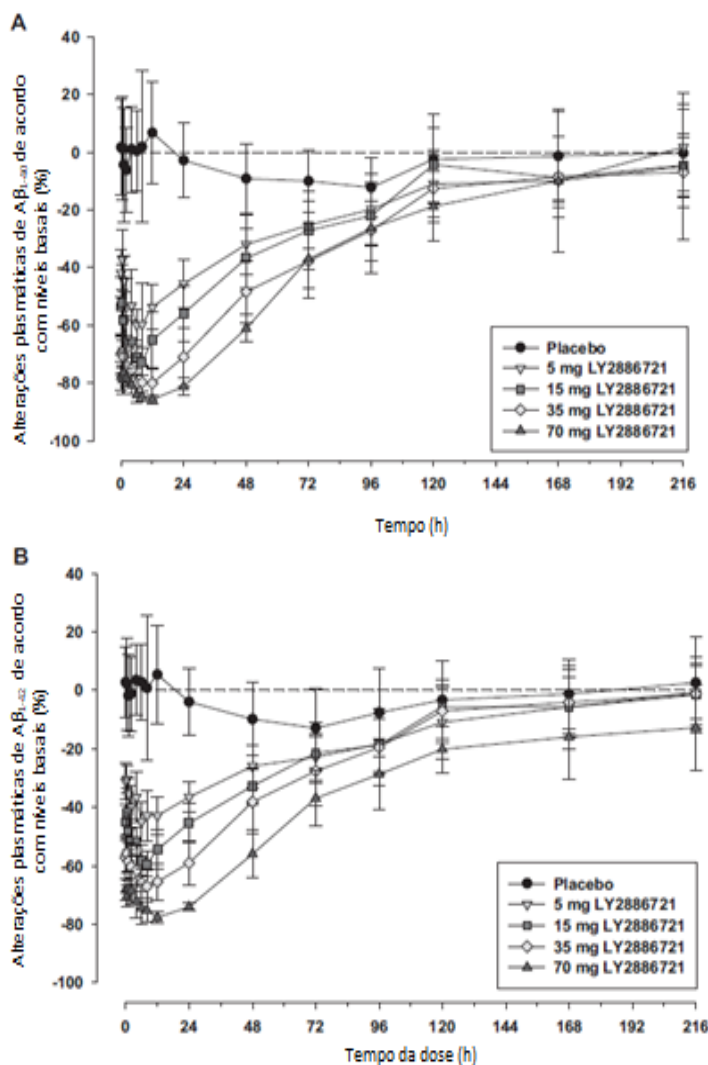
**Gráfico 9. Concentração plasmática de peptídeo A $\beta$  em resposta a dose única de LY2886721** A. Curva temporal de variação de peptídeo A $\beta_{1-40}$  no plasma após administração de LY2886721 nas doses de 5, 7, 10, 15, 25, 35 e 70mg. B. Curva temporal de variação de peptídeo A $\beta_{1-42}$  no plasma após administração de LY2886721 nas doses de 5, 7, 10, 15, 25, 35 e 70mg. (MAY *et al*, 2015)



Fonte: MAY (2015)

As múltiplas doses administradas diariamente, durante 14 dias, diminuíram as concentrações de A $\beta_{1-40}$  e A $\beta_{1-42}$  no plasma, o Efeito máximo foi observado entre 6 e 10 horas. Observaram diminuição acentuada da isoforma A $\beta_{1-40}$  comparado a A $\beta_{1-42}$ .

**Gráfico 10. Concentração plasmática de peptídeo A $\beta$  em resposta a múltiplas doses de LY2886721.** A. Curva temporal de variação de peptídeo A $\beta_{1-40}$  no plasma após administração de LY2886721 nas doses de 5, 15, 35 e 70mg. B. Curva temporal de variação de peptídeo A $\beta_{1-42}$  no plasma após administração de LY2886721 nas doses de 5, 15, 35 e 70mg.



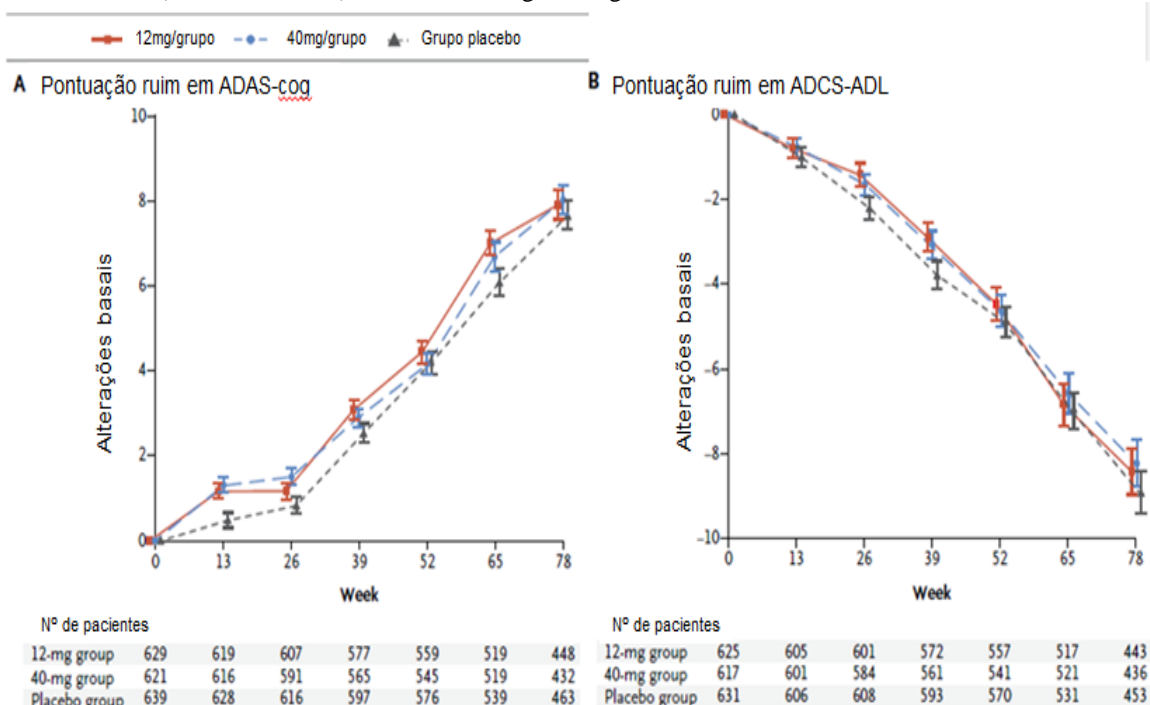
Fonte: MAY (2015)

Estudo que analisou os efeitos cognitivos da droga Verubecestat (Egan, 2018) utilizou como critério de inclusão de pacientes com demência pontuação de 15 a 26 no Mini-Exame de Estado Mental (do inglês Mini-mental State Examination – MMSE), que representa um grau de disfunção cognitiva leve ou moderada. Esse teste é composto por questões divididas em 7 categorias (ALMEIDA, 1998), com o objetivo de avaliar as funções cognitivas específicas, diretamente ligadas a orientação no tempo (5 pontos), local (5 pontos), registro de palavras (3 pontos), atenção e cálculo (5 pontos), lembrança das palavras (3 pontos), linguagem (8 pontos), e capacidade construtiva visual (1 ponto). Foram administrados 12 ou 40mg de Verubecestat e realizaram avaliações cognitivas durante 48 semanas

Para avaliar os efeitos cognitivos 12 ou 40mg de Verubecestat, ele utilizou uma Escala de Avaliação da Doença de Alzheimer (do inglês Alzheimer's Disease Assessment Scale – ADAS-cog) onde a pontuação varia de 0 a 70, e os scores mais altos indicam um caso pior de demência. Essa avaliação foi dividida em duas partes: a primeira com uma breve entrevista, para avaliar os aspectos espontâneos, como fluência na fala, compreensão e qualidade de fala, a segunda parte se baseou em testes que avaliaram os domínios cognitivos, incluindo a recuperação de palavras, nomeação, orientação, reconhecimento de palavras, capacidade de lembrar instruções e compreensão da linguagem corporal. (NOGUEIRA *et al.*, 2018).

Para avaliar as funções diárias foi utilizada uma escala de estudo cooperativa da Doença de Alzheimer em atividades diárias (do inglês Alzheimer's Disease Cooperative Study Activities of Daily Living Inventory scale – ADCS-ADL) onde a pontuação varia de 0 a 78, e os scores mais baixos indicam uma pior função. Essa avaliação leva cerca de 20 minutos e se baseia nas informações obtidas do paciente e do cuidador. (ROBERT *et al.*, 2010)

**Gráfico 11. Efeito temporal de Verubecestat na avaliação cognitiva e funcional.** A. Variação em ADAS-cog (Efeito cognitivo) com 12 ou 40mg da droga durante 78 semanas. B. Variação em ADAS-ADL (Efeito funcional) com 12 ou 40mg da droga durante 78 semanas.



Fonte: EGAN (2018)

Com base nesses resultados é possível afirmar que a droga utilizada não reduziu o declínio cognitivo e funcional dos pacientes com doença de Alzheimer moderada. Num

contexto geral, as drogas administradas nos pacientes com doença de Alzheimer apresentam uma redução nas concentrações dos peptídeos amilóides. Isso indica que os novos processos neuroinflamatórios serão reduzidos, já que eles se iniciam com a deposição desses peptídeos. Contudo, essa redução não foi capaz de inibir os sintomas clínicos manifestados com a doença, evidenciando que não ocorreu melhoria nos quadros cognitivos e funcionais.

Estes estudos apontam que, uma vez o processo de demência está instalado, a progressão da doença se dá independente da produção dos peptídeos A $\beta$  e, como a deposição de A $\beta$  ocorre anos antes dos sintomas clínicos se tornarem aparentes, é importante propor tratamentos direcionados aos peptídeos amiloides de maneira precoce, antes do início dos sintomas clínicos.

Comparando os dados encontrados, funcionais ou clínicos, observamos que a droga CNP520 foi capaz de promover uma melhor atividade farmacodinâmica, possuindo um perfil de seletividade superior e alta penetração no cérebro com ausência de metabólitos tóxicos. Esse perfil de segurança possibilita que os pacientes façam uso a longo prazo, prevenindo assim que a acumulação de peptídeos AB atinjam níveis tóxicos. Sendo assim, é possível reduzir os níveis de déficits cognitivos se a administração dessa droga for iniciada no estado assintomático da doença.

De acordo com testes *in vitro* a droga possui uma estrutura que auxilia nessas funções e, por conta dessa característica estrutural, ela se diferencia dos inibidores estudados anteriormente, auxiliando uma maneira promissora para uso terapêutico.

Atualmente estudos clínicos ( vide [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02565511) - Identificador NCT02565511) vem sendo desenvolvidos com essa droga, com o objetivo de responder essas questões.



## 5. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de drogas inibidoras de BACE1 tem se mostrado um campo desafiador. A utilização desses fármacos, de maneira mais precoce possível, é uma opção promissora para o tratamento da doença de Alzheimer, visto que os resultados da sua utilização são demonstrados como positivos para o desenvolvimento de um tratamento para a DA por inibir eficientemente os níveis de A $\beta$  no cérebro. Além disso, é preciso se aprofundar mais em relação às melhorias relacionadas às funções cognitivas, já que é algo ainda questionável em relação aos resultados positivos da administração dos inibidores.

## 6. REFERÊNCIA

ALMEIDA, Osvaldo P. MINI EXAME DO ESTADO MENTAL E O DIAGNÓSTICO DE DEMÊNCIA NO BRASIL. *Arq Neuropsiquiatr*, p. 8, .

BACHURIN, Sergey O.; BOVINA, Elena V.; USTYUGOV, Aleksey A. Drugs in Clinical Trials for Alzheimer's Disease: The Major Trends: DRUGS IN CLINICAL TRIALS FOR ALZHEIMER'S DISEASE. *Medicinal Research Reviews*, v. 37, n. 5, p. 1186–1225, 2017.

BADIGER, Sangamesh; CHEBROLU, Murali; FREDERIKSEN, Mathias; *et al.* Oxazine derivatives and their use in the treatment of neurological disorders. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US20110021520A1/en>>. Acesso em: 19 jun. 2019.

BARÃO, Soraia; MOECHARS, Diederik; LICHTENTHALER, Stefan F.; *et al.* BACE1 Physiological Functions May Limit Its Use as Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Trends in Neurosciences*, v. 39, n. 3, p. 158–169, 2016.

BEAR, Mark F.; CONNORS, Barry W.; PARADISO, Michael A. **Neuroscience: exploring the brain**. 2nd ed. Baltimore, Md: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

BEN HALIMA, Saoussen; MISHRA, Sabyashachi; RAJA, K. Muruga Poopathi; *et al.* Specific Inhibition of  $\beta$ -Secretase Processing of the Alzheimer Disease Amyloid Precursor Protein. *Cell Reports*, v. 14, n. 9, p. 2127–2141, 2016.

BLENNOW, Kaj; MATTSSON, Niklas; SCHÖLL, Michael; *et al.* Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 36, n. 5, p. 297–309, 2015.

CARVALHO, Cristina; CORREIA, Sónia C; CARDOSO, Susana; *et al.* The role of mitochondrial disturbances in Alzheimer, Parkinson and Huntington diseases. *Expert Review of Neurotherapeutics*, v. 15, n. 8, p. 867–884, 2015.

CARVALHO, Cristina; CORREIA, Sónia C.; PERRY, George; *et al.* Cerebrovascular and mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease: a brief overview. *Journal of Neural Transmission*, v. 123, n. 2, p. 107–111, 2016.

CAVALCANTI FILHO, José Leite Gondim; FONSECA, Léa Mirian Barbosa da; DOMINGUES, Romeu Côrtes; *et al.* PET-RM neurológico com FDG-18F: ensaio iconográfico. *Radiologia Brasileira*, v. 43, n. 3, p. 195–201, 2010.

CEBERS, Gvido; ALEXANDER, Robert C.; HAEBERLEIN, Samantha Budd; *et al.* AZD3293: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Effects in Healthy Subjects and Patients with Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, v. 55, n. 3, p. 1039–1053, 2017.

CHAKRABORTY, A.; DE WIT, N.M.; VAN DER FLIER, W.M.; *et al.* The blood brain barrier in Alzheimer's disease. *Vascular Pharmacology*, v. 89, p. 12–18, 2017.

CHÁVEZ-GUTIÉRREZ, Lucía; BAMMENS, Leen; BENILOVA, Iryna; *et al.* The

mechanism of  $\gamma$ -Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. **The EMBO Journal**, v. 31, n. 10, p. 2261–2274, 2012.

COIMBRA, Judite R. M.; MARQUES, Daniela F. F.; BAPTISTA, Salete J.; *et al.* Highlights in BACE1 Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2018.00178/full>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

CUMMINGS, Jeffrey; LEE, Garam; MORTSDORF, Travis; *et al.* Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017. **Alzheimer's & Dementia : Translational Research & Clinical Interventions**, v. 3, n. 3, p. 367–384, 2017.

DAS, Brati; YAN, Riqiang. Role of BACE1 in Alzheimer's synaptic function. **Translational Neurodegeneration**, v. 6, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5575945/>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

DE STROOPER, B.; IWATSUBO, T.; WOLFE, M. S. Presenilins and  $\gamma$ -Secretase: Structure, Function, and Role in Alzheimer Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 1, p. a006304–a006304, 2012.

DEVI, G.; QUITSCHKE, W. Alois Alzheimer, neuroscientist (1864-1915). **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v. 13, n. 3, p. 132–137, 1999.

DUBOIS, Bruno; FELDMAN, Howard H.; JACOVA, Claudia; *et al.* Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. **The Lancet. Neurology**, v. 13, n. 6, p. 614–629, 2014.

EGAN, Michael Frank; KOST, James; TARIOT, Pierre N.; *et al.* Randomized Trial of Verubecestat for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. **The New England journal of medicine**, v. 378, n. 18, p. 1691–1703, 2018.

ERIKSEN, Jason L.; MACKENZIE, Ian R. A. Progranulin: normal function and role in neurodegeneration. **Journal of Neurochemistry**, v. 104, n. 2, p. 287–297, 2008.

FALCO, Anna De; CUKIERMAN, Daphne Schneider; HAUSER-DAVIS, Rachel A.; *et al.* ALZHEIMER'S DISEASE: ETIOLOGICAL HYPOTHESES AND TREATMENT PERSPECTIVES. **Química Nova**, 2015. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0100-4042.20150152>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

FELIPPE, Lilian Assunção; OLIVEIRA, Renata Terra de; GARCIA, Milena; *et al.* Funções executivas, atividades da vida diária e habilidade motora de idosos com doenças neurodegenerativas. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 63, n. 1, p. 39–47, 2014.

FRISONI, Giovanni B; BLENNOW, Kaj. Biomarkers for Alzheimer's: the sequel of an original model. **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 2, p. 126–128, 2013.

GHOSH, Arun K.; OSSWALD, Heather L. BACE1 ( $\beta$ -secretase) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Chem. Soc. Rev.**, v. 43, n. 19, p. 6765–6813, 2014.

GRAEBER, M. B.; DEXTER, D.; PEARCE, R. K. B.; *et al.* Parkinson's disease: an update\*. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 29, n. 5, p. 514–515, 2003.

GUERRERO, R.; SCHMIDT-RICHBERG, A.; LEDIG, C.; *et al.* Instantiated mixed effects modeling of Alzheimer's disease markers. **NeuroImage**, v. 142, p. 113–125, 2016.

HAASS, Christian; SELKOE, Dennis J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 2, p. 101–112, 2007.

HARDY, John; SELKOE, Dennis J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science (New York, N.Y.)**, v. 297, n. 5580, p. 353–356, 2002.

HAUPTMANN, Susanne; KEIL, Uta; SCHERPING, Isabel; *et al.* Mitochondrial dysfunction in sporadic and genetic Alzheimer's disease. **Experimental Gerontology**, v. 41, n. 7, p. 668–673, 2006.

HENEKA, Michael T.; O'BANION, M. Kerry. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. **Journal of Neuroimmunology**, v. 184, n. 1–2, p. 69–91, 2007.

IZQUIERDO, Iván; BEVILAQUA, Lia R. M.; CAMMAROTA, Martín. A arte de esquecer. **Estudos Avançados**, v. 20, n. 58, p. 289–296, 2006.

KANEKIYO, Takahisa; XU, Huaxi; BU, Guojun. ApoE and A $\beta$  in Alzheimer's Disease: Accidental Encounters or Partners? **Neuron**, v. 81, n. 4, p. 740–754, 2014.

KARRAN, Eric; MERCKEN, Marc; STROOPER, Bart De. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 9, p. 698–712, 2011.

KOVACS, Gabor G. Classification of neurodegenerative diseases. *In*: [s.l.: s.n.], 2014.

KOVACS, Gabor G. Concepts and classification of neurodegenerative diseases. *In*: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.]: Elsevier, 2018, v. 145, p. 301–307. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128023952000213>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

KULSHRESHTHA, Akanksha; PIPLANI, Poonam. Current pharmacotherapy and putative disease-modifying therapy for Alzheimer's disease. **Neurological Sciences**, v. 37, n. 9, p. 1403–1435, 2016.

LAZAROV, Orly; HOLLANDS, Carolyn. Hippocampal neurogenesis: Learning to remember. **Progress in Neurobiology**, v. 138–140, p. 1–18, 2016.

LERCHNER, Andreas; MACHAUER, Rainer; BETSCHART, Claudia; *et al.* Macrocyclic BACE-1 inhibitors acutely reduce A $\beta$  in brain after po application. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 2, p. 603–607, 2010.

LOVESTONE, Simon; BOADA, Mercè; DUBOIS, Bruno; *et al.* A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, v. 45, n. 1, p. 75–88, 2015.

LUCEY, Brendan P.; BATEMAN, Randall J. Amyloid- $\beta$  diurnal pattern: possible role of sleep in Alzheimer's disease pathogenesis. **Neurobiology of Aging**, v. 35, p. S29–S34, 2014. (International Conference on Nutrition and the Brain).

MATTSSON, Niklas; RAJENDRAN, Lawrence; ZETTERBERG, Henrik; *et al.* BACE1 inhibition induces a specific cerebrospinal fluid  $\beta$ -amyloid pattern that identifies drug effects in the central nervous system. **PloS One**, v. 7, n. 2, p. e31084, 2012.

MAY, P. C.; WILLIS, B. A.; LOWE, S. L.; *et al.* The Potent BACE1 Inhibitor LY2886721 Elicits Robust Central A Pharmacodynamic Responses in Mice, Dogs, and Humans. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 3, p. 1199–1210, 2015.

MEREDITH, Jere E.; THOMPSON, Lorin A.; TOYN, Jeremy H.; *et al.* P-glycoprotein efflux and other factors limit brain amyloid beta reduction by beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 inhibitors in mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 326, n. 2, p. 502–513, 2008.

MULLARD, Asher. BACE inhibitor bust in Alzheimer trial. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 3, p. 155–155, 2017.

NELSON, Peter T.; ALAFUZOFF, Irina; BIGIO, Eileen H.; *et al.* Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 71, n. 5, p. 362–381, 2012.

NEUMANN, Ulf; UFER, Mike; JACOBSON, Laura H; *et al.* The BACE-1 inhibitor CNP520 for prevention trials in Alzheimer's disease. **EMBO Molecular Medicine**, v. 10, n. 11, p. e9316, 2018.

NOGUEIRA, Joana; FREITAS, Sandra; DURO, Diana; *et al.* Alzheimer's Disease Assessment Scale - Cognitive Subscale (ADAS-Cog): Normative Data for the Portuguese Population. **Acta Medica Portuguesa**, v. 31, n. 2, p. 94–100, 2018.

OEHLRICH, Daniel; PROKOPCOVA, Hana; GIJSEN, Harrie J.M. The evolution of amidine-based brain penetrant BACE1 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 9, p. 2033–2045, 2014.

OLIVEIRA, Francine Hehn de; RODRIGUES NETO, Edson; FONSECA, Mariana Kumaira; *et al.* Neurodegenerative changes in the brainstem and olfactory bulb in people older than 50 years old: a descriptive study. **Arq. neuropsiquiatr**, v. 73, n. 7, p. 569–577, 201507.

PANZA, Francesco; LOZUPONE, Madia; SOLFRIZZI, Vincenzo; *et al.* BACE inhibitors in clinical development for the treatment of Alzheimer's disease. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 18, n. 11, p. 847–857, 2018.

PAULA, Vanessa J. R. de; GUIMARÃES, Fabiana M.; FORLENZA, Orestes V. Papel da proteína Tau na fisiopatologia da demência frontotemporal. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 36, n. 5, p. 197–202, 2009.

PRINCE, Martin; BRYCE, Renata; ALBANESE, Emiliano; *et al.* The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. **Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association**, v. 9, n. 1, p. 63-75.e2, 2013.

PRINCE, Martin J. **World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia**. Disponível em: <<https://www.alz.co.uk/research/world-report-2015>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

RAJ, Ashish; LOCASTRO, Eve; KUCEYESKI, Amy; *et al.* Network Diffusion Model of Progression Predicts Longitudinal Patterns of Atrophy and Metabolism in Alzheimer's Disease. **Cell Reports**, v. 10, n. 3, p. 359–369, 2015.

RIBEIRO, Sidarta. Tempo de cérebro. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 07–22, 2013.

ROBERT, Philippe; FERRIS, Steven; GAUTHIER, Serge; *et al.* Review of Alzheimer's disease scales: is there a need for a new multi-domain scale for therapy evaluation in medical practice? **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 2, n. 4, p. 24, 2010.

RUEEGER, Heinrich; RONDEAU, Jean-Michel; MCCARTHY, Clive; *et al.* Structure based design, synthesis and SAR of cyclic hydroxyethylamine (HEA) BACE-1 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 7, p. 1942–1947, 2011.

SAKAMOTO, Kei; MATSUKI, Shunji; MATSUGUMA, Kyoko; *et al.* BACE1 Inhibitor Lanabecestat (AZD3293) in a Phase 1 Study of Healthy Japanese Subjects: Pharmacokinetics and Effects on Plasma and Cerebrospinal Fluid A $\beta$  Peptides: *Journal of Clinical Pharmacology*. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 57, n. 11, p. 1460–1471, 2017.

SELKOE, Dennis J; HARDY, John. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. **EMBO Molecular Medicine**, v. 8, n. 6, p. 595–608, 2016.

SERENIKI, Adriana; VITAL, Maria Aparecida Barbato Frazão. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 30, n. 1, p. 0–0, 2008.

SPIRES-JONES, Tara L.; HYMAN, Bradley T. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 82, n. 4, p. 756–771, 2014.

STURCHLER-PIERRAT, C.; STAUFENBIEL, M. Pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease analyzed in the APP23 transgenic mouse model. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 920, p. 134–139, 2000.

TAKAMI, Mako; NAGASHIMA, Yu; SANO, Yoshihisa; *et al.* gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 41, p. 13042–13052, 2009.

TERRY, R. D. The pathogenesis of Alzheimer disease: an alternative to the amyloid hypothesis. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 55, n. 10, p. 1023–1025, 1996.

TIMMERS, Maarten; BARÃO, Soraia; VAN BROECK, Bianca; *et al.* BACE1 Dynamics Upon Inhibition with a BACE Inhibitor and Correlation to Downstream Alzheimer's Disease Markers in Elderly Healthy Participants. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 56, n. 4, p. 1437–1449, 2017.

VOS, Stephanie J B; FAGAN, Anne M. Alzheimer's disease biomarker states. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 1, p. 25–26, 2016.

WISNIEWSKI, Thomas; GOÑI, Fernando. Immunotherapeutic Approaches for Alzheimer's Disease. **Neuron**, v. 85, n. 6, p. 1162–1176, 2015.

YAN, Riqiang. Stepping closer to treating Alzheimer's disease patients with BACE1 inhibitor drugs. **Translational Neurodegeneration**, v. 5, n. 1, p. 13, 2016.  
2013 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 9, n. 2, p. 208–245, 2013.

**Alzheimer's Drug Fails in Another Crushing Disappointment - Scientific American.** Disponível em: <<https://www.scientificamerican.com/article/alzheimer-s-drug-fails-in-another-crushing-disappointment/>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

Bear et al. - 2001 - Neuroscience exploring the brain.pdf. Disponível em: <[http://www.jvasconcellos.com.br/fat/FAT\\_BIO/wp-content/uploads/2014/09/Livro-de-Fisiologia-Neuroci%C3%A4ncias-Desvendando-o-sistema-nervoso-Bear-M.-F.-Connors-B.-W.-Paradiso-M.-A.pdf](http://www.jvasconcellos.com.br/fat/FAT_BIO/wp-content/uploads/2014/09/Livro-de-Fisiologia-Neuroci%C3%A4ncias-Desvendando-o-sistema-nervoso-Bear-M.-F.-Connors-B.-W.-Paradiso-M.-A.pdf)>. Acesso em: 23 jun. 2019.

**Current Concepts of Neurodegenerative Diseases.** European Medical Journal. Disponível em: <<https://www.emjreviews.com/neurology/article/current-concepts-of-neurodegenerative-diseases/>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

**Eisai Co., Ltd.** Disponível em: <<https://www.eisai.com/index.html>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

**Home - ClinicalTrials.gov.** Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

**Merck & Co., Inc. - News - Press Release Details.** Disponível em: <<https://investors.merck.com/news/press-release-details/2018/>>. Acesso em: 17 jun. 2019.

**Merck Announces Discontinuation of APECS Study Evaluating Verubecestat (MK-8931) for the Treatment of People with Prodromal Alzheimer's Disease.** Disponível em: <<https://investors.merck.com/news/press-release-details/2018/Merck-Announces-Discontinuation-of-APECS-Study-Evaluating-Verubecestat-MK-8931-for-the-Treatment-of-People-with-Prodromal-Alzheimers-Disease/default.aspx>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

**Neuropathology of Neurodegenerative Diseases edited by Gabor G. Kovacs.** Cambridge Core. Disponível em: <[core/books/neuropathology-of-neurodegenerative-diseases/E2907CC4F4C68A35A314466CB6C2C276](https://www.cambridge.org/core/books/neuropathology-of-neurodegenerative-diseases/E2907CC4F4C68A35A314466CB6C2C276)>. Acesso em: 23 jun. 2019.

**OPAS/OMS Brasil - Início.** Disponível em: <<https://www.paho.org/bra/>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

**(PDF) Oxidative damage and neurodegeneration. What have we learned from transgenic and knockout animals?** Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/262742891\\_Oxidative\\_damage\\_and\\_neurodegeneration\\_What\\_have\\_we\\_learned\\_from\\_transgenic\\_and\\_knockout\\_animals](https://www.researchgate.net/publication/262742891_Oxidative_damage_and_neurodegeneration_What_have_we_learned_from_transgenic_and_knockout_animals)>. Acesso em: 19 jun. 2019.

**Pharmacological BACE1 and BACE2 inhibition induces hair depigmentation by inhibiting PMEL17 processing in mice | Scientific Reports.** Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep21917>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

**The BACE-1 inhibitor CNP520 for prevention trials in Alzheimer's disease. - PubMed - NCBI.** Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30224383>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

TL0032.pdf. Disponível em: <<http://www.psicologia.pt/artigos/textos/TL0032.PDF>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

**U.S. Food and Drug Administration.** Disponível em: <<https://www.fda.gov/>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

**World Alzheimer Report 2015 - Corrections | Alzheimer's Disease International.** Disponível em: <<https://www.alz.co.uk/research/world-report-2015-corrections>>. Acesso em: 23 jun. 2019.