



Ana Paula dos Santos Claro

# Ação da insulina no desenvolvimento da doença de Alzheimer e perspetivas de tratamento

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

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Paula dos Santos Claro

**Ação da insulina no desenvolvimento da doença de Alzheimer e perspetivas de  
tratamento**

Monografia no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, realizada sob a orientação do Professor Doutor José Barata Antunes Custódio.

Coimbra, 2016

Eu, Ana Paula dos Santos Claro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010136019, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo desta Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 16 de setembro de 2016

---

(Ana Paula dos Santos Claro)

O Tutor

---

(Professor Doutor José Barata Antunes Custódio)

A aluna

---

(Ana Paula dos Santos Claro)

## **Agradecimentos**

*“If you’re comfortable, you’re not growing”* – John C. Maxwell

A vida é cheia de altos e baixos, alegrias e tristezas. Muitas vezes são os momentos maus que nos fazem crescer e que fazem com que passemos a dar mais valor aos momentos bons. Durante o meu percurso académico nem tudo foi fácil, mas tive que aprender e crescer com as adversidades, e sei que saio mais preparada para a vida do que quando entrei na Faculdade.

Agradeço a todas as pessoas que me apoiaram ao longo da minha caminhada, em primeiro lugar e sempre – a minha mãe, que sempre acreditou no melhor de mim, mesmo quando eu ainda não o via. Ao Diogo, meu pilar, que nunca me deixou desesperar, mesmo quando os problemas se acumulavam. Às minhas queridas colegas de curso, cujo apoio e compreensão sempre tive ao longo do meu percurso académico e que vão ficar para a vida, Mariana, Juliana e Vanessa.

Agradeço ao Professor Doutor Custódio pela orientação na execução da monografia e pela disponibilidade que sempre mostrou para prestar qualquer esclarecimento necessário.

Ana Claro

## Índice

<b>Abreviaturas</b> .....	2
<b>Resumo</b> .....	3
<b>Abstract</b> .....	3
<b>Introdução</b> .....	5
<b>Doença de Alzheimer</b> .....	6
<b>Papel da insulina no Sistema Nervoso Central</b> .....	7
<b>Diabetes e alterações cognitivas</b> .....	7
<b>Doença de Alzheimer e diabetes</b> .....	8
□ <b>Epidemiologia</b> .....	8
□ <b>Alterações da insulina no Sistema Nervoso Central</b> .....	9
□ <b>Alterações no metabolismo da glicose</b> .....	12
□ <b>Diabetes tipo 3?</b> .....	14
<b>Terapêutica usada no tratamento da diabetes redirecionada para a Doença de Alzheimer</b> .....	15
□ <b>Insulina</b> .....	15
□ <b>Outras alternativas</b> .....	16
<b>Intervenções não farmacológicas</b> .....	17
<b>Conclusão</b> .....	18
<b>Referências bibliográficas</b> .....	20

## **Abreviaturas**

**ADN** – Ácido Desoxirribonucleico

**ApoE** – Apolipoproteína E

**ARN** – Ácido Ribonucleico

**BHE** – Barreira Hemato-encefálica

**βA** – β-amilóides

**C3-GS** – Cinase 3 da Glicogénio-sintetase

**DA** – Doença de Alzheimer

**DT1** – Diabetes Tipo 1

**DT2** – Diabetes Tipo 2

**DT3** – Diabetes Tipo 3

**EDI** – Enzima de Degradação da Insulina

**NMDA** – N-metil D-Aspartato

**PCAM** – Proteína Cinase Ativada por Mitogénio

**PGA** – Produtos de Glicação Avançada

**PPA** – Proteína Percursora Amilóide

**P-tau** – Proteínas tau

**PTPIB** – Proteína Tirosina Fosfatase IB

**RI** – Recetores de Insulina

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**SI-RI** – Substrato I do RI

## Resumo

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa associada à idade e é a forma mais comum de demência. As alterações neuropatológicas típicas da DA são as placas amilóides extracelulares e as tranças neurofibrilares intracelulares.

A DA de início tardio é a mais comum e está associada à idade, fatores ambientais e de estilo de vida. A diabetes tipo 2 (DT2) está associada a um risco duas vezes superior de desenvolvimento da DA de início tardio. Os defeitos decorrentes da diabetes estão associados a disfunções cognitivas e risco aumentado de desenvolver demência e a DA é o tipo de demência mais comum nos doentes com DT2.

Há evidências que mostram que a progressão da DA está associada a uma resposta diminuída da sinalização por insulina. Isto contribui para a neurodegeneração devido a aumentar a expressão e processamento da proteína precursora amilóide, o que leva à acumulação de peptídeos  $\beta$ -amilóides; ativação de cinases que estão normalmente inativas devido à ação da insulina, o que leva à hiperfosforilação e alterações conformacionais das proteínas tau, abundantes nos neurónios do Sistema Nervoso Central; deficiências no metabolismo da glicose, com diminuição do metabolismo energético e biossíntese de acetilcolina, aumento do *stress* oxidativo, neuro-inflamação e formação de produtos de glicação avançada. Por outro lado, os oligómeros  $\beta$ -amilóides têm um efeito tóxico que promove a insulinoresistência e a disfunção mitocondrial. Em suma, a insulinoresistência promove a acumulação de peptídeos  $\beta$ -amilóides e a toxicidade desses peptídeos promove a insulinoresistência, causando neurodegeneração progressiva e perda de neurónios.

O tratamento com insulina intranasal, com agonistas do recetor do peptídeo I semelhante ao glucagon, com pramlintide, que é um análogo injetável da amilina, e com metformina têm mostrado resultados positivos na melhoria da função cognitiva. Uma classe farmacológica atualmente em desenvolvimento são os inibidores do recetor da proteína tirosina fosfatase IB, que modulam a proteína cinase B, também conhecida como Akt, cuja via de sinalização está diminuída na DA. As alterações do estilo de vida com diminuição dos fatores de risco que contribuem para o défice cognitivo ligeiro ou DA também mostraram bons resultados na prevenção do declínio cognitivo.



## **Abstract**

Alzheimer's disease is an age-related neurodegenerative disorder and is the most common cause of dementia. Two key neuropathological features of Alzheimer's disease are extracellular amyloid plaques and intracellular neurofibrillary tangles.

Late onset Alzheimer's disease is the most common and is associated to age, environmental and lifestyle factors. Type 2 diabetes has been shown to increase its risk by twofold. Diabetes defects are associated with cognitive impairment and increased risk to develop dementia and in patients with type 2 diabetes Alzheimer's disease is the most common type of dementia.

Evidence supports that Alzheimer's disease progression is associated with decreased brain response to insulin signalling. This contributes to neurodegeneration due to increased expression and processing of amyloid precursor protein, which leads to the accumulation of amyloid- $\beta$  peptides; activation of kinases normally downregulated by insulin signalling, which leads to hyper-phosphorylation and misfolding of tau proteins; hypometabolism of glucose with decreased energy metabolism and biosynthesis of acetylcholine, increased oxidative stress, neuroinflammation and formation of advanced glycation end products. On the other hand, amyloid- $\beta$  oligomers have shown to have a toxic effect that can promote insulin resistance and mitochondrial dysfunction. Summing up, there's a positive feedback loop where insulin resistance promotes amyloid- $\beta$  accumulation and amyloid- $\beta$  toxicity promotes insulin resistance, causing progressive neurodegeneration and neuronal loss.

Treatment with intranasal insulin, glucagon-like peptide-1 receptor agonists, amylin analog pramlintide and metformin have been shown positive results improving cognitive function. There's also a promising early-stage diabetes drug class – the inhibitors of protein-tyrosine phosphatase 1B, that may modulate the protein kinase B, also known as Akt, whose pathway is downregulated in Alzheimer's disease. Lifestyle changes addressing modifiable risk factors for developing mild cognitive impairment or AD have been also shown good results in preventing cognitive impairment.

## **Introdução**

“O farmacêutico é um agente de saúde, cumprindo-lhe executar todas as tarefas relativas aos medicamentos, às análises clínicas ou análises de outra natureza que sejam suscetíveis de contribuir para a salvaguarda da saúde pública, bem como as ações de educação dirigidas à comunidade no âmbito da promoção da saúde e prevenção da doença.” Artigo 78.º do Estatuto da Ordem dos Farmacêuticos (1).

O Ato Farmacêutico, de acordo com o descrito no Decreto-Lei nº131/2015, inclui todas as atividades relacionadas com os medicamentos, que requeiram especialização em qualquer uma das áreas de intervenção farmacêutica ou que estejam relacionadas com a salvaguarda da saúde pública (1).

Tendo em conta o dever do farmacêutico na promoção da saúde e prevenção da doença e o dever da atualização permanente dos seus conhecimentos, também descritos no Decreto-Lei nº131/2015 (1), escolhi aprofundar o tema da Doença de Alzheimer, que me diz muito, não só a nível profissional, mas também a nível pessoal, devido a ter casos na família.

Visto que nos últimos anos têm surgido novas evidências acerca dos mecanismos fisiopatológicos desta doença e dos fatores de risco para o seu desenvolvimento, os objetivos deste trabalho são clarificar essas descobertas e avaliar de que forma é que, à luz do novo conhecimento científico, podem ser feitas intervenções farmacológicas e não farmacológicas para prevenir ou pelo menos tentar diminuir a progressão da doença.

## Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) foi descoberta em 1906, pelo médico alemão Alois Alzheimer. Ao fazer uma *examinação post-mortem* do cérebro de uma doente do sexo feminino, que sofria de uma doença mental atípica, Alois Alzheimer verificou alterações neuropatológicas no mesmo, existindo depósitos de proteínas anormais, atualmente conhecidos como placas amilóides. A doente sofria de sintomas como problemas de linguagem, alterações na personalidade e perda de memória progressiva ou extrema (2).

A DA é a forma mais comum de demência, apresentando um risco acrescido associado à idade, com uma incidência mais pronunciada na 7ª e 8ª décadas de vida (3). Afeta mais de 30 milhões de pessoas no mundo (4). O seu diagnóstico em doentes vivos é feito com base nos sintomas clínicos, sendo que inicialmente pode desconfiar-se da existência da doença se o doente apresentar lapsos de memória pelo menos há 6 meses e dificuldades no desempenho das atividades do dia-a-dia (5).

DA é uma doença neurodegenerativa progressiva, que se caracteriza por uma cascata patológica de eventos que incluem a formação de placas amilóides extracelulares, tranças neurofibrilares intracelulares, perda de sinapses, neuro-inflamação, alterações do metabolismo cerebral e atrofia cerebral com disfunção cognitiva progressiva (4). Outras alterações associadas à DA são a degeneração neuronal no núcleo basal de Meynert e níveis de acetilcolina diminuídos (5).

As placas amilóides são constituídas por depósitos de peptídeos  $\beta$ -amilóides ( $\beta$ A), enquanto que as tranças neurofibrilares são constituídas por agregados de proteínas tau (P-tau) hiperfosforiladas. Os peptídeos  $\beta$ A surgem da clivagem da proteína precursora amilóide (PPA) pela  $\beta$  e  $\gamma$ -secretases e podem ter de 39 a 42 aminoácidos (6). O peptídeo  $\beta$ A-42 apresenta uma maior propensão para agregar e acumular no espaço extracelular, sendo que os agregados oligoméricos de  $\beta$ A-42 são os mais neurotóxicos (2, 6). As P-tau localizam-se nos axónios e mantêm a estabilidade dos microtúbulos neuronais. Na DA encontram-se anormalmente fosforiladas, agregando e formando as tranças neurofibrilares (6).

Tendo em conta a idade em que aparece, a DA é classificada como DA de início precoce, idade inferior a 65 anos e corresponde a 1-5% dos casos, ou DA de início tardio, idade maior ou igual a 65 anos e corresponde a mais de 95% dos casos (3).

A DA de início precoce está geralmente associada a mutações autossómicas dominantes num ou mais genes que codificam a PPA ou proteínas do core catalítico da  $\gamma$ -secretase

(presenilina 1 ou 2), causando DA familiar. A DA familiar é, no entanto, uma doença rara, que se manifesta não só mais cedo em idade, como também tem uma progressão mais rápida (3, 6).

A DA de início tardio está associada à idade, a fatores genéticos, fatores ambientais e estilo de vida. A obesidade, hiperglicémia, hiperinsulinémia, insulinoresistência, tolerância à glicose, hipertensão e lesões vasculares são fatores de risco para o seu desenvolvimento. Em termos genéticos, indivíduos com o alelo  $\epsilon 4$  da apolipoproteína E (ApoE) têm 3 a 4 vezes maior probabilidade de desenvolver DA que os que não têm este alelo. A presença de ApoE  $\epsilon 4$  ocorre em 15% da população e 40% dos doentes com DA têm este alelo (6).

### **Papel da insulina no Sistema Nervoso Central**

Os recetores de insulina (RI) encontram-se expressos por todo o sistema nervoso central (SNC), havendo uma maior densidade no hipotálamo, cerebelo, córtex cerebral, bulbo olfativo e hipocampo (5). O hipocampo é conhecido por estar envolvido na aquisição e consolidação de novas memórias e, nos neurónios do hipocampo, principalmente nas sinapses, há uma grande concentração de RI (2, 5).

A insulina funciona como fator de crescimento para todas as células, incluindo para os neurónios. Apesar de os neurónios não serem insulino dependentes, a insulina está implicada na regulação de processos como a sobrevivência neuronal e a aquisição de memória (ativa cascatas de sinalização associadas a aprendizagem e memória a longo prazo). Assim qualquer alteração nos níveis de insulina no SNC afeta a cognição e contribui para processos neurodegenerativos (7).

A ligação da insulina ao seu recetor ativa duas vias de sinalização, a da proteína cinase ativada por mitogénio (PCAM) e a da Akt. A via PCAM está envolvida na diferenciação, proliferação e morte celular. A via Akt está envolvida na regulação do crescimento celular, proliferação e sobrevivência, através da inibição de alguns agentes pro-apoptóticos (6).

### **Diabetes e alterações cognitivas**

A diabetes é uma doença metabólica complexa que se caracteriza por hiperglicémia devida a deficiência de insulina ou resistência à mesma. No caso de Diabetes tipo 1 (DT1), observa-se deficiência de insulina e hiperglicémica, enquanto que no caso de Diabetes tipo 2 (DT2) há

insulinorresistência e hiperinsulinemia, com disfunção na sinalização mediada por insulina. Está associada a complicações micro e macrovasculares e, mais recentemente, a disfunções cognitivas (6).

No caso de DT1, a severidade das alterações cognitivas relaciona-se com a idade em que surgiu a doença, a duração, bem como o controlo glicémico. Neste caso, a causa das alterações cognitivas é a deficiência de insulina. Verificam-se alterações na memória espacial e na potenciação de longo termo do hipocampo, que podem ser prevenidas recorrendo a terapêutica com insulina (6).

No caso de DT2, o tipo mais comum desta doença, verificam-se alterações cognitivas na aprendizagem e memória, flexibilidade e rapidez mental (6). Análises de ressonância magnética do cérebro de doentes idosos com DT2 revelaram atrofia aumentada do hipocampo e da amígdala, comparativamente a controlos não diabéticos de idade comparável (5).

## **Diabetes e Doença de Alzheimer**

### ▫ **Epidemiologia**

A DA é a causa mais comum de demência em doentes com DT2 e o desenvolvimento de diabetes, como já foi referido anteriormente, tem sido relacionado com alterações cognitivas, incluindo défice cognitivo ligeiro, que é um fator de risco para o desenvolvimento de demência (5). Estudos demonstraram que os doentes com défice cognitivo ligeiro têm um maior risco de desenvolver DA, conversão essa estimada em 10 a 15% por ano (8).

Um dos primeiros estudos sugerindo que os doentes com DT2 têm um risco aumentado de desenvolver DA foi o “Estudo de Roterdão” em 1999. O estudo de Roterdão foi um *cohort* prospetivo, que incluiu 6370 idosos, estudados durante 2,1 anos. Os resultados demonstraram que a existência de DT2 duplicava o risco de desenvolver DA e, no caso de doentes com insulinoterapia (geralmente associada a historial de DT2 mais longo), o risco quadruplicava. Vários estudos feitos posteriormente com o intuito de determinar esta associação entre diabetes e DA obtiveram resultados semelhantes (7, 9).

Os defeitos moleculares associados a diabetes causam alterações cognitivas, aumentando o risco de demência no geral. Numa revisão de 25 estudos prospetivos, ao analisar os

resultados de testes cognitivos de participantes com diabetes *versus* sem diabetes, foi concluído que comparativamente há um declínio cognitivo 1.2 a 1.5 vezes maior nos participantes com diabetes. Os autores concluíram que a existência de diabetes aumenta o risco de declínio cognitivo com a idade, a extensão do declínio e o risco de desenvolver demência. A duração da diabetes é também um fator de risco para o aumento do declínio cognitivo (5).

Nos estudos que concluíram a existência de uma associação positiva entre diabetes e DA, foram também determinados como fatores de risco para ambas as doenças obesidade, deslipidemia e hipertensão (6).

#### ▫ **Alterações da insulina no Sistema Nervoso Central**

Um modelo animal que demonstra o papel das disfunções da insulina na DA é modelo de DA induzida por estreptozotocina, um agente alquilante que danifica as células produtoras de insulina e os RI. Ratos expostos a estreptozotocina intracerebral mostram uma diminuição da função cognitiva, ativação anormal da cinase 3 da glicogénio-sintetase (C3-GS), alterações histopatológicas típicas de DA (tranças neurofibrilares e placas  $\beta$ A) e neurodegeneração (9).

#### Insulinorresistência

Em pacientes com DA, tanto a insulina como os RI estão diminuídos, comparativamente a controlos saudáveis de idade comparável (6). Observações de tecido cerebral de doentes com DA confirmam a expressão reduzida de RI. Estudos feitos com estimulação *ex vivo* de tecido cerebral do hipocampo de doentes com DA, doentes com função cognitiva normal associada à idade e controlos, com insulina em concentrações fisiológicas, demonstraram uma redução na ativação das vias de sinalização da insulina, nos doentes com DA, à semelhança do que ocorre nos tecidos periféricos devido a insulinorresistência (9).

A resistência periférica à insulina, mesmo sem o estabelecimento de DT2 (pré-diabetes), é um fator de risco para desenvolver DA. Isto deve-se ao facto de a hiperinsulinémia poder levar a uma diminuição na entrada de insulina na barreira hemato-encefálica (BHE), devido à saturação dos níveis fisiológicos. A insulinorresistência está associada a uma diminuição da insulina no cérebro, diminuição da ativação dos RI, aumento dos níveis de peptídeos  $\beta$ A e de P-tau fosforiladas, diminuição do metabolismo da glicose, com

consequente aumento do *stress* oxidativo e da formação de PGA, apoptose celular, diminuição do volume do hipocampo e da performance cognitiva (3, 10).

Por outro lado, a resistência à insulina no cérebro de doentes com DA está também associada à indução patológica pelos oligómeros  $\beta$ A, apelidados de sinaptotoxinas. Foi demonstrado que os oligómeros  $\beta$ A se ligam aos neurónios no hipocampo, promovendo a remoção dos RI da membrana plasmática, o que leva a uma diminuição da resposta à insulina. Em culturas de neurónios expostas a oligómeros, verificou-se que estes se distribuem à superfície das zonas do corpo celular neuronal com maior densidade de RI e provocam não só a remoção dos RI, como também dos recetores de glutamato tipo NMDA (N-metil D-Aspartato) e tipo AMPA (Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidróxido-5-metil-4-isoxazol-propiónico), importantes na plasticidade sináptica (2).

Fisiologicamente, para que a insulina ative as suas vias de sinalização é necessária a ativação da tirosina cinase intrínseca, associada ao RI. Posteriormente há uma fosforilação dos substratos do RI, que intervêm em diferentes vias de sinalização (11). Enquanto que a fosforilação dos resíduos de tirosina propaga a sinalização pela insulina, a fosforilação dos resíduos de serina causa um *feedback* negativo. A sobre-regulação crónica deste mecanismo de *feedback* negativo, consistente com o que acontece na insulinoresistência periférica, bloqueia a atividade mediada pela insulina (10).

Os oligómeros  $\beta$ A levam à ativação de um fator de necrose tumoral  $\alpha$  aberrante, que ativa a cinase de *stress* c-Jun N-terminal, sendo o mesmo mecanismo patológico que causa insulinoresistência na DT2. A ativação da cinase c-Jun N-terminal leva à fosforilação do Substrato I do RI (SI-RI) nos resíduos de serina, bloqueando a progressão da sinalização por insulina, com consequente insulinoresistência nos neurónios. A ocorrência desta inibição do SI-RI, especialmente nos neurónios do hipocampo, foi comprovada em testes com macacos *cynomolgus* aos quais foram introduzidos intracerebralmente oligómeros  $\beta$ A (11).

No hipocampo e córtex cerebral de doentes com DA, recorrendo ao uso de anticorpos para os resíduos de fosfo-serina, verificou-se um aumento significativo dos resíduos de serina fosforilados, comparativamente a amostras controlo. A ocorrência de fosforilação dos resíduos de serina no SI-RI foi inversamente associada com os resultados dos doentes nos testes de memória e cognição global, antes da sua morte, demonstrando a sua forte relação com o comprometimento cognitivo (9).

Os oligómeros  $\beta$ A causam a ativação aberrante e desregulação do recetor NMDA, estando estes processos também implicados na diminuição da sinalização por insulina na DA. Esta disfunção no recetor causa um influxo de cálcio nos neurónios e stress oxidativo, o que é confirmado pelo facto de o fármaco memantina – inibidor do recetor NMDA, atenuar o influxo de cálcio e stress oxidativo (induzidos pelos oligómeros  $\beta$ A) (11).

A insulinoresistência no cérebro pode também promover a deposição de  $\beta$ A através da diminuição da sua degradação, visto que a diminuição dos níveis de insulina regula negativamente a expressão da enzima de degradação da insulina (EDI), que é responsável pela *clearance* de peptídeos  $\beta$ A (3). A EDI é uma metaloprotease secretada pelas células da microglia que degrada insulina e peptídeos  $\beta$ A, havendo competição entre estes dois substratos para a enzima (5, 6).

A degradação dos peptídeos  $\beta$ A pela EDI diminui a agregação e formação de placas amilóides, apesar de a EDI apenas degradar peptídeos  $\beta$ A monoméricos e não peptídeos  $\beta$ A oligoméricos. Nos doentes com alterações cognitivas, bem como DA, os níveis de EDI encontram-se diminuídos, especialmente no hipocampo. A existência do alelo  $\epsilon$ 4 da ApoE também diminui a expressão da EDI e os diabéticos com este tipo de alelo podem ter maior risco de desenvolver DA (5).

#### Processamento alterado das proteínas

A diminuição nos níveis de insulina ou insulinoresistência causam diminuição da sinalização por insulina na via SI-RI  $\rightarrow$  Akt, levando a um aumento da atividade da C3-GS, que em circunstâncias normais é inibida por fosforilação pela Akt. Este aumento da atividade da C3-GS nos neurónios promove a fosforilação das P-tau e o processamento da PPA (5, 9). Uma comparação entre o funcionamento da via de sinalização SI-RI  $\rightarrow$  Akt no córtex frontal de doentes com DA, DT2, DA e DT2 *versus* controlo, demonstrou haver uma diminuição mais significativa desta via nos doentes que têm cumulativamente DA e DT2 (8).

As P-tau fosforiladas agregam devido a alterações na conformação, formando fibrilhas insolúveis, que posteriormente levam à formação de tranças neurofibrilares. A acumulação das neurofibrilhas causa alterações no citoesqueleto dos neurónios, interferindo com o transporte axonal e pondo em causa a integridade sináptica. Os efeitos neurotóxicos das fibrilhas de P-tau devem-se ao aumento da produção de espécies



reativas de oxigênio, aumento do *stress* oxidativo, disfunção mitocondrial, necrose e apoptose (12). A hiperfosforilação da P-tau foi verificada em modelos animais de DTI e DT2, apesar de ser mais pronunciada em DT2. Este aumento na fosforilação da P-tau foi também observado no tecido cerebral de doentes com DT2 (6). Disfunções na sinalização por insulina causam também diminuição da expressão das P-tau, diminuindo assim a produção de P-tau normais. A formação de fibrilhas e a insuficiente produção de P-tau normais levam ao colapso do citoesqueleto, retração neurítica e desconexão da sinapse (12).

O aumento da atividade da C3-GS provoca também um aumento do processamento da PPA, com formação de peptídeos  $\beta$ A (devido a mediar o aumento da atividade da presenilina 1) (5, 9). Além da insulinoresistência aumentar a produção de oligómeros  $\beta$ A, esta também aumenta a agregação dos oligómeros através da associação de monosialotetrahexosilgangliósido e sinalização membranar. A insulinoresistência mediada pelos oligómeros  $\beta$ A pode criar um ciclo vicioso no qual os oligómeros estão a induzir a sua própria produção e agregação, potenciando os seus efeitos negativos sobre os neurónios, exacerbando ainda mais a patologia (11).

#### ▫ **Alterações no metabolismo da glicose**

As deficiências no metabolismo da glicose estão associadas a disfunções na sinalização por insulina, que regula o uso da glicose, o metabolismo e a síntese de ATP e também por disfunções na mitocôndria (13). A disfunção mitocondrial está associada à DA e afeta processos como o ciclo de Krebs, a fosforilação oxidativa e o shunt das pentoses, tendo sido demonstrada uma diminuição na atividade de enzimas chave como piruvato desidrogenase,  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase e transcetolase no cérebro de doentes com DA (8).

Além do declínio da função mitocondrial associado à idade, que aumenta a produção de radicais livres e dano oxidativo, foi demonstrado em modelos animais e em doentes com DA que os peptídeos  $\beta$ A acumulam na mitocôndria ainda antes da deposição das placas amilóides extracelulares. A sua inserção na membrana mitocondrial leva à disrupção da cadeia transportadora de eletrões, devido à inibição do complexo II da cadeia respiratória, diminuindo a produção de energia (6, 8). Foi também demonstrado que os oligómeros  $\beta$ A-42 podem promover a libertação do citocromo c pela mitocôndria, levando à ativação das vias apoptóticas (8).

O metabolismo adequado da glicose é necessário para o funcionamento normal do cérebro. As alterações no metabolismo da glicose ocorrem precocemente na génese da DA, tendo efeitos negativos nas funções cognitivas. Esta redução do metabolismo da glicose tem sido verificada no hipocampo de pacientes com DA (6).

### Acetilcolina

A redução do metabolismo da glicose está associada a disfunções na transmissão sináptica, devido ao facto de haver uma diminuição dos precursores do neurotransmissor acetilcolina – acetil co-enzima A e succinil co-enzima A (8). Tendo em conta que as disfunções na sinalização por insulina, também associadas à DA, causam diminuição da expressão da colina-acetiltransferase, que é a enzima responsável pela síntese da acetilcolina, estes dois fatores contribuem para a diminuição das funções colinérgica e cognitiva (13).

### Stress oxidativo

O metabolismo anormal da glicose aumenta a produção de radicais livres, como espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio. Estes levam ao esgotamento da capacidade antioxidante das células, induzem peroxidação de proteínas e lípidos e formam aductos com o ácido desoxirribonucleico (ADN) e o ácido ribonucleico (ARN), causando danos que põem em causa a integridade neuronal e podem levar à morte celular (6, 12).

Stress oxidativo aumentado é verificado tanto em doentes com diabetes como com DA, relativamente a controlos saudáveis. Num modelo animal de DA foi verificada uma diminuição na capacidade antioxidante das células e aumento da peroxidação lipídica, antes mesmo do desenvolvimento da patologia. Em pacientes com défice cognitivo ligeiro, fator de risco para o desenvolvimento de demência, foi verificado um nível aumentado de proteínas oxidadas nos lobos frontais e parietais e no hipocampo, o que sugere que o dano oxidativo pode estar implicado precocemente no desenvolvimento da DA (6).

A acumulação de peptídeos  $\beta$ A está também associada ao stress oxidativo, devido a este aumentar os níveis de PPA e modular o seu processamento. Estudos em ratos demonstraram que a peroxidação lipídica está aumentada antes do aumento dos níveis de  $\beta$ A, sendo que o início da deposição está associado a um aumento nos níveis de espécies reativas de nitrogénio. Por sua vez, o aumento da produção de  $\beta$ A leva ao aumento do

stress oxidativo, devido ao seu efeito perturbador na cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, aumentando a produção de espécies reativas de oxigénio (6).

O stress oxidativo pode ainda contribuir para a ativação de vias pró-inflamatórias, com sobrerregulação de citocinas pró-inflamatórias. Estes efeitos, conjuntamente com a ativação da microglia pelas placas  $\beta$ A, que leva à libertação de neurotoxinas e citocinas neurotóxicas, contribuem para a neuro-inflamação na DA, associada a danos neuronais. Ratos transgénicos que apresentam placas  $\beta$ A e disfunções cognitivas têm níveis mais elevados de citocinas e quimiocinas do que os controlos nativos (6).

### Formação de Produtos de Glicação Avançada

Tanto o metabolismo anormal da glicose como o stress oxidativo contribuem para a formação de produtos de glicação avançada (PGA). Os PGA são formados através de uma reação irreversível não enzimática, conhecida como reação de Maillard, na qual açúcares redutores reagem com os grupos amina livres das proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, produzindo compostos instáveis. A formação e acumulação de PGA está associada ao envelhecimento normal, mas, nos doentes com diabetes, estes processos estão aumentados (6, 7).

Os PGA estão implicados na progressão de DA, visto que foi demonstrado que induzem a glicação de peptídeos  $\beta$ A e P-tau, causando agregação  $\beta$ A e formação de tranças neurofibrilares. Recorrendo a marcação por imunofluorescência dos PGA, foi verificado que no tecido cerebral de doentes com Alzheimer diabéticos há maior concentração de PGA do que em doentes com Alzheimer não diabéticos (6, 7).

#### ▫ **Diabetes tipo 3?**

A hipótese de que a DA podia ser uma forma de diabetes específica do cérebro – Diabetes tipo 3 (DT3), foi sugerida por Suzanne de la Monte em 2005 (14). De la Monte e a sua equipa, ao examinarem tecido cerebral de doentes de Alzheimer com diferentes estadios da doença, verificaram que a expressão de insulina era inversamente proporcional ao estadio da doença. Verificaram também uma diminuição de cerca de 80% nos RI em doentes de Alzheimer, comparativamente a controlos saudáveis. Testes demonstraram ainda a existência de diminuição de ARN mensageiro da insulina, dos

fatores de crescimento semelhantes à insulina e dos seus recetores. A designação de DT3 foi dada devido a haver ao mesmo tempo diminuição da insulina e insulinoresistência (7).

De acordo com de la Monte e Tong (12), o facto de o peptídeo I semelhante a glucagon, o fator de crescimento I semelhante a insulina e a prática de restrição calórica terem efeitos neuroprotetores, suportam a hipótese de que a DA é uma doença metabólica do cérebro tipo diabetes (12).

## **Terapêutica usada no tratamento de diabetes redirecionada para a DA**

### ▫ **Insulina**

A sinalização mediada pela insulina diminui com a idade e é um fator de risco para o desenvolvimento de DA, tendo sido testada a hipótese de a correção da insulina poder ser benéfica nos doentes com DA. A administração intranasal de insulina tem sido a mais estudada, visto que é a via preferencial para atingir o SNC e produzir um efeito local, sem afetar os níveis de insulina/glucose na circulação (11).

Vários estudos têm demonstrado que a administração de insulina melhora a função cognitiva. Um exemplo é um estudo randomizado duplamente cego, que incluiu 104 doentes com défice cognitivo ligeiro ou DA, os quais receberam placebo, insulina intranasal 20 UI (baixa dose) ou 40 UI (alta dose), durante 4 meses. Comparativamente aos doentes que receberam placebo, os doentes que receberam insulina (ambas as doses) mostraram melhoria significativa na memória e em testes cognitivos. Foi feita uma tomografia de emissão de positrões a um subconjunto dos doentes do estudo e, comparativamente aos doentes que receberam insulina, os doentes que fizeram placebo mostraram absorção diminuída da glicose marcada em várias regiões do cérebro, o que é consistente com a disfunção metabólica na DA. Os benefícios da insulina intranasal mantiveram-se até 2 meses após término do tratamento, o que sugere efeitos prolongados no funcionamento do SNC (9).

Outro estudo foi feito com 25 doentes com défice cognitivo ligeiro ou DA em estadio precoce e valores de glicémia normais, tendo sido randomizados com placebo (n=12) ou insulina intranasal (n=13) duas vezes ao dia, durante 21 dias. Comparativamente aos doentes com placebo, os doentes que receberam insulina mostraram conseguir reter maior quantidade de informação verbal, *status* funcional maior e maior atenção (7).

Estudos feitos com ratos mostraram que o aumento da insulina no hipocampo e consequente sinalização por insulina melhoram a memória. Contudo, em ratos com DT2 induzido por uma dieta rica em lípidos, não se verifica esta melhoria com a terapia com insulina. Este resultado sugere que o tratamento com insulina pode não ser suficiente a partir do momento em que já se desenvolveu insulinoresistência cerebral (4). Outro autor defende que após estabelecida a insulinoresistência a insulina pode ainda exercer o seu papel benéfico por estimulação de outros recetores, como os dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (2).

Os efeitos benéficos no desempenho cognitivo do uso da insulina intranasal estão, contudo, limitados aos indivíduos que não possuem o alelo  $\epsilon 4$  da ApoE, visto que os indivíduos ApoE  $\epsilon 4$  positivos não mostraram obter melhorias significativas (13).

#### ▫ **Outras alternativas**

Os agonistas do recetor do peptídeo I semelhante ao glucagon, como o exenatido e o liraglutido, são uma opção ao tratamento com insulina porque ativam vias de sinalização convergentes com as da insulina, através da ativação da sinalização dependente de proteínas-G. A ativação destes recetores facilita a plasticidade sináptica no hipocampo, a cognição e a sobrevivência neuronal. Num modelo transgénico de DA, ambos os agonistas mostraram restaurar a sinalização por insulina que está diminuída, diminuindo assim a acumulação de peptídeos  $\beta A$  e melhorando a cognição (2).

O exenatido demonstrou bloquear a resistência à insulina induzida pelos oligómeros  $\beta A$  em cultura de neurónios do hipocampo, tendo sido recentemente descoberto que este reduz a ativação da cinase c-Jun N-terminal. Num modelo transgénico de DA o exenatido mostrou restaurar a sinalização por insulina, diminuir a acumulação de  $\beta A$  e melhorar a cognição (2, 11). Já o liraglutido em modelos animais de DA demonstrou diminuir os oligómeros  $\beta A$ , a formação de placas neuríticas e a ativação microglial, aumentando ainda a memória espacial e o reconhecimento de objetos (10).

O fármaco pramlintide está aprovado nos Estados Unidos como terapia adjunta com insulina no tratamento da diabetes. É um análogo sintético do peptídeo amilina, que é co-secretado com a insulina pelas células pancreáticas  $\beta$ . A amilina no SNC está implicada na memória, humor, ansiedade e saciedade. O uso de pramlintide em ratos melhorou a memória, a performance no reconhecimento de novos objetos e diminuiu os marcadores

inflamatórios e o *stress* oxidativo no hipocampo. Os autores consideram que é uma boa alternativa para estudo no tratamento de DA (9).

A metformina é usada na DT2 para aumentar a sensibilidade à insulina e está reportada como tendo um papel protetor contra complicações da DT2, incluindo disfunção cognitiva e doença vascular cerebral (13). A metformina tem capacidade de atravessar a BHE e em culturas de neurónios insulinoresistentes, de modelos animais de DA, mostrou ter um efeito neuroprotetor e diminuir os níveis extracelulares de  $\beta$ A (10). Apesar de a metformina aumentar os níveis da PPA, devido à expressão aumentada da  $\beta$ -secretase I, quando esta é administrada junto com insulina tem um efeito neuroprotetor contra a ação negativa dos oligómeros  $\beta$ A sobre os RI (13).

Tendo em conta que a via de sinalização SI-RI  $\rightarrow$  Akt está bastante diminuída, fármacos que modulassem essa via seriam uma boa alternativa no tratamento de Alzheimer. Apesar de ainda não ter sido aprovado nenhum fármaco que atue nessa via, uma classe que está em desenvolvimento são os inibidores do recetor da proteína tirosina fosfatase IB (PTPIB). PTPIB é um regulador negativo da sinalização por insulina e leptina e os seus inibidores demonstraram restaurar essa sinalização e diminuir a inflamação no cérebro em modelos pré-clínicos. Existem moléculas inibidoras de PTPIB em várias fases de desenvolvimento clínico, sendo que há duas em fase 2 (9).

### **Intervenções não farmacológicas**

O estilo de vida inadequado com elevado consumo de comidas processadas, altamente calóricas, ricas em açúcar e gordura, e o sedentarismo estão associados ao aumento da obesidade e insulinoresistência. Nos últimos 40 a 50 anos tem sido verificado um aumento significativo das doenças relacionadas com insulinoresistência como DT2, esteatose hepática, síndrome metabólico, disfunções cognitivas e doenças cardiovasculares (12).

Dado o papel da insulinoresistência nas disfunções cognitivas e neurodegeneração e visto que esta está associada maioritariamente a variáveis controláveis do estilo de vida, a intervenção a este nível é uma opção promissora para tentar prevenir ou reduzir a morbilidade e mortalidade associadas às disfunções cognitivas e DA (13). Por exemplo, está demonstrado indivíduos obesos apresentam o dobro do risco de desenvolver DA, mas intervenções ao nível do estilo de vida que permitam diminuir a gordura visceral, melhoram

a sensibilidade à insulina e o controlo glicémico, bem como a performance cognitiva e a função neuronal (12, 13).

Foi conduzido um estudo de 2 anos na Finlândia (setembro de 2009 a novembro de 2011), cujo objetivo era avaliar os resultados de uma intervenção multifatorial na prevenção do declínio cognitivo em idosos com fatores de risco para desenvolver demência. No ensaio randomizado, duplamente cego, foram incluídos 2654 indivíduos de 60 a 77 anos, com fatores de risco cardiovasculares, risco de demência e níveis de cognição dentro da média ou ligeiramente abaixo do esperado para a idade. Foram randomizados 1:1 num grupo de teste e num grupo controlo. O grupo de controlo recebeu aconselhamento geral de educação para a saúde. No grupo de teste foram feitas 4 intervenções – aconselhamento nutricional personalizado com seguimento; programa de exercício físico (treino de força muscular e aeróbico); treino cognitivo (sessões de grupo com psicólogos e treino individual num programa de computador) e gestão do risco vascular (controlo de parâmetros como a tensão arterial, o peso, índice de massa corporal e perímetro abdominal, bem como recomendações para um estilo de vida saudável) (15).

Após os 24 meses de estudo concluiu-se que houve uma melhoria de 25% nos resultados dos testes neuropsicológicos no grupo de teste, comparativamente ao controlo. Verificaram-se ainda melhorias na função executiva – 83% e na velocidade de processamento – 150%, relativamente ao controlo. De acordo com os resultados obtidos, determinou-se a existência de risco aumentado de declínio cognitivo no grupo controlo, comparativamente ao grupo de teste. Este estudo permitiu comprovar que uma intervenção multifatorial a nível dos fatores de risco modificáveis, relacionados com o estilo de vida, permite manter ou melhorar a função cognitiva e reduzir o risco de declínio cognitivo (15).

## **Conclusão**

Durante muitos anos pensou-se que a disfunção e morte de neurónios se devia à deposição anormal de proteínas e presença das placas amilóides. Contudo, à medida que foi aumentando o conhecimento sobre a doença, começaram a surgir evidências de que a DA estava associada a alterações metabólicas do cérebro.

O surgimento de evidências de que os doentes com disfunções na insulina, seja com deficiente produção ou resistência à sua ação, apresentavam alterações cognitivas e risco aumentado de demência, veio fornecer uma pista sobre a importância do seu papel no SNC.

Além disso, o Estudo de Roterdão, que demonstrou que a existência de DT2 duplicava o risco de desenvolver DA, veio abrir portas para novas investigações acerca dos mecanismos moleculares que ligavam estas duas doenças, ambas associadas à idade e com um crescimento exponencial nos tempos que correm.

Atualmente, sabe-se que é a insulinoresistência no cérebro, potenciada pela insulinoresistência e hiperinsulinemia periférica, que leva ao processamento aberrante de proteínas, à diminuição de todos os processos neuronais associados à sinalização por insulina e à diminuição do uso da glicose e do metabolismo energético, sendo que esta cascata patológica que vai causar os achados típicos da DA e ainda criar um ciclo vicioso, que leva à exacerbação da própria insulinoresistência e à progressão da doença.

Felizmente, o maior conhecimento fisiopatológico da doença permite-nos tentar atuar sobre os fatores de risco modificáveis que estão associados ao desenvolvimento de insulinoresistência e, no caso de doentes com DT1 ou DT2, devido ao seu risco acrescido para desenvolver demência e DA, tentar promover uma melhor gestão da doença.

O Farmacêutico pode ter um papel preponderante a nível da educação para a saúde, reforçando a importância da adoção de um estilo de vida saudável, com uma alimentação adequada, controlo do peso, perímetro abdominal e índice de massa corporal, controlo da tensão arterial e de parâmetros lipídicos. É também importante, no caso de doentes com diabetes, reforçar a importância não só de manter um estilo de vida saudável como também da adesão à terapêutica para fazer uma correta gestão da glicémia, com vista a diminuir as complicações associadas às disfunções da insulina.

Os resultados positivos obtidos com o direcionamento de medicamentos utilizados na diabetes para o tratamento das disfunções da insulina verificadas na DA, bem como a identificação de potenciais alvos para o desenvolvimento/estudo de novas moléculas, abriram ainda novas possibilidades para o tratamento da DA.



## Referências bibliográficas

- (1) DL n.º 131/2015 – **Estatuto da Ordem dos Farmacêuticos**. 1ª Série, N.º 173, 4 de setembro de 2015.
- (2) FELICE, F. – **Alzheimer’s disease and insulin resistance: translating basic science into clinical applications**. J. Clin. Invest. 123:2 (2013) 531–539.
- (3) REITZ, C.; MAYEUX, R. – **Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers**. Biochem. Pharmacol. 88:4 (2014) 640–651.
- (4) STANLEY, M.; MACAULEY, S.; HOLTZMAN, D. – **Changes in insulin and insulin signaling in Alzheimer’s disease: cause or consequence?** J. Exp. Med. 213:8 (2016) 1375–1385.
- (5) COLE, A.; ASTELL, A.; GREEN, C.; SUTHERLAND, C. – **Molecular connexions between dementia and diabetes**. Neurosci. Biobehav. Rev. 31 (2007) 1046–1063.
- (6) SIMS-ROBINSON, C.; KIM, B.; ROSKO, A.; FELDMAN, E. – **How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology?** Nat. Rev. - Neurol. 6:10 (2011) 551–559.
- (7) KRONER, Z. – **The relationship between Alzheimer’s disease and diabetes: Type 3 diabetes?** Altern. Med. Rev. 14:4 (2009) 373–379.
- (8) CHEN, Z.; ZHONG, C. – **Decoding Alzheimer’s disease from perturbed cerebral glucose metabolism: Implications for diagnostic and therapeutic strategies**. Prog. Neurobiol. 108 (2013) 21–43.
- (9) YARCHOAN, M.; ARNOLD, S. – **Repurposing Diabetes Drugs for Brain Insulin Resistance in Alzheimer Disease**. Diabetes. 63 (2014) 2253–2261.
- (10) TALBOT, K.; WANG, H.; KAZI, H.; HAN, L.; BAKSHI, K.; STUCKY, A.; FUINO, R.; KAWAGUCHI, K.; SAMOYEDNY, A.; WILSON, R.; ARVANITAKIS, Z.; SCHNEIDER, J.; WOLF, B.; BENNETT, D.; TROJANOWSKI, J.; ARNOLD, S. – **Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer’s disease patients is associated with IGF-I resistance, IRS-I dysregulation, and cognitive decline**. J. Clin. Invest. 122:4 (2012) 1316–1338.

- (11) FELICE, F.; LOURENCO, M.; FERREIRA, S. – **How does brain insulin resistance develop in Alzheimer’s disease?**. *Alzheimer’s Dement.* 10 (2014) S26–S32.
- (12) DE LA MONTE, S.; TONG, M. – **Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer’s disease.** *Biochem. Pharmacol.* 88:4 (2014) 548–559.
- (13) DE LA MONTE, S. – **Contributions of Brain Insulin Resistance and Deficiency in Amyloid-Related Neurodegeneration in Alzheimer’s Disease.** *Drugs.* 72:1 (2015) 49–66.
- (14) STEEN, E.; TERRY, B.; RIVERA, E.; CANNON, J.; NEELY, T.; TAVARES, R.; XU, J.; WANDS, J.; DE LA MONTE, S. – **Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer’s disease – is this type 3 diabetes?**. *J. Alzheimer’s Dis.* 7 (2005) 63–80.
- (15) NGANDU, T.; LEHTISALO, J.; SOLOMON, A.; LEVÄLAHTI, E.; AHTILUOTO, S.; ANTIKAINEN, R.; BÄCKMAN, L.; HÄNNINEN, T.; JULA, A.; LAATIKAINEN, T.; LINDSTRÖM, J.; MANGIALASCHE, F.; PAAJANEN, T.; PAJALA, S.; PELTONEN, M.; RAURAMAA, R.; STIGSDOTTER-NEELY, A.; STRANDBERG, T.; TUOMILEHTO, J.; SOININEN, H.; KIVIPELTO, M. – **A 2 year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): A randomised controlled trial.** *Lancet.* 385 (2015) 2255–2263.

**Foto de capa adaptada de:**

Linnea Rundgren – **Eureka Prize: Neuron with Alzheimer disease.** 12/09/2012. [Acedido a 29 de agosto de 2016]. Disponível na Internet: <http://australianmuseum.net.au/image/neuron-with-alzheimer-disease>