

Paula Alexandra Couceiro de Oliveira

# Potencial da administração de insulina intranasal na farmacoterapia da Doença de Alzheimer

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Ana Cristina Fortuna e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

---

Assinatura da Tutora

(Professora Doutora Ana Cristina Fortuna)

---

Assinatura da Aluna

(Paula Alexandra Couceiro de Oliveira)



### Declaração

Eu, Paula Alexandra Couceiro de Oliveira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009009845, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular 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 deste Relatório, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 07 de Julho de 2014.

---

(Paula Alexandra Couceiro de Oliveira)

## **Dedicatória**

Dedico a presente monografia aos meus pais,  
pela sua enorme dedicação e apoio ao longo de todo o meu percurso académico.

## Agradecimentos

Em primeiro lugar gostava de agradecer à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pelo excelente percurso académico proporcionado nos últimos cinco anos. A oportunidade de crescimento profissional e pessoal proporcionado foi motivante e única. De facto, dentro da enorme equipa que o quadro da presente faculdade incorpora, desejo agradecer com maior destaque a todos os meus Professores. Todos eles, com o seu estilo próprio, constituíram parte integrante do meu crescimento como Farmacêutica e como pessoa. Pelo que não é de admirar que a presente monografia apresente contribuições simbólicas de todos vós.

Contudo, quero agradecer particularmente à minha tutora Prof. Dra. Ana Fortuna, a qual se mostrou uma forte fonte de inspiração e motivação, bem como um alicerce essencial na elaboração do presente projeto.

Deixo também toda a minha gratidão ao Luís Saraiva, que sempre me dedicou todo o seu carinho e amor ao longo destes anos.

Agradeço ainda a toda a minha família, a qual, de forma incondicional, sempre me prestou todo o seu apoio e confiança.

Por fim, gostava também de oferecer o meu honesto reconhecimento a todos os verdadeiros amigos que ganhei durante esta vida académica, sem os quais nada teria sido o mesmo. A todos os restantes colegas de curso, deixo um honesto obrigado pela camaradagem comigo partilhada.

A todos, um muito Obrigada!

## **Índice**

Abreviaturas.....	8
Resumo .....	9
Abstract .....	9
Introdução.....	10
Capítulo I - Doença de Alzheimer .....	12
Capítulo II - Insulina e a Doença de Alzheimer .....	13
Evidências da Função Cognitiva da Insulina em Indivíduos Saudáveis.....	14
Evidências da Função Cognitiva da Insulina na Doença de Alzheimer.....	15
Mecanismos Subjacentes à Ação da Insulina na Doença de Alzheimer.....	18
Capítulo III - Administração Intranasal de Insulina na Doença de Alzheimer .....	20
Vantagens da administração Intranasal de Insulina na Doença de Alzheimer.....	20
Evidências da Eficácia da Insulina Intranasal na Doença de Alzheimer .....	22
Conclusão.....	25
Referências Bibliográficas.....	27

## **Índice de Figuras**

Figura 1 - Esquema representativo da ação da insulina no desenvolvimento da DA .....	12
Figura 2 – Esquema elucidativo das deficiências na sinalização da insulina em doentes com DA.....	15
Figura 3 – Gráfico representativo dos níveis de insulina no LCR em função do tempo .....	20
Figura 4 - Áreas de hipometabolismo no início e fim do tratamento, com comparação entre as mudanças visualizadas entre os dois períodos, bem como entre o grupo controlo e os grupos que receberam insulina.....	22

## Abreviaturas

APOE – Apolipoproteína E.

BHE – Barreira Hematoencefálica.

DA – Doença de Alzheimer.

EDI – Enzima Degradadora de Insulina.

GSK3 – Glucogénio Sintase Quinase 3.

I-ChE – Inibidores da Enzima Colinesterase.

LCR – Líquido Cefalorraquidiano.

PET – Tomografia por Emissão de Positrões.

PI3K – Fosfoinosítido – 3 – Quinase.

SNC – Sistema Nervoso Central.

### Resumo

Apesar de atualmente atingir cerca de 35 milhões de pessoas em todo o mundo, a Doença de Alzheimer (DA) carece ainda de um tratamento eficiente que permita a sua cura. De facto, as estratégias terapêuticas atuais limitam-se à mitigação dos principais sintomas da doença e consequente melhoria da qualidade de vida dos doentes. Para além disso, as abordagens mais comumente usadas apresentam alguma heterogeneidade na sua resposta terapêutica, quer a nível inter quer intra-individual, incentivando a investigação de novas alternativas terapêuticas para a DA. Dentro destas, um especial destaque tem sido recentemente dado à insulina e à sua administração por via intranasal, uma vez que esta se apresenta cada vez mais como uma forte candidata, devido à sua segurança e eficácia comprovadas.

Assim, a presente monografia pretende sintetizar de forma rigorosa, todas as descobertas feitas neste âmbito. Percorrendo um caminho desde a descoberta da insulina até à revelação da sua capacidade neuro-protetora e moduladora cognitiva na DA, o principal objetivo desta monografia consiste em apresentar as potencialidades existentes para a aplicação desta nova estratégia terapêutica na DA.

### Abstract

Although it is estimated to affect 35 million people worldwide, Alzheimer's disease (DA) lacks from an effective treatment that allows its cure. Indeed, the therapeutic strategies currently available intend to attenuate the main symptoms of the disease to provide a better quality of life for the majority of the patients. Furthermore, the approaches most commonly employed in clinic exhibit heterogeneous therapeutic responses at inter- and intra-individual levels. Both facts have prompted to investigate new therapeutic strategies to DA, among which intranasal administration of insulin emerges as a strong candidate to treat DA due to its safety and effectiveness profiles.

Thus, the present monograph intends to carry out a close review on the potentialities of the application of this new therapeutic alternative on DA, including information from insulin discovery to the most recent revelation of its modulator and neuroprotective activities in DA.

### Introdução

A Doença de Alzheimer (DA) consiste numa patologia neurodegenerativa crónica, que representa atualmente 70% dos casos de demência descritos mundialmente (1). De facto, este valor, já por si preocupante, parece encontrar-se numa persistente evolução, estimando-se que duplicará nos próximos quinze anos (2). Assim, não é de estranhar que esta doença se tenha tornado numa das maiores preocupações médicas e socioeconómicas da atual comunidade científica (2).

Como se trata de uma doença até ao momento sem cura, a principal abordagem terapêutica compreende a aplicação de medidas capazes de atenuar provisoriamente os seus principais sintomas, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida dos doentes. Contudo, a maioria das terapias instituídas são limitadas na sua ação terapêutica, uma vez que só combatem alguns sintomas e não a causa da doença em si. Desta forma, torna-se cada vez mais necessário procurar novas alternativas terapêutica (3). De entre as várias estratégias em investigação nos dias de hoje, um especial destaque tem sido dado ao uso da insulina como possível potenciadora da função cognitiva em doentes com demência.

A descoberta da insulina em 1916 destacou-se essencialmente pelo seu crucial papel como principal reguladora do metabolismo energético (4). Ao longo dos anos, a sua função como estimuladora do transporte de glucose para o interior das células musculares esqueléticas, foi o principal foco das investigações efetuadas. Isto originou uma desvalorização inicial da sua presença ao nível do Sistema Nervoso Central (SNC). Porém, na década de 80, muitos estudos começaram a emergir, apresentando a insulina não só como uma molécula essencial no transporte de glucose para células do SNC, como a toda a neurotransmissão cerebral (4,5). Devido à descoberta de recetores de insulina no órgão em questão e à capacidade da mesma atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), desencadeou-se assim uma nova era de investigação, a qual posteriormente conduziu à corroboração desta teoria (4,5).

Esta nova revelação incentivou a elaboração de novos estudos na área da demência, os quais se centralizaram maioritariamente no possível papel da insulina no metabolismo patogénico da DA (4). Esta focalização deveu-se particularmente à já existente suspeita de que a Diabetes Mellitus do tipo 2 é um forte fator de risco para o desenvolvimento da doença, bem como à descoberta *postmortem* da existência de resistência à insulina em cérebros de

## Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Potencial da administração de insulina intranasal na farmacoterapia da Doença de Alzheimer

indivíduos diagnosticados com DA (4,5). Para além disso, várias são as pesquisas que demonstram a presença de recetores de insulina na região do hipocampo, o qual é bem conhecido por ter uma participação ativa na aquisição e na preservação da memória (5).

É ainda relevante destacar que a insulina, como proteína que é, apresenta uma biodisponibilidade oral bastante limitada, o que leva a que a maioria dos estudos efetuados para avaliar o seu efeito no SNC, recorram à administração intravenosa ou intranasal (4,6), revelando esta última uma maior eficácia e segurança (5,6). No entanto, devido à insulinoresistência detetada *postmortem* pelo decréscimo de recetores de insulina em cérebros de doentes com DA, o uso sensibilizadores da insulina da classe das tiazolidinedionas, como a pioglitazona, também tem vindo a ser avaliado (4).

Em diversos estudos realizados em animais e humanos, a administração de insulina por via intranasal demonstra ser capaz de aumentar o desempenho cognitivo em doentes com DA (2). E, embora os mecanismos responsáveis por este resultado ainda não sejam completamente conhecidos, acredita-se que a insulina possui uma atividade neuro-protetora intrínseca, uma vez que aquela melhoria também é observada em indivíduos saudáveis (2).

Portanto, tendo em conta que a administração intranasal de insulina tem emergido cada vez mais como uma nova estratégia terapêutica com elevada probabilidade de sucesso na DA, a presente monografia pretende abordar detalhadamente todo o seu potencial na DA, bem como analisar as suas possíveis aplicações futuras.

### Capítulo I - Doença de Alzheimer

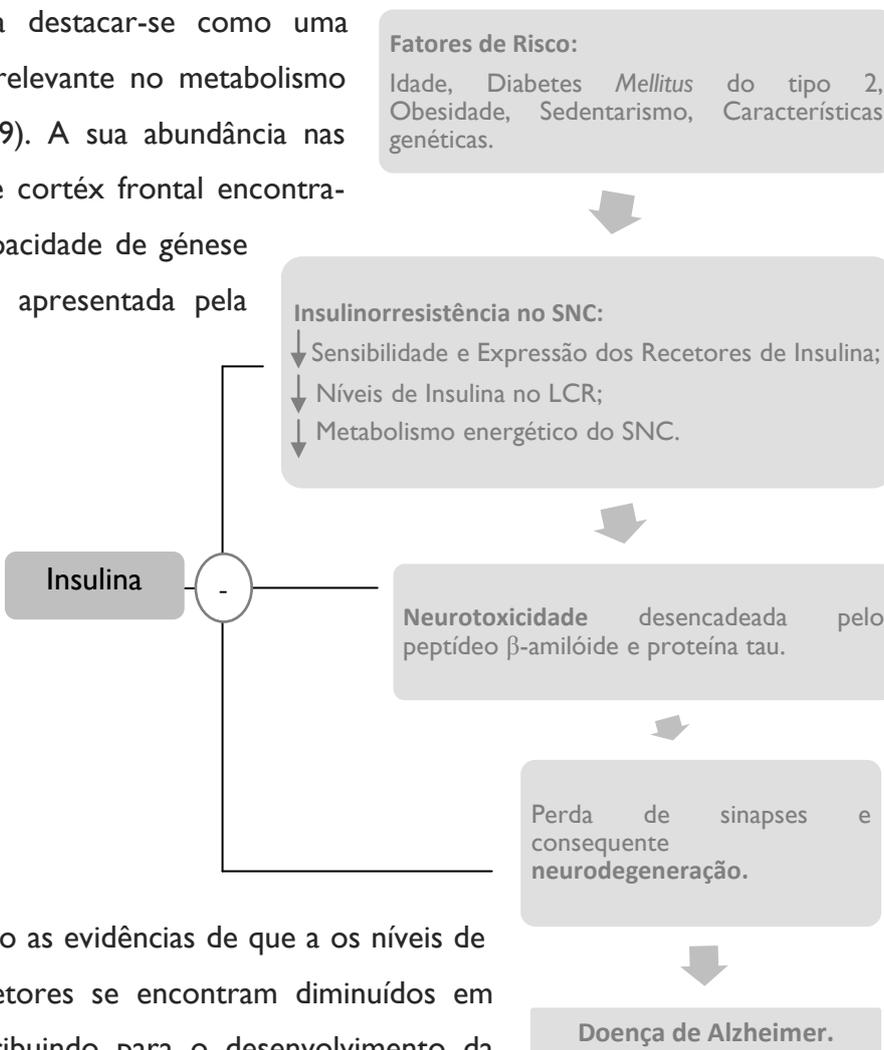
A Doença de Alzheimer é uma patologia neurodegenerativa caracterizada fundamentalmente por alterações de memória e de outras funções cognitivas como a concentração, linguagem e pensamento. Com o progredir da patologia, também é comum o aparecimento de alterações comportamentais, depressão e alterações nas capacidades motoras dos doentes (7,8) Trata-se de uma progressão lenta mas, infelizmente, irreversível, conduzindo à inadaptação do indivíduo na sociedade. De facto, a DA é atualmente a principal causa de demência em adultos, sobretudo em indivíduos com idade superior a 60 anos (7), crendo-se que esta incidência tem propensão a exacerbar-se num futuro próximo (2).

A origem molecular desta patologia reside sobretudo em dois processos: na formação extracelular das chamadas placas neuríticas, derivadas da acumulação anormal do peptídeo  $\beta$ -amilóide devido a um desequilíbrio entre a sua produção e clearance (9); e no aparecimento intracelular de nódulos neurofibrilares, devido ao colapso originado pela hiperfosforilação da proteína tau, estabilizadora de microtúbulos e abundante nos neurónios do SNC. (7,10). Estas disfunções metabólicas aparentam ser as principais responsáveis pela destruição neuronal que exhibe uma maior prevalência ao nível sináptico do sistema colinérgico, especialmente nas regiões do córtex frontal e hipocampo (6,11). Sendo o sistema colinérgico o principal responsável pela formação da memória nestas áreas, facilmente se entende a liderança dos Inibidores da Colinesterase (I-ChE) na terapêutica atual da DA (7,11). Ao facilitarem o aumento da quantidade de acetilcolina na fenda sináptica, os I-ChE conseguem retardar os sintomas mais característicos da DA.

Contudo, esta farmacoterapia possui limitações. Para além dos efeitos secundários mais comumente associados à hiperactivação colinérgica, onde se destacam alterações gastrointestinais e perturbações do sono, a terapêutica com I-ChE nem sempre é eficaz na DA. Enquanto alguns doentes conseguem beneficiar notoriamente desta terapia, outros não demonstram qualquer alteração (7). Pelo que, sendo a sua eficácia tão imprevisível e a sua ação tão limitada à componente sintomática, não é de admirar que cada vez mais se procurem outras alternativas.

## Capítulo II - Insulina e a Doença de Alzheimer

A insulina tem vindo a destacar-se como uma proteína cada vez mais relevante no metabolismo ao nível do SNC (2,5,6,9). A sua abundância nas sinapses do hipocampo e córtex frontal encontra-se relacionada com a capacidade de génese e remodelação sináptica apresentada pela mesma (6,9). Adicionalmente, a insulina também se revelou uma importante mediadora do metabolismo energético destas regiões, com especial destaque para o hipocampo.



Para além disto, fortes são as evidências de que a os níveis de insulina e dos seus recetores se encontram diminuídos em doentes com DA, contribuindo para o desenvolvimento da patologia (2,6). Esta relação ainda não se encontra completamente esclarecida (Figura 1) mas acredita-se que a ausência de insulina potencia os principais mecanismos fisiopatológicos que desencadeiam a DA, como a deposição acentuada do peptídeo  $\beta$ -amilóide e a hiperfosforilação da proteína tau (2,5,6,9)

Figura 1 – Esquema representativo da ação da insulina no desenvolvimento da Doença de Alzheimer. (Adaptado de 2)

### Evidências da Função Cognitiva da Insulina em Indivíduos Saudáveis

Como já foi mencionado anteriormente, a descoberta da insulina como neuro-protetor e importante regulador do metabolismo energético do SNC só começou a ser aprofundada nas últimas décadas. A primeira demonstração em indivíduos saudáveis de que, de facto, a insulina melhora a memória foi efetuada há cerca de dez anos. Trinta e oito estudantes saudáveis foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, tendo sido o grupo controlo administrado com placebo e o grupo teste com 160 UI de insulina por dia durante sete semanas consecutivas (5,12). Quer no início quer no final do tratamento, todos os intervenientes foram oralmente deparados com 30 palavras, as quais tinham que escrever uma semana depois (5,12). Em comparação ao grupo de controlo, foi possível observar uma melhoria significativa na memória declarativa dos indivíduos que receberam insulina (2,5,12). Estudos posteriores revelaram ainda que uma única administração de insulina é suficiente para melhorar este tipo de memória (2,5,12). Todos estes dados permitiram confirmar a importante participação da insulina no processo de formação da memória dependente do hipocampo, como é o caso da memória declarativa.

Com o avançar da investigação, a insulina foi adquirindo um carácter cada vez mais multidisciplinar, devido às diversas funções que demonstrou exercer no SNC. Com a verificação de que o hipocampo é rico em recetores de insulina, foi possível delimitar a sua localização sobretudo ao nível das sinapses, onde a insulina desempenha um papel fulcral na neuroplasticidade (2,6). De facto, estudos demonstraram uma intervenção ativa da mesma na translocação de recetores  $GABA_A$  do meio intracelular para a região sináptica (11). Para além disso, contrariamente ao estigma anteriormente imposto, a insulina também se revelou essencial na utilização da glucose em algumas regiões do cérebro como o hipocampo, sendo determinante no metabolismo energético do mesmo (2,6). Assim, é possível evidenciar que a insulina detém uma função moduladora de grande interesse, embora alguns estudos *in vivo* demonstrem que a sua ausência cerebral não produz grandes deficiências no processo de aprendizagem e memorização (11). Este facto pode ser facilmente explicado pela existência de outros mecanismos compensatórios, que expõem a insulina como uma intervenção necessária mas não suficiente à formação de memórias (11).

Contudo, a insulina não é significativamente sintetizada a nível cerebral (11,13). Pelo que, para uma melhor compreensão das suas funções, é preciso conhecer o mecanismo pelo qual

## Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Potencial da administração de insulina intranasal na farmacoterapia da Doença de Alzheimer

a insulina, sintetizada pelo pâncreas, tem acesso ao cérebro. A maioria dos estudos apontam para um transporte através da BHE baseado em recetores saturáveis na presença de elevados níveis de insulinemia, não induzindo a hipoglicémia (11,13). Estes recetores não apresentam, no entanto, uma distribuição cerebral homogénea, destacando-se sobretudo a sua presença ao nível do bulbo olfativo (onde são expressos em quantidades 8 vezes superiores às observadas em todo o resto do cérebro), seguido pela espinal medula e hipotálamo (11,13). A maior predominância do transportador no bulbo olfativo corrobora o facto de esta região exibir a maior concentração de insulina detetada no SNC, motivando a atual contestação desta zona como principal área de transporte da mesma (11,13).

### Evidências da Função Cognitiva da Insulina na Doença de Alzheimer

Apesar da relação entre a resistência à insulina e a DA se demonstrar cada vez mais evidente, os mecanismos subjacentes só agora começaram a ser desvendados (2).

Estando descritos vários fatores de risco para o desenvolvimento desta doença, tais como a idade, Diabetes *Mellitus* tipo 2 e fatores genéticos (2), é compreensível a clara interligação destes com a ausência de insulina em doentes com DA.

A idade é um conhecido fator de risco da DA, uma vez que a eliminação neuronal do peptídeo  $\beta$ -amilóide é menos eficaz levando à acumulação do mesmo e consequentemente promovendo o desenvolvimento da DA (6,11). Para além disto, com o progredir da idade, observa-se uma significativa diminuição dos níveis de insulina no líquido cefalorraquidiano (LCR) (2,11), tal como em doentes com DA, sugerindo que o transporte de insulina através da BHE se encontra comprometido (11). Logo, sendo o envelhecimento um potente fator de risco para o desenvolvimento de DA, é evidente que o decréscimo de insulina poderá ser um dos fundamentos patológicos que desencadeia este desfecho. Contudo, não se pode descartar a hipótese de que esta alteração pode ser uma consequência do aparecimento de DA, e não uma causa (11), pelo que mais estudos são necessários para se compreender melhor esta visão.

Um outro grande fator de risco frequentemente associado ao desenvolvimento de DA é a Diabetes *Mellitus* tipo 2 (2,4,5,11). Atualmente, existem vários ensaios que tentam perceber o papel desta patologia no cérebro e, consequentemente, na demência (14,15). Com a

descoberta de que a atrofia cerebral é 40% mais frequente em doentes diabéticos, quando comparados com indivíduos saudáveis (11,16), originou-se uma avalanche de ensaios à procura de uma relação entre a Diabetes Mellitus tipo 2 e a disfunção cognitiva (14,15). Unanimemente, as múltiplas pesquisas efetuadas neste âmbito concluíram que a Diabetes Mellitus tipo 2 é um forte fator de risco para o declínio cognitivo (11,14,15).

Estas evidências encaminharam a investigação para uma avaliação mais específica, nomeadamente na relação entre a Diabetes Mellitus tipo 2 e a DA, quando coexistentes no mesmo doente. Ainda que alguns estudos tenham apontado para uma possível sinergia patológica entre estas duas doenças (11,14,15), estudos mais recentes demonstram que estes indivíduos exibem uma menor decadência cognitiva do que os indivíduos apenas com

DA (4). A medicação dos doentes diabéticos com antidiabéticos orais provavelmente atenua os efeitos nefastos gerados na memória pelo aumento da resistência à insulina (4). Esta observação parece ser suportada pelas atuais evidências de que o uso de pioglitazona como adjuvante terapêutico da metformina na Diabetes Mellitus tipo 2 estabiliza a capacidade cognitiva dos doentes, quando comparado com o grupo controlo, o qual consiste em doentes diabéticos apenas a tomar metformina. (4).

Sabendo-se ainda que o nível de dessensibilização cerebral à insulina está negativamente correlacionado com a magnitude das disfunções cognitivas estudadas (2), permanece uma questão por responder: como é que esta resistência se instala? Apesar de não existirem provas científicas concretas, acredita-se que o mecanismo subjacente ao desenvolvimento da insulinoresistência no SNC é similar ao observado a nível periférico (4). De facto, as proteínas envolvidas na cascata de ativação da captação intracelular de glucose, evidenciadas na Figura 2, parecem encontrar-se

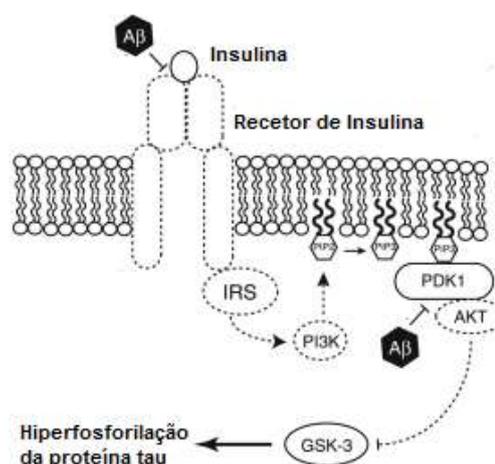


Figura 2 – Esquema elucidativo das deficiências na sinalização da insulina em doentes com DA.

A insulina liga-se ao recetor mas não há activação da via PI3K devido a deficiências nas proteínas envolvidas intracelularmente, as quais se encontram salientadas a tracejado. (Aβ – peptídeo β-amilóide; GSK-3 – Glicogénio Sintase Quinase-3; AKT – Proteína Quinase B; IRS – Substrato do Recetor de Insulina; PDK1 – Quinase – 3- Fosfoinosítídeo dependente; PI3K – Fosfoinosítídeo-3-quinase). (Adaptado de 4)

diminuídas em doentes com DA, tal como acontece nos indivíduos com Diabetes *Mellitus* tipo 2 (4).

Olhando assim para todo o panorama relacionado com a Diabetes *Mellitus* tipo 2 e a DA, é possível concluir que a pesquisa pela presença de insulinoresistência pode ser uma medida não-invasiva viável para estimar o risco dos indivíduos saudáveis virem a desenvolver a DA (2).

Um terceiro fator de risco com grande relevância no desenvolvimento da DA localiza-se a nível genético, particularmente porque o gene da apolipoproteína E (APOE), mais especificamente o seu alelo e4, apresenta um papel decisivo na predisposição para o desenvolvimento desta doença (4). Este alelo está fortemente associado a um aumento dos nódulos neurofibrilares e das placas neuríticas, com especial destaque para a região do hipocampo (11). Desta forma a sua influência na eficácia da ação da insulina como moduladora cognitiva foi analisada e revelou-se que, independentemente da via de administração, a presença do alelo e4 comprometia a ação terapêutica da insulina (2,4,6). Pesquisas efetuadas divulgaram a fraca resposta na potenciação da memória detetada em doentes com DA e APOEe4 positivos, comparativamente quer com doentes sem este alelo quer com indivíduos saudáveis (2). Por conseguinte, como será referido posteriormente, a existência do alelo e4 do gene da APOE condiciona a dose de insulina a ser administrada por via intranasal a doentes com DA de insulina (2,4,11).

Por fim, estudos efetuados no decorrer da última década têm evidenciado a relação entre a DA e a melhoria da memória em doentes aos quais foi administrada insulina. A administração intranasal de insulina nestes doentes durante três semanas evidencia uma melhoria na capacidade de memorização verbal (5). É perceptível que este tema se encontra assim num promissor desenvolvimento devido às notórias melhorias na função cognitiva detetadas simultaneamente em diferentes estudos.

### Mecanismos Subjacentes à Ação da Insulina na Doença de Alzheimer

Como se descreveu anteriormente, a diminuída atividade da insulina pode assim contribuir para um potencial agravamento da função cognitiva, especialmente na DA (6). Deste modo, o restauro das funções cerebrais da mesma pode originar um benefício terapêutico significativo (6).

Uma das abordagens presentemente em estudo consiste na administração oral de insulino-sensibilizadores. Isto porque, para além do notório decréscimo de insulina ao nível do LCR em doentes com DA, há também uma comprovada redução do número de recetores de insulina expressos no cérebro (2). Para além de serem facilmente administrados, os fármacos insulino-sensibilizadores são já bem conhecidos, uma vez que se encontram atualmente aprovados para o tratamento da Diabetes *Mellitus* de tipo 2 (4). A classe das tiazolidinedionas, onde se inclui a pioglitazona, já apresenta varios estudos pré-clínicos e clínicos nesta área, tendo conseguido comprovar uma melhoria significativa da disfunção cognitiva na DA (4). Porém, a pioglitazona está associada a um ligeiro aumento do risco de cancro da bexiga, só podendo ser usada como segunda linha terapêutica em certos casos de Diabetes *Mellitus* tipo 2 (17), o que condiciona o uso da mesma.

A atenção concentra-se desta forma na administração da insulina e das vantagens que esta transporta. Embora os mecanismos pelos quais a insulina favorece a formação de memória ainda não estejam totalmente dominados, existem efetivamente estudos que já revelaram algumas possibilidades para a ação intracelular da insulina em indivíduos diagnosticados com DA.

Alguns dos estudos elaborados *in vitro* deram a conhecer uma potencial ligação entre a insulina e o peptídeo  $\beta$ -amilóide (4,5,9,18) tendo-se verificado que a insulina consegue atenuar a degeneração neurológica gerada pelo peptídeo (9,18). Acredita-se que este acontecimento resulta do facto de a insulina promover a degradação do peptídeo  $\beta$ -amilóide pois ativa a enzima que o degrada que se designa de enzima degradante de insulina (EDI) (9,10,18). Adicionalmente, alguns estudos referem que a insulina também é capaz de aumentar a clearance deste peptídeo através da potenciação do transporte deste para o meio extracelular (4,9,10).

Ainda no que diz respeito ao papel intracelular da insulina na DA, destacam-se algumas investigações que demonstraram a existência de mitigação na tão característica hiperfosforilação da proteína tau (5), o que desencadeia uma fraca afinidade desta com os microtúbulos neuronais (10) e a consequente morte celular. Segundo um estudo *in vitro*, a activação da glucogénio sintase quinase – 3 (GSK3), pertencente à via de activação da sinalização intracelular de insulina PI3K (Fig.2), é a principal responsável por esta fosforilação excessiva (10). Na ausência de insulina, esta enzima parece focar a sua ação sobretudo na fosforilação da proteína tau, o que é evidenciado pelo facto da presença de insulina inibir a ação degenerativa derivada desta reação (10). Portanto, pode-se afirmar que a ativação da via PI3K parece diminuir a utilização da GSK3 na fosforilação da proteína tau, o que consequentemente atenua o desenvolvimento da degeneração cognitiva característica dos indivíduos com DA (10).

### Capítulo III - Administração Intranasal de Insulina na Doença de Alzheimer

Tendo em conta os fundamentos supracitados, não é de admirar que a insulina tenha adquirido um foco tão marcado por parte da comunidade científica e de que tenha sido introduzida em diversos ensaios clínicos sobre a DA.

Contudo, a administração desta molécula apresentou algumas dificuldades iniciais. Como estamos na presença de uma proteína, a administração oral não é uma alternativa viável, pelo que os primeiros estudos que analisaram o papel da insulina na performance cognitiva e na DA recorreram à administração intravenosa (2,4). Diversos foram os estudos que assinalaram resultados promissores na utilização da insulina por esta via. No entanto, todos eles se aperceberam de desvantagens relacionadas com esta via de administração (1,4,5). Para além da provável exacerbação e/ou indução de resistência periférica à insulina quando usada por períodos extensos (6), o principal problema residia na fácil geração de hipoglicémia (2,4,19). Os efeitos benéficos da insulina na DA eram assim rapidamente ultrapassados pelas repercussões negativas da hipoglicémia na função cognitiva. Para prevenir esta situação, o tratamento carecia de uma infusão adicional de glucose (2,6,19). Tornava-se assim necessário encontrar uma opção que apresentasse uma maior segurança e eficácia, emergindo então a administração intranasal.

#### Vantagens da administração Intranasal de Insulina na Doença de Alzheimer

A eficácia desta via de administração deve o seu reconhecimento ao rápido e fácil acesso concedido à insulina (1,2,5,20). Ao ser administrada na mucosa nasal, a molécula é transportada extracelularmente através dos axónios correspondentes às células recetoras do nervo olfatório (2,20), o qual está em direto contacto com o ambiente e com o SNC (1,20). Simultaneamente, o envolvimento do nervo trigémeo também foi associado ao transporte desta molécula pela via intranasal (1,2,20).

O caminho percorrido pela insulina até ao cérebro após administração intranasal evita a passagem pela BHE, o que incrementa a concentração de insulina no LCR no período de 10 minutos após a aplicação (21). Como é possível evidenciar na Figura 3, um segundo aumento dos níveis cerebrais de insulina é observado após 30 a 40 minutos da administração, o qual parece ser o verdadeiro responsável pelas consequências biológicas conquistadas (2,21).

É também importante realçar que a eficácia desta via de administração parece estar diretamente interligada com o próprio envolvimento do bulbo olfativo na formação de memória (2,22). Estando esta fortemente relacionada com o hipocampo, o acesso direto a estas áreas pode tornar a insulina intranasal numa candidata muito mais robusta no tratamento da DA do que primeiramente se pensava. Porém, não se podem descartar as evidências fornecidas por alguns estudos onde se demonstrou que esta região é uma das primeiras a ser afectada pela degeneração neurológica (22), o que se pode tornar num fator impeditivo na utilização desta via de administração.

No que diz respeito à segurança deste modo de administração, ainda que sejam necessários estudos mais aprofundados, já existem evidências promissoras da sua fiabilidade para uso humano (2,5,12,23,24)

Um ensaio clínico decorrido no ano de 2003 evidenciou a ausência de reações adversas após a administração de 60 UI/dia por via intranasal, durante 3 semanas a doentes diabéticos (11).

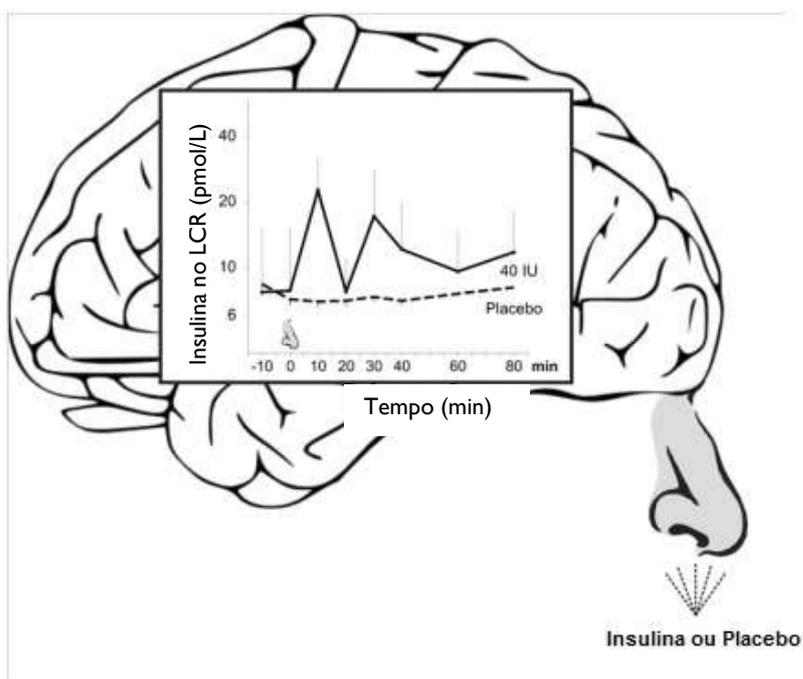


Figura 3 – Gráfico representativo dos níveis de insulina no LCR em função do tempo. A administração de 40 UI de insulina intranasal originou uma consequente elevação das concentrações da mesma no LCR (linha contínua), em humanos, comparativamente ao placebo (a tracejado). (Adaptado de 5).

Pesquisas posteriores demonstraram ainda que a capacidade de irritação ou destruição da mucosa nasal é reduzida ou até mesmo nula (2,23), assim como a aplicação desta forma farmacêutica a médio-prazo se mostra clinicamente segura ao nível periférico, uma vez que não desencadeia hipoglicémia ou resistência à insulina (5). De facto, a maior vantagem da administração intranasal está relacionada com a seletividade do processo de entrada. A insulina, acede ao SNC diretamente pela mucosa nasal, prevenindo a elevação dos valores de insulinémia e glicémia a nível periférico (2). Ademais, a elevação da insulina periférica pode, comprovadamente, levar a um aumento da pressão arterial (25) e da atividade do sistema hipotálamo-hipófise (26), o que não se verifica com a utilização intranasal da mesma (5,12,24).

### Evidências da Eficácia da Insulina Intranasal na Doença de Alzheimer

O primeiro ensaio clínico que envolveu a administração de insulina intranasal a doentes com DA foi publicado há apenas 2 anos e teve como principal objetivo a análise do potencial desta terapia na disfunção cognitiva leve e na DA (6). Este estudo randomizado e duplamente cego, foi realizado em 64 indivíduos com disfunção cognitiva moderada e 40 doentes com DA claramente diagnosticadas, os quais foram distribuídos aleatoriamente por três grupos (2,6). Durante um período de quatro meses, enquanto um dos grupos recebeu o placebo, os restantes tomavam insulina em duas doses distintas: 20 UI/dia ou 40 UI/dia (2,6). Através da observação contínua destes doentes, foi possível constatar uma melhoria na função cognitiva e formação de memória e no desempenhar de algumas tarefas quotidianas, como a manutenção da própria higiene pessoal e capacidade de se vestirem e alimentarem sozinhos. (2,6,7). Estudos de tomografia por emissão de positrões (PET) evidenciaram uma clara diferença na capacidade de captação de glucose pelos doentes administrados com insulina em determinadas áreas do cérebro, nomeadamente na área parietotemporal e frontal, quando comparado com o grupo controlo (2,6). Estes resultados encontram-se ilustrados na Figura 4.

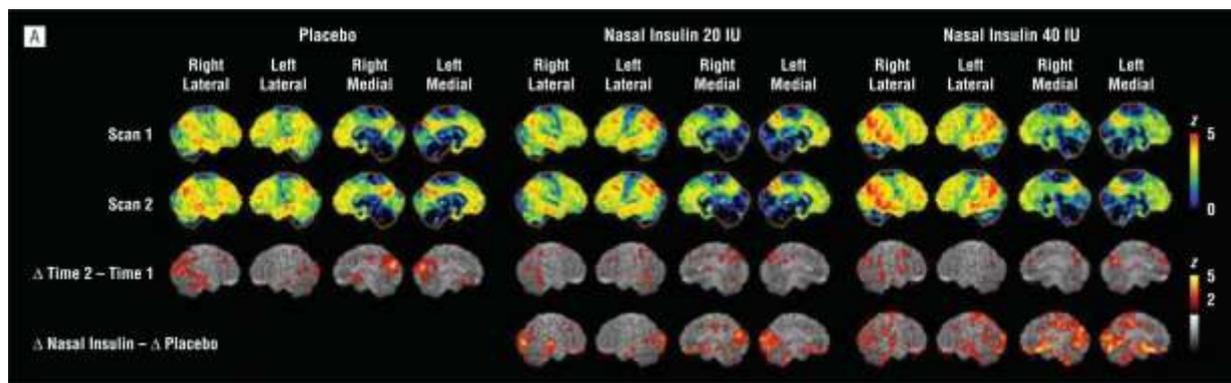


Fig. 4 – Áreas de hipometabolismo no início (SCAN 1) e no fim do tratamento (SCAN 2), com comparação entre as mudanças visualizadas entre os dois períodos ( $\Delta$  Time 2 – Time 1), bem como entre os grupos que receberam insulina (20 ou 40UI/dia) e o grupo controlo ( $\Delta$ Insulina Nasal – Placebo), Sendo que o vermelho e o laranja representam as zonas com maior hipometabolismo, é possível observar que a presença de insulina preservou ou até mesmo aumentou ligeiramente a atividade energética, comparativamente à administração de placebo. (Adaptado de 6).

Porém, a melhoria observada na formação da memória a médio-prazo revelou-se relevante apenas para o grupo ao qual se administrou 20 UI/dia, quando comparado com aqueles que tomavam 40 UI/dia (6). Esta diferença é justificada com base em estudos prévios sobre o efeito da administração aguda de insulina no aperfeiçoamento da memória, dos quais se obteve uma curva dose-resposta em forma de U invertido (6,27). Esta forma demonstra a existência de um intervalo ótimo de dose para o qual há um notório aperfeiçoamento da memória; porém doses demasiado baixas ou demasiado altas revelam efeitos reduzidos ou até mesmo nulos (6), pelo que é possível que neste caso a dose de 40 UI/dia se tenha tratado de uma dose excessiva para a eficaz modulação da memória. Mesmo assim, ambos os grupos administrados com insulina demonstraram um visível benefício na restante funcionalidade cognitiva, bem como na realização de algumas atividades quotidianas (6), o que simboliza uma possível melhoria na qualidade de vida destes pacientes. Quer o aumento dos níveis do peptídeo  $\beta$ -amilóide quer a diminuição da proteína tau no LCR, corroboram estas conclusões (6).

Embora este estudo seja considerado de curta duração (4 meses) e possua uma amostra reduzida (total de 104 doentes), as observações supracitadas foram consideradas moderadamente relevantes, tendo-se também observado a melhoria da formação da memória episódica mesmo dois meses após a finalização do tratamento neste ensaio (2).

Estudos posteriores vieram corroborar estas declarações. De entre as várias pesquisas efetuadas, destacam-se aquelas que divulgaram uma possível incompatibilidade entre a presença do alelo APOEε4 e a ação da insulina intranasal (2,4,5,11). Como já foi previamente referido, a presença deste alelo é um fator de risco para o desenvolvimento da DA, o que fundamenta a presente analogia. O primeiro ensaio para avaliação do efeito da insulina intranasal na função cognitiva não se focou nesta particularidade (2,6). Porém, a generalidade das investigações posteriores levaram ao reconhecimento deste alelo como um provável inibidor da eficácia da insulina (2,4) uma vez que os indivíduos com DA e APOEε4 positivos não mostraram melhorias significativas na função cognitiva ou da memória, quando equiparados com doentes APOEε4 negativos ou indivíduos saudáveis (2,4,6). Todavia, alguns destes estudos não evidenciaram qualquer impedimento no uso de insulina em doentes portadores deste alelo, indefinindo assim qual é de facto o papel deste fator de risco na terapia à base de insulina na DA (4,5).

Esta inconsistência nos resultados tem sido explicada por diversas teorias. A principal hipótese reside na diferença existente entre as curvas dose-resposta dos diferentes génotipos de APOE (5,6,27,28). Pesquisas feitas nesta área revelaram um maior efeito na captação cerebral de glucose mediada por insulina e na melhoria da memória, em doentes com DA sem o alelo APOEε4, comparativamente aos doentes portadores do mesmo (5,28). Esta evidência proporcionou afirmar que a insulina poderá ser um atributo fisiopatológico exclusivo dos doentes com DA e APOEε4 negativos (5,28), o que torna obsoleta qualquer dose de insulina administrada a doentes APOEε4 positivos. Aquela discrepância na eficácia da insulina intranasal também pode ser resultado de um diferente transporte de insulina pela BHE após a inalação (5), mas mais estudos são necessários para determinar a verdadeira natureza da genética subjacente a esta terapia.

Assim, devido à evidente importância do alelo APOEε4 aqui demonstrada, é possível afirmar que a avaliação da sua existência se poderá tornar um indicador da eficácia da insulina utilizada no tratamento da DA.

### Conclusão

As atuais evidências disponíveis no que diz respeito ao uso da insulina intranasal como alternativa terapêutica na DA providenciam uma base promissora para o desenvolvimento da mesma. Porém, as limitações detetadas ainda são numerosas. Para além das incongruências supracitadas, como a heterogeneidade na eficácia fornecida pela presença do alelo APOEε4 em alguns doentes com DA, existem ainda outras investigações que necessitam de mais estudos.

Um dos principais motivos que estimula uma necessidade acrescida de investigação está na reduzida duração dos ensaios clínicos desenvolvidos até ao momento. Todos eles apresentam intervalos de estudo relativamente curtos, o que condiciona as conclusões geradas pelos mesmos, uma vez que se está perante uma doença de carácter crónico. Os efeitos a longo-prazo da insulina intranasal não são ainda conhecidos, o que exige uma nova abordagem metodológica para que se possa indagar mais firmemente, sobretudo sobre a sua segurança. Uma das questões levantadas encontra-se relacionada com a indução e/ou agravamento da resistência à insulina no cérebro com a utilização a longo-prazo. *Será que é uma possibilidade?*

Outra razão que origina discussão na sociedade científica é o atual desconhecimento do verdadeiro mecanismo molecular subjacente à ação cerebral da insulina. Apesar de já existirem algumas respostas para este tema, a realidade encontra-se longe de ser a ideal. A aquisição de uma melhor compreensão sobre o mesmo poderá ser a chave que nos falta para perceber qual é a verdadeira potencialidade da insulina como neuroprotetora e como moduladora da memória. Adicionalmente, permanece a questão de como é que a insulinoresistência realmente se relaciona com a DA: *Será causa ou consequência?*

Um pormenor indutor de mais perguntas e dúvidas compreende a região olfativa do cérebro. Sendo que a insulina intranasal se demonstrou tão eficaz e segura até agora, *não será preocupante o facto da área olfativa ser uma das primeiras a ser afetada pela destruição celular?* Estudos comprovam que a capacidade olfativa, sempre interligada com as memórias dependentes do hipocampo, é uma das principais zonas afetadas nas fases iniciais da DA, tendo-se até sugerido a avaliação da capacidade olfativa como instrumento auxiliar no diagnóstico precoce da doença.

Portanto, é evidente o número de preocupações que circulam à volta deste tema. Diversos são os obstáculos encontrados pelo caminho e os quais se pretende resolver o mais depressa possível, requerendo-se mais estudos, quer ao nível molecular que ao nível clínico.

Felizmente, as vantagens da administração intranasal de insulina na terapêutica da DA parecem sobrepor-se aos possíveis inconvenientes. São inúmeros os estudos que revelam o potencial da insulina em atenuar a disfunção cognitiva, bem como em combater a insulinoresistência desenvolvida em doentes com DA. Esta descoberta pode originar a criação de uma nova alternativa terapêutica, a qual abrange não só o tratamento assintomático da patologia, como também consegue enfraquecer um dos grandes fatores de risco da mesma, como é o caso da insulinoresistência. Ou seja, ainda de que se trate de apenas mais uma opção para o tratamento sintomático e não para a cura da doença, a insulina intranasal consegue adquirir um maior valor terapêutico devido à sua multidisciplinaridade.

A administração de insulina por via intranasal também conquista cada vez mais raízes na procura por uma melhor alternativa no tratamento da DA uma vez que apresenta uma segurança e eficácia comprovadas. Embora sejam precisos mais estudos nesta área, como anteriormente mencionado, esta continua a destacar-se positivamente como tratamento a curto-prazo.

Para além disso, a combinação terapêutica de sensibilizadores da insulina com o uso de insulina intranasal pode consistir numa nova abordagem a ser investigada. A segurança a longo-prazo desta combinação poderá vir a revelar-se como um benefício extra para o abrandamento da deterioração cognitiva em indivíduos com DA.

É com base em todas estas conceções que a insulina intranasal se destaca como um potencial medicamento suficientemente viável para se tornar numa estratégia terapêutica essencial ao tratamento da DA.

## Referências Bibliográficas

- (1) SOOD, S. et al. - **Intranasal therapeutic strategies for management of Alzheimer's disease.** J Drug Target. Vol. 22, No. 4 (2014), 279-294.
- (2) FREIHERR, J. et al. – **Intranasal Insulin as a Treatment for Alzheimer's disease: A Review of Basic Research and Clinical Evidence.** CNS Drugs. Vol. 27 (2013) 505-514.
- (3) Alzheimer's Association. **Treatments for Alzheimer's disease.** [Consultado a 21 de Junho de 2014]. Disponível em: <http://www.alz.org>
- (4) MORRIS, J. K.; BURNS, J. M. **Insulin: An Emerging Treatment for Alzheimer's disease dementia?** Curr Neurol Neurosci Rep. Vol. 12, No. 5 (2012) 520-527.
- (5) SCHIOTH, H. B. et al. **Brain Insulin Signaling and Alzheimer's disease: Current Evidence and Future Directions.** Mol Neurobiol, Vol. 46 (2012) 4-10.
- (6) CRAFT, S. et al. **Intranasal Insulin Therapy for Alzheimer Disease and Amnestic Mild Cognitive Impairment.** Arch Neurol. Vol. 69, No1 (2012) 29-38.
- (7) FORLENZA, O. V. **Tratamento Farmacológico da Doença de Alzheimer.** Revista de Psiquiatria Clínica. Vol.32, No.3. [Consultado a 21 de Junho de 2014]. Disponível em: <http://www.hcnet.usp.br/ipq/revista/vol32/n3/l37.html>
- (8) SERENIKI, A.; VITAL, M.A.; **A Doença de Alzheimer: Aspectos Fisiopatológicos e Farmacológicos.** Rev Psiquiatr RS. Vol. 30 (2008) [Consultado a 28 de Junho de 2014]. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rprs/v30n1s0/v30n1a02s0.pdf>
- (9) ZHAO, WQ.; TOWNSEND, M. **Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease.** Biochim Bio-phys Acta. Vol. 1792, No. 5 (2009) 482-496.
- (10) HONG, L.; **Insulin and insulin-like growth factor-I regulate tau phosphorylation in cultured human neurons.** J Biol Chem. Vol. 272, No. 31 (1997) 19547-19553.
- (11) MESSIER, C.; TEUTENBERG, K. **The Role of Insulin, Insulin Growth Factor, and Insulin-Degrading Enzyme in Brain Aging and Alzheimer's disease.** Neural Plasticity. Vol. 12, No. 4 (2005) 311-328.
- (12) BENEDICT, C. et al. **Intranasal Insulin improves memory in humans.** Psychoneuroendocrinology. Vol. 29, No. 10 (2004) 1326-1334.

- (13) BANKS, W.A.; **The source of cerebral insulin.** Eur J Pharmacol. Vol. 1490 (2004) 5-12.
- (14) AWAD, N.; GAGNON, M.; MESSIER, C.; **The relationship between impaired glucose tolerance, type 2 diabetes, and cognitive function.** J Clin Exp Neuropsychol. Vol.26 (2004) 1044-1080.
- (15) MESSIER, C. **Diabetes, Alzheimer's disease and apolipoprotein genotype.** Exp Gerontol. Vol. 38 (2003) 941-946.
- (16) ARAKI, Y. et al. **MRI of the brain in diabetes mellitus.** Neuroradiology. Vol. 36 (1994) 101-103.
- (17) PORTUGAL. Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.. **Circular informativa nº 138/CD: Pioglitazona – Conclusão da Revisão da Relação Benefício-Risco.** Lisboa: INFARMED, 2011.
- (18) DE FELICE, F.G., et al. **Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of Aβ oligomers.** Proc Natl Acad Sci U S A. Vol. 106, No. 6 (2009) 1971-1977,
- (19) BLOOMGARDEN, Z.T.; **Measures of insulin sensitivity.** Clin Lab Med. Vol. 26 (2006) 611-633.
- (20) THOME, R.G.; PADMANBHAN, V.; FREY, W.H.; **Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration.** Neuroscience. Vol. 127, No. 2 (2004) 481-496.
- (21) BORN, J. et al. **Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain.** Nat Neurosci. Vol. 5, No. 6 (2002) 514-516.
- (22) SEUBERT, J.; FREIHERR, J. et al. **Statistical localization of human olfactory cortex.** Neuroimage. Vol. 66 (2012) 333-342.
- (23) MARKS, D.R.; et al. **Awake intranasal insulin delivery modifies protein complexes and alters memory, anxiety and olfactory behaviors.** J Neurosci. Vol. 29, No. 20 (2009) 6734-6751.
- (24) BENEDICT, C. et al. **Immediate but not long-term intranasal administration of insulin raises blood pressure in human beings.** Metabolism. Vol. 54, No. 10 (2005) 1356-1361.

- (25) KERN, W.; PETERS, A.; et al. **Changes in blood pressure and plasma catecholamine levels during prolonged hyperinsulinemia.** Metabolism. Vol. 54, No. 3 (2005) 391-396.
- (26) FRUEHWALD-SHULTES, B. et al. **Hyperinsulinemia causes activation of the hypothalamus-pituitaryadrenal axis in humans.** Int J Obes Relat Metab Disord. Vol. 25 (2001) 38-40.
- (27) REGER, M.A. et al. **Intranasal Insulin administration dose-dependently modulates verbal memory and plasma amyloide-beta in memory-impaired older adults.** J Alzheimers Dis. Vol. 13, No. 3. (2008) 323-331.
- (28) CRAFT, S. et al. **Insulin metabolism in Alzheimer's disease differs according to apolipoproteína E genotype and gender.** Neuroendocrinology. Vol. 70, No, 2 (1999) 146-152.