TAMIRES ALVES SARNO

**Efeito de inibidor da acetilcolinesterase no metabolismo da proteína
precursora do amiloide em plaquetas**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências**

Programa de Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. Orestes Vicente Forlenza

São Paulo

2016

TAMIRES ALVES SARNO

**Efeito de inibidor da acetilcolinesterase no metabolismo da proteína
precursora do amiloide em plaquetas**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências**

Programa de Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. Orestes Vicente Forlenza

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sarno, Tamires Alves

Efeito de inibidor da acetilcolinesterase no metabolismo da proteína precursora do amiloide em plaquetas / Tamires Alves Sarno. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Psiquiatria.

Orientador: Orestes Vicente Forlenza.

Descritores: 1.Doença de Alzheimer 2.Secretases da proteína precursora do amiloide 3.Plaquetas 4.Inibidores da colinesterase 5.Donepezila

USP/FM/DBD-249/16

Dedico este trabalho a minha bisavó Enedina Corrêa Custódio e avó Ivanete Corrêa Custódio; fontes de minha inspiração. Aos meus queridos e amados pais, Solange e Wagner e ao meu esposo, Michell Sarno por todo amor, apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por guiar meus passos e permitir-me trabalhar e estudar com o que mais tenho prazer e satisfação. Por me acolher e sustentar nos momentos difíceis e de incertezas e por proporcionar energia e discernimento para continuar.

Ao meu orientador, professor Dr. Orestes Vicente Forlenza pelos ensinamentos, discussões e oportunidade. Por suas excelentes e relevantes considerações que permitiram minha evolução acadêmica.

Ao professor Wagner Farid Gattaz por gentilmente responder ao meu e-mail em 2012 e permitir fazer parte do grupo de pesquisa LIM-27. Agradeço também pela oportunidade de desenvolver meu projeto de pesquisa em um laboratório de excelência e de alta infraestrutura.

Agradeço ao Dr. Sérgio Hototian, responsável pelas avaliações e acompanhamento dos participantes do estudo, por todo seu engajamento.

Meu muito obrigada à Dra. Leda Leme Talib; minha Chóia, pela oportunidade, pelos ensinamentos, paciência e pelo apoio. Pela preocupação constante e por permitir trabalhar ao seu lado e ter a chance de aprender sempre. Só tenho agradecimentos por tudo que fez por mim.

Meus sinceros agradecimento e reconhecimento à Helena Joaquim, uma pessoa muito especial para mim dentro e fora do laboratório. Que sempre se propôs a me ajudar, sempre se propôs a me ensinar, sempre se propôs a me escutar. Todas as vezes com sorriso no rosto e com muita boa vontade, inclusive nas vezes que eu perguntava as mesmas coisas. Também não esquecerei do crescimento profissional e pessoal que me proporcionaste.

Obrigada meninas lindas e risos dos meus dias: Alana, Bruna, Eliane e Jessyka. Agradeço pelos momentos de felicidade, aprendizado e apoio. Todo meu trabalho e esforço são pequenos perto da imensa satisfação e diversão que é estar ao lado de vocês.

Agradeço às funcionárias do LIM-27: Sandra, Luciana, Mislene e dona Edivani por todo carinho e convivência.

Obrigada Eliza e Isabel, secretárias da pós-graduação e Zelinda Gárcia, pela atenção e auxílio burocrático.

Obrigada meus queridos pais, Solange e Wagner, meu padastro Maurício e irmão Maurício Junior, por todo o amor, apoio moral e financeiro, por todas as bênçãos e orações. Agradeço pela compreensão constante de minhas ausências e por sempre estarem em todos os momentos ao meu lado. Amo vocês.

Agradeço ao meu esposo Michell Sarno, companheiro eterno e leal de todas as horas, aquele que caminha ao meu lado há 11 anos. Eu só tenho a agradecer por tudo que já fez por mim, por todo apoio, incentivo, compreensão, solidariedade, pelo amor e carinho. Obrigada por todos os conselhos e por abrir meus olhos nos momentos difíceis. Espero um dia poder retribuir todo seu esforço, inclusive o financeiro. E que Deus nos permita muitas vitórias na vida. Eu te amo.

Obrigada a todos os meus familiares pelo apoio, incentivo e compreensão por todas as reuniões da família que não pude participar. Fico muito feliz pela maravilhosa torcida que tenho e por tê-los em minha vida.

Agradeço as minhas grandes amigas Fernanda, Mariana, Natália, Shirley e Tissiane por todo carinho, dedicação e pelos anos de amizade. Obrigada por sempre compreenderem quando dizia que estava ocupada e cheia de compromissos. FATINTAS sempre.

Obrigada professor Edgar Bach Hi, meu orientador na faculdade, por mostrar o caminho que eu deveria seguir, pelos ensinamentos que levo comigo até hoje e por ter sido um grande professor-orientador-amigo nessa minha trajetória acadêmica. Agradeço a todos os mestres e coordenadora Carolina Piva da Unilus.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de mestrado e reserva técnica, fundamentais para a execução deste trabalho e meu aprimoramento científico.

APOIO FINANCEIRO

Esta dissertação foi desenvolvida com o auxílio financeiro da Associação Beneficente Alzira Denise Hertzog da Silva (ABADHS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (MS, bolsa de mestrado).

"Todo caminho possui seus obstáculos e desafios. O importante é não se esquecer de fazer escolhas baseadas no amor que sentimos, não no medo. E lembremos-nos sempre de que o caminho vai sendo construído conforme caminhamos." - *Na Terra dos Budas*

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals in indexed Medicus*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da doença de Alzheimer	19
1.1.1 Fisiopatologia da DA	25
1.2 Proteína Precursora do Amiloide	29
1.2.1 Metabolismo da APP	32
1.3 ADAM	34
1.4 BACE1	36
1.5 Presenilina 1	39
1.6 Sistema colinérgico na doença de Alzheimer	42
1.6.1 Tratamento da DA e mecanismo de ação do Donepezil	43
1.7 Plaquetas como modelo periférico de neurônios	49

2 OBJETIVOS	55
--------------------------	-----------

3 MÉTODOS	56
------------------------	-----------

3.1 Casuística	56
3.2 Avaliação diagnóstica	59
3.3 Determinação da expressão da APP e secretases.....	61
3.3.1 Obtenção e preparo de plaquetas.....	61
3.3.2 Western blotting e immunoblotting.....	62
3.4 Método para atividade enzimática de ADAM10 e BACE1	66
3.4.1 Obtenção e preparo de plaquetas.....	66
3.4.2 Extração da ADAM10 e BACE1 na amostra	67

3.4.2.1 Atividade de ADAM10	69
3.4.2.2 Atividade de BACE1	70
3.5 Análise estatística	71
4 RESULTADOS	73
4.1 Expressão proteica da APP e secretases	74
4.2 Atividade enzimática de ADAM10 e BACE1	78
4.3 Correlação entre expressão e atividade enzimática das secretases	80
5 DISCUSSÃO.....	81
6 CONCLUSÃO.....	89
7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	90
8 ANEXOS.....	91
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
Apêndices	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de habitantes no mundo.....	20
Figura 2 - Fatores de risco para o desenvolvimento da DA	21
Figura 3 - Estimativa do número de pessoas com demência no mundo	22
Figura 4 - Características fisiopatológicas da Doença de Alzheimer	26
Figura 5 - Peptídeo beta amiloide no interior da placa senil	27
Figura 6 - Formação dos emaranhados neurofibrilares	28
Figura 7 - Processamento proteolítico da APP	33
Figura 8 - Inibição da enzima acetilcolinesterase.....	45
Figura 9 - Fluxograma do recrutamento e evolução clínica	59
Figura 10 - Metodologia de Western Blotting e Immunoblotting.....	65
Figura 11 - Método fluorimétrico	69
Figura 12 - Expressão rAPP.....	74
Figura 13 - Expressão de sAPP-110kDa	75
Figura 14 - Expressão de sAPP-130kDa	75
Figura 15 - Expressão de ADAM10.....	76
Figura 16 - Expressão de BACE1	77
Figura 17 - Expressão de PSEN1	78
Figura 18 - Atividade de ADAM10.....	79
Figura 19 - Atividade de BACE1	79
Figura 20 - Correlação entre expressão e atividade	80
Figura 21 - Padronização do Western Blotting das isoformas de APP	91

Figura 22 - Padronização do Western Blotting de ADAM10	91
Figura 23 - Padronização do Western Blotting de BACE1	92
Figura 24 - Padronização do Western Blotting de PSEN1	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos dos pacientes e controles analisados	61
Tabela 2 - Bloqueio, diluição e tempo de incubação dos anticorpos da proteína APP e secretases	93
Tabela 3 - Resultados individuais da expressão da rAPP e dos fragmentos secretados de 130 e 110kDa das amostras de pacientes	94
Tabela 4 - Resultados individuais da expressão de ADAM10, BACE1 e PSEN1 das amostras de pacientes	96
Tabela 5 - Resultados individuais da atividade enzimática de ADAM10 e BACE1 das amostras de pacientes	98
Tabela 6 - Resultados individuais da expressão da rAPP e dos fragmentos secretados de 130 e 110kDa das amostras do grupo controle	99
Tabela 7 - Resultados individuais da expressão de ADAM10, BACE1 e PSEN1 e da atividade enzimática de ADAM10 e BACE1 das amostras do grupo controle	101

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ADAM	A Desintegrin And Metalloproteinase
ADAM10	A Disintegrin and metalloproteinase domain containing protein 10
APOE	Apolipoproteína E
APP	Amyloid Precursor Protein (Proteína Precursora do Amiloide)
A β	Peptídeo Beta Amiloide
BACE1	Beta-secretase 1 ou Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1
CAMCOG	Teste Cognitivo De Cambridge
CCL	Comprometimento Cognitivo Leve
CDR	Clinical Dementia Rating
CV	Coeficiente de Variação
DA	Doença de Alzheimer
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
ENFs	Emaranhados Neurofibrilares
GSK3B	Glicogênio Sintase Quinase 3 Beta
IChEs	Inibidores da Colinesterase
kDa	Kilodalton
MAPs	Proteínas associadas aos microtúbulos
MEEM	Mini Exame do Estado Mental
NMDA	N-metil-D-aspartato
PSEN1	Presenilina 1
rAPP	Razão de APP
sAPP α	Fragmento solúvel de APP de 130kDa
sAPP β	Fragmento solúvel de APP de 110kDa
SDS-Page	Dodecil-Sulfato de Sódio de poliacrilamida
SNC	Sistema Nervoso Central

LISTA DE SIGLAS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

RESUMO

Sarno TA. *Efeito de inibidor da acetilcolinesterase no metabolismo da proteína precursora do amiloide em plaquetas* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2016.

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa e a principal causa de demência em idosos. Os mecanismos fisiopatológicos mais envolvidos na DA são: o acúmulo do peptídeo beta amiloide ($A\beta$) em agregados extracelulares, e a formação dos emaranhados neurofibrilares (ENF). A Proteína Precursora do Amiloide (APP) é clivada pelas secretases α (ADAM10), β (BACE1) e γ (Presenilina 1 [PSEN1]). As plaquetas contêm 95% da APP circulante e possuem toda a maquinaria necessária para estudar periféricamente a APP e suas secretases. A pesquisa de biomarcadores na DA tem como objetivo identificar, em vida, os indicadores do processo patogênico em fluídos corporais e/ou por métodos de imagem cerebral. O objetivo do presente estudo foi investigar proteínas envolvidas no metabolismo da APP em plaquetas de pacientes com DA e o potencial de modificação destas vias pela ação do tratamento com cloridrato de donepezila. Para tanto foram analisadas amostras de 23 pacientes com DA leve ou moderada, avaliados antes e depois de 6 meses de tratamento e 38 indivíduos idosos cognitivamente saudáveis (controles). As variáveis de desfecho estudadas foram: (1) expressão protéica de ADAM10, BACE1 e PSEN1; (2) expressão protéica dos metabólitos secretados da APP de 110 e

130kDa, possibilitando o cálculo da razão de APP (rAPP); e (3) atividade enzimática das APP-secretases ADAM10 e BACE1. Foram utilizados os métodos de *western blotting* e o fluorimétrico. Encontramos, nos pacientes com DA pré-tratamento, uma diminuição da rAPP em relação aos controles; porém, não identificamos diferenças após seis meses de tratamento. Os níveis de ADAM10 mostraram-se menores em pacientes com DA na avaliação basal quando comparados aos controles, mas também sem modificação com o tratamento, o tratamento mostrou-se associado a uma redução da expressão de BACE1 em pacientes com DA, embora não tenhamos encontrado diferenças entre pacientes e controles na avaliação basal. A expressão de PSEN1 mostrou-se menor nos pacientes com DA pré-tratamento quando comparada aos controles, sem contudo haver alteração em resposta ao tratamento. Quanto à atividade enzimática de ADAM10 e BACE1, não observamos diferenças nos valores pré e pós-tratamento. Nossos achados reforçam a utilidade da utilização de plaquetas como matriz biológica para o estudo do metabolismo da APP em tecidos periféricos e para a investigação de efeitos modificadores da patogenia da DA a partir do tratamento com drogas antidiemência.

Descritores: 1.Doença de Alzheimer 2.Secretases da proteína precursora do Amiloide 3.Plaquetas 4.Inibidores da colinesterase 5.Donepezila.

ABSTRACT

Sarno TA. *Effect of Acetylcholinesterase inhibitors on amyloid precursor protein metabolism in platelets* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo"; 2016.

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease and the major cause of dementia in the elderly. The main mechanisms in AD are: extracellular aggregates of beta amyloid peptide (A β) and neurofibrillary tangles formation (NFT). Amyloid Precursor Protein (APP) is cleaved by the secretases α (ADAM10), β (BACE1) and γ (Presenilin 1 [PSEN1]). Platelets containing 95% of the circulating APP and possess all the machinery necessary to study peripherally APP and its secretases. The search for biomarkers in AD aims to identify, in life, the pathogenic process indicators in body fluids and/or brain image methods. The aim of this study was to investigate proteins involved in APP metabolism in platelets of AD patients, and the potential modification of these pathways by treatment with Donepezil hydrochloride. Therefore, 23 patients with mild to moderate AD evaluated before and after 6 months treatment and 38 healthy elderly subjects (controls) were analyzed. Outcome variables were: (1) ADAM10, BACE1 and PSEN1 expression; (2) APP secreted metabolites expression (110 and 130kDa), allowing the APP ratio (rAPP) estimate; (3) APP-secretase ADAM10 and BACE1 enzymatic activity. Western blotting and fluorimetric methods were used. We found in AD patients pre-treatment, a decrease of

rAPP compared to controls; however, we did not identify differences of this parameter after six months of treatment. The ADAM10 levels were lower in AD patients at baseline when compared to controls, however no differences were observed after treatment. Treatment was associated with a reduction of BACE1 expression in AD patients, although we have not found differences between patients and controls at baseline. PSEN1 expression was lower in pre-treatment AD patients compared to controls. No differences were observed after treatment. Concerning to BACE1 and ADAM10 enzymatic activity, we did not observe differences in pre and post-treatment. Our findings strengthen the use of platelets as a biological matrix for the APP metabolism as well as the modifying effects on AD pathogenicity of antidementia drugs.

Descriptors: 1.Alzheimer disease 2.Amyloid precursor protein secretases 3.Platelets 4.Cholinesterase inhibitors 5.Donepezil.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da doença de Alzheimer

A população mundial apresenta significativo aumento na expectativa de vida, a consequência disso é o número de habitantes no mundo que aumenta quase que exponencialmente (Figura 1) (Department of Economic and Social Affairs [UN], 2015). No Brasil, o número de pessoas idosas já extrapola o de nascimentos (IBGE, 2015). Concomitante ao envelhecimento da população há um significativo aumento da prevalência de doenças relacionadas à senescência como as coronariopatias, as neoplasias, a osteoporose e as doenças neurodegenerativas como as demências (Aprahamian et al., 2009).

Fonte: adaptado de *Department of Economic and Social Affairs (UN)*, 2015.

Figura 1 – Número de habitantes no mundo. Em 2010 o número de habitantes no mundo era de aproximadamente 6,5 bilhões. As projeções estatísticas concluem que este valor poderá chegar perto de 16 bilhões de pessoas no mundo todo no ano de 2100

A demência que mais acomete os idosos é a doença de Alzheimer (DA) e foi descrita há mais de 100 anos por Aloisius Alzheimer. Durante uma necropsia cerebral Alzheimer observou mudanças anatômicas e microscópicas, caracterizadas por atrofia cerebral, agregados extracelulares (placas senis ou amiloides) e emaranhados neurofibrilares (Engelhardt e Gomes, 2015).

A DA é uma doença neurodegenerativa exibindo uma variação substancial na velocidade da progressão da doença e a maneira como os sintomas se manifestam, sugerindo várias etiologias potenciais que envolvem a participação de fatores genéticos e ambientais. No entanto, a incidência dos casos tem forte relação com o processo de envelhecimento

(Figura 2) (Reitz e Mayeux, 2014). Pode apresentar-se nas formas esporádica ou familiar (pré-senil) e os sintomas iniciais são decorrentes do comprometimento da memória recente, seguida pelo acometimento de outras funções cognitivas até o desenvolvimento de afasia, apraxia e agnosia (APA, 2002; Cavallucci et al., 2012).

Fonte: Reitz e Mayeux, 2014.

Figura 2 - Fatores de risco para o desenvolvimento da DA

A DA atinge de 60 a 70% da população idosa, com prevalência que se eleva exponencialmente em estratos populacionais a partir dos 65 anos. Atualmente estima-se haver 44 milhões de idosos com a doença e que até o

ano de 2050 esse valor extrapole 3 vezes o atual (Figura 3) (Catricala et al., 2012; ADI, 2013).

Fonte: adaptado de ADI (Alzheimer's Disease International), 2013.

Figura 3 – Estimativa do número de pessoas com demência no mundo. De acordo com a ADI em 2010 o número de pessoas com demência era de 36 milhões como mostra a linha denominada original. Após 3 anos este número havia aumentado para 44 milhões de acometidos como mostra a linha denominada atualizada. Caso a prevalência de pessoas com demência siga a projeção atualizada, poderá este número chegar a 135 milhões de acometidos em 2050

O diagnóstico de DA provável, possível ou definitiva é caracterizado pela combinação do diagnóstico clínico e patológico quando o paciente se enquadra nos critérios clínicos e apresenta na necrópsia *postmortem* as alterações histológicas da doença (Chaves, 2000). Os critérios diagnósticos mais utilizados vão de acordo com o *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* (NINCDS) em conjunto com *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (ADRDA), DSM versões IV e V e Classificação Internacional de Doenças (McKhann et al, 1984; Araújo e Lotufo Neto, 2013).

Em uma reunião de consenso promovida pelo Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia foram acordados critérios diagnósticos para a DA no Brasil, baseados em achados clínicos e de pesquisa. Segundo Frota e colaboradores (2011)

O diagnóstico de demência exige o comprometimento funcional e cognitivo, atingindo este último pelo dois dos seguintes cinco domínios a seguir: memória, função executiva, linguagem, habilidade visual-espacial e alteração de personalidade. No diagnóstico de DA, dividiu-se a mesma em três fases: demência, comprometimento cognitivo leve e pré-clínica, sendo esta última somente para pesquisa clínica. No quadro de demência, foram aceitas outras formas de início que não a amnésica e incluída a necessidade de exame de neuroimagem. O diagnóstico do comprometimento cognitivo leve é clínico, podendo, em situações de pesquisas, serem utilizados marcadores biológicos buscando maior probabilidade de evolução para DA.

Para auxiliar no diagnóstico diferencial, são realizados exames clínicos, laboratoriais, análise do líquido e exames de imagem cerebral estrutural e funcional, tais como tomografia computadorizada do crânio, ressonância magnética, espectroscopia por ressonância magnética,

tomografia por emissão de pósitrons (PET) e por emissão de fóton único (SPECT). No âmbito da pesquisa, também são realizados estudos genéticos, determinações de biomarcadores no líquido cefalorraquidiano (Mattsson et al., 2011), estudos de marcadores de imagem molecular por meio do PET, com resultados promissores, porém ainda com limitações metodológicas de restringem sua aplicação clínica imediata. (Nitrini et al., 2005; Caramelli et al., 2011).

O tratamento é feito com inibidores da acetilcolinesterase (donepezil, rivastigmina, galantamina) e antagonistas de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (memantina). Ansiolíticos, neurolépticos e antidepressivos são indicados para atenuar os sintomas psíquicos e comportamentais associados à doença (Palmer, 2011).

Após o diagnóstico de demência provável ou possível a expectativa de vida dos acometidos, desde o estágio leve até as fases mais avançadas da doença usualmente varia entre 3 a 13 anos, a depender da idade de acometimento no idoso (Brookmeyer et al., 2002; SCB, 2013 *apud* Wattmo et al., 2015; Kua et al., 2014). É possível ainda prolongar esse período com o uso contínuo e regular de drogas antedemência (Wattmo et al., 2015). Desta forma, o diagnóstico precoce associado à implementação do tratamento em estágios iniciais do processo são importantes para preservar, dentro das possibilidades, a capacidade cognitiva e funcional do paciente, melhorar aspectos comportamentais inerentes à doença e, em última análise, preservar a qualidade de vida do paciente e de seus familiares (Ávila, 2003).

1.1.1 Fisiopatologia da DA

As principais regiões cerebrais afetadas na DA são as áreas neocorticais associativas e as estruturas mesiais do lobo temporal, particularmente a formação hipocampal. A avaliação de tecido cerebral *postmortem* de pacientes com a DA mostra alterações características: o acúmulo do peptídeo beta-amilóide (A β) em agregados extracelulares (placas senis e neuríticas), a formação de emaranhados neurofibrilares (agregados intracelulares de proteína tau em estado hiperfosforilado - ENFs) e a atrofia cortical decorrente da morte neuronal e degeneração sináptica (Figura 4) (Davies e Maloney, 1976; Leblanc e Gambetti, 1994).

Fonte: adaptado de Alzheimer's Association, 2015.

Figura 4 - Características fisiopatológicas da Doença de Alzheimer

As placas senis são agregados extracelulares com acúmulo de peptídeo A β em seu interior (Figura 5). Seu local primário de deposição são os neurônios colinérgicos. O peptídeo A β tem peso molecular de aproximadamente 4kDa com uma cadeia de aminoácidos (aa) que vai de 40-42. Ambos são liberados a partir da clivagem anormal da APP e levam à formação de placas senis, mas o A β 42 se mostra mais nocivo aos tecidos cerebrais (Leblanc e Gambetti, 1994; Selkoe e Schenk, 2003; Colletier et al., 2011).

Fonte: Côrrea, 2013.

Figura 5 - Peptídeo beta amiloide no interior da placa senil

Os emaranhados neurofibrilares (ENFs) intracelulares são formados a partir da hiperfosforilação da proteína Tau, que decorre principalmente da ação da enzima glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK-3B). A Tau é parte de uma família de proteínas expressa em neurônios associada aos microtúbulos (MAPs) que participa da agregação de monômeros de tubulina dando origem aos microtúbulos, estruturas estas que contribuem na estabilidade do citoesqueleto e servem como transporte axonal (Figura 6) (García e Jay, 2004).

Fonte: Sayeg, 2011.

Figura 6 – Formação dos emaranhados neurofibrilares. A hiperfosforilação de Tau pela ação de quinases desestabiliza os monômeros de tubulina, desta forma ocorre à separação destes, a proteína Tau é liberada, agrupa-se e forma os emaranhados neurofibrilares intracelulares

Fatores genéticos também têm sido associados à fisiopatologia da doença. Nas formas esporádicas de início tardio, destaca-se o gene da apolipoproteína E (APOE), cujo homozigose do alelo epsilon4 (ϵ -4) associa-se à doença elevando o risco de desenvolvimento em até doze vezes por acelerar o acúmulo, agregação e depósito do peptídeo A β . Em contraversão, a presença do alelo ϵ -2 parece estar associada a uma redução do risco de desenvolvimento da DA (Mcfarlane et al., 1999; Simon et al., 2012; Xu et al., 2014; Giau et al., 2015).

Algumas formas de acometimento precoce, antes dos 65 anos, são observadas em portadores das mutações nos genes da APP, presenilina 1 (PSEN1) e presenilina 2 (PSEN2). Estimativas de prevalência de DA pré-

senil ou familiar variam de 5 a 10% (Selkoe, 2001; Shea et al., 2016). A ocorrência de mutação nesses genes é responsável por 40% dos casos da DA de início precoce (Tanzi e Bertram, 2001).

1.2 Proteína Precursora do Amiloide

A proteína precursora do amiloide (APP) é uma glicoproteína integral de membrana do tipo I expressa na superfície de diversos tipos celulares como, neurônios, músculos e células sanguíneas. Estruturalmente a APP é composta por uma longa região extracelular e uma curta região intracelular, além de apresentar múltiplos domínios e sítios de ligação (Wasco et al., 1993; Evin e Li, 2012; Nicolas e Hassan, 2014).

A função biológica da APP é incerta até o momento, no entanto, dados genéticos, de imunohistoquímica e *in vitro* indicam que está envolvida na regulação da sobrevivência neuronal, crescimento neurítico, plasticidade sináptica e adesão celular, bem como processos patológicos do SNC, além de estabelecer vias intracelulares (Mattson e Chan, 2003).

Durante a fase de desenvolvimento embrionário de ratos e camundongos a expressão de APP pode ser detectada no estágio inicial da embriogênese, sugerindo um papel fundamental da APP nesta via (Ott e Bullock, 2001; Sarasa et al., 2000). Além disso, após o nascimento essa proteína contribui para formação e manutenção de sinapses (Löffler e Huber,

1992). Mas, apesar dos achados há controvérsia sobre sua função. Um estudo feito com culturas de neurônios de camundongos *knockout* para APP demonstrou um aumento na amplitude sináptica e formação de sinapses (Priller et al., 2006).

Já foram observadas 11 isoformas de APP: APP770, APP305, L-APP677, APP695, L-APP696, APP714, L-APP733, APP751, L-APP752, APP639 e isoforma 11 (Uniprot Consortium, 2015). Entretanto, as principais estudadas são APP695, APP751 e APP770.

A maior parte da APP circulante (95%) está nas plaquetas. Com exceção da isoforma APP695 que é quase indetectável devido sua maior expressão em neurônios. As demais isoformas são observadas em células periféricas, sendo a APP770 bastante expressa nas plaquetas (Bush et al., 1990; Gardella et al., 1990; Padovani et al., 2001).

O gene desta proteína está localizado no cromossomo 21q21.2–3, com aproximadamente 240 kb (Zheng e Koo, 2006; Zhou, et al, 2011). Por meio de *splicing* alternativo 18 éxons determinam o tipo de isoforma da APP, que varia em comprimento de 365-770 aminoácidos (Goldgaber et al., 1987; Sisodia et al., 1993).

Por meio da técnica de SDS-Page é possível observar duas bandas da APP: uma de 130kDa (fragmento solúvel de APP α [sAPP α]) e outra de 110kDa (fragmento solúvel de APP β [sAPP β]), representadas como formas madura e imatura, respectivamente. A maior parte dos estudos neste modelo demonstram que a razão entre esses dois fragmentos (130/110kDa), denominada rAPP, está diminuída em pacientes com DA em relação aos

controles (Weidemann et al., 1989; Maltese et al., 1990; Oltersdorf et al., 1990; Dugan et al., 1995; Rosenberg et al., 1997; Di Luca et al., 1998; De Strooper e Annaert, 2000; Padovani et al., 2001; Tang et al., 2006; Zainaghi, 2006; Zainaghi et al., 2007; Zhao et al., 2011). No entanto, os mecanismos que levam a esta redução na razão da APP em plaquetas na DA não estão bem esclarecidos.

Há uma hipótese postulada por Tang e colaboradores (2006) que mostrou por meio da técnica de *western blotting* uma diminuição da α -secretase, aumento de β -secretase e aumento do A β em plaquetas de pacientes com DA em comparação aos controles. Isso pode significar que se o conteúdo de APP presente nas plaquetas corresponde ao fragmento solúvel de APP gerada pela via não-amiloidogênica (sAPP α) e este conteúdo está diminuído na DA, pode-se sugerir que esta via está reduzida em plaquetas de pacientes devido a uma diminuição na atividade de α -secretase ou aumento na atividade de β -secretase, ou ambos.

Estudos têm demonstrado o efeito neuroprotetor e proliferativo de sAPP α (Caillé et al., 2004; Gakhar-Koppole et al., 2008). De fato, camundongos *knockout* para APP apresentam uma redução no crescimento cerebral e corporal (Zheng et al., 1995). Este caráter proliferativo associado à presença do sAPP α pode ter relação com a produção de células-tronco, desde forma este fragmento solúvel da APP pode ser um co-fator para a estimulação celular (Gakhar-Koppole et al., 2008).

Em 2011, Chasseigneaux e colaboradores mostraram que tanto sAPP α , quanto sAPP β estimularam o crescimento axonal e os produtos

secretados de APP, em especial sAPP β , causou a diferenciação de células-tronco pluripotentes embrionárias humanas em células neuronais (Pimplikar e Ghosal, 2011). Na DA, esse aumento de sAPP α ou diminuição de sAPP β pode aumentar a rAPP (130kDa/110kDa) em pacientes, em resposta ao tratamento com donepezil, como demonstrado por Borroni e colaboradores (2001).

Em conjunto, estes achados reforçam que o metabolismo da APP pode ser modificado pelos IChEs em favorecimento da via não-amiloidogênica, bem como, ser estimulador da proliferação de células neurais e diferenciação de células-tronco.

1.2.1 Metabolismo da APP

A APP é clivada pelas secretases α , β e γ . Na DA, ocorre desvio do processamento proteolítico normal, realizado pela enzima α -secretase (ADAM10), favorecendo a clivagem pela β -secretase (BACE1) (Cummings et al., 1998). A primeira corresponde à via não-amiloidogênica (também conhecida como via secretória), enquanto a segunda, à via amiloidogênica (Figura 7). Normalmente a APP sofre sucessivas clivagens por α -secretase, porém, pode haver competição entre α e β -secretases, ainda desconhecida, que leva a APP ser clivada por BACE1 (Ehehalt et al., 2003).

Fonte: adaptado de Laferla, 2002.

Figura 7 - Processamento proteolítico da APP: A clivagem da APP pela via não-amiloidogênica ou via secretória (à esquerda) é realizada por α-secretase. Enquanto pela via amiloidogênica (à direita) por β-secretase

Na via não-amiloidogênica (à esquerda da figura), a α-secretase cliva a APP dentro do domínio Aβ, resultando em um substrato solúvel. A liberação do substrato ancorado a membrana é feita por γ-secretase na região C-terminal produzindo o fragmento residual p3, não prejudicial ao cérebro e com possíveis propriedades neuroprotetoras. Na via amiloidogênica (à direita da figura), a APP é clivada pela β-secretase deixando o domínio Aβ intacto (Cummings et al., 1998), que é posteriormente liberado do resíduo C-terminal da APP pela ação da γ-secretase.

Alguns estudos sugerem que esse erro no metabolismo da APP pode ser decorrente, por exemplo, do aumento do estresse oxidativo relacionado ao envelhecimento, danos no metabolismo mitocondrial, perda da homeostase iônica celular e mutações (St.George-Hyslop e Westaway, 1999; Mattson, 2004).

É, portanto, importante estudar além da expressão da APP, as principais secretases que agem no metabolismo da APP na DA que são α (ADAM10), β (BACE1) e γ (PSEN1).

1.3 ADAM

ADAMs (*A Desintegrin And Metallopeptidase*) são uma superfamília de proteases dependentes de zinco subdividida conforme a estrutura primária de seus sítios catalíticos (Chang e Werb, 2001; Seals e Courtneidge, 2003). As ADAMs possuem aproximadamente 750 aminoácidos (Primakoff e Myles, 2000) e ficam ancoradas a membrana. Estão envolvidas no crescimento celular, axonal e mielínico, adesão e migração celular, bem como, comunicação célula-célula e sinalização extracelular e intracelular (Vingtdeux e Marambaud, 2012).

O termo ADAM se dá pela presença de dois domínios das metalopeptidases, adamalisinases e matrixinas. Estruturalmente são compostas por um extenso ectodomínio, um domínio transmembrana, um

domínio rico em prolina, um pró-domínio, um domínio de metalopeptidase, um desintegrina, um domínio rico em cisteína, um domínio do tipo EGF (*Epidermal Growth Factor* – Fator de Crescimento Epidérmico) e uma cauda citoplasmática (Seals e Courtneidge, 2003; Lichtenthaler, 2011).

A ADAM10 (*A Disintegrin and Metalloproteinase domain-containing protein 10*) é uma proteína do tipo I que transpassa a membrana plasmática celular e possui atividade endoproteolítica relacionada com diversos processos fisiológicos e patológicos (Vingtdeux e Marambaud, 2012).

Por meio da via secretória esta protease é direcionada para membrana plasmática na sua forma ativa após maturação no complexo Golgiense, permitindo clivar proteínas transmembrana como a APP (Lammich et al., 1999; Vincent e Checler, 2012; Huovila et al., 2005).

A ADAM10 cliva a APP pela via não-amiloidogênica dentro do domínio A β , entre os aa 687 e 688 (sítios Lys-16 e Leu-17) da APP. Um segregado solúvel sAPP α é gerado na porção N-terminal e um curto fragmento C-terminal de 88 aa fica ancorado a membrana. A clivagem deste curto fragmento é finalizada por γ -secretase, formando um peptídeo de 3kDa não tóxico (p3) (Hooper e Tumer, 2002; Sathya et al., 2012).

Com o passar dos anos, novos conceitos sobre ADAM10 e suas funções fisiológicas foram esclarecidos, principalmente no que diz respeito a sua ação proteolítica na DA, artrite reumatoide e câncer (Amour et al., 2000).

A expressão de ADAM10 em plaquetas de pacientes com DA verificada por Colciaghi e colaboradores em 2004, mostrou-se reduzida nos pacientes em relação aos controles. Já em 2005, o grupo de Zimmermann

demonstrou que em pacientes havia um aumento dos níveis de ADAM10 quando tratados com donepezila por 30 dias. Foi também observado que a donepezila promove o tráfego de ADAM10 para a membrana da célula, aumentando assim a sua atividade de um modo independente do sistema colinérgico (Pakaski e Kasa, 2003).

1.4 BACE1

A BACE1 (*Beta site APP cleaving enzyme 1, Aspartil protease-2, Memapsina-2* ou Beta secretase) pertence à família de proteases do tipo aspartil (Sodero et al, 2009). O gene *BACE1* está localizado no cromossomo 11q23.2-q23.3, compreendido por 8 éxons e 9 íntrons. Por meio de *splicing* alternativo são formadas no cérebro, pâncreas e em níveis mais baixos na maioria dos tecidos, isoformas proteicas com atividade enzimática distintas (Vassar et al, 1999; Haass, 2004).

A BACE1 é uma proteína transmembrana de 501 aa de peso molecular de aproximadamente 75kDa, estruturalmente composta por um peptídeo sinalizador, um prodomínio e um domínio transmembrana único. Sintetizada no retículo endoplasmático como um precursor inativo, é necessária a clivagem do prodomínio por furina para ocorrer à remoção do peptídeo sinalizador para que BACE1 seja direcionada a membrana

plasmática, alojando-se em *lipids rafts* (Walter et al., 2001). Essa proteína tem sua função proteolítica aumentada em pH ácido (Vassar et al., 2009).

Diversas isorformas de BACE1 já foram descritas na literatura. A maioria está localizada em endossomos e complexo Golgiense e algumas outras, no retículo endoplasmático (Tanahashi e Tabira, 2001; Mowrer e Wolfe, 2008). Após sua descoberta e identificação, os estudos demonstraram a participação dessa proteína em diferentes processos fisiológicos e patológicos inerentes ao SNC. Juntamente a células de *Schwann*, a BACE1 promove o processo de crescimento e desenvolvimento axonal na mielinização celular (Willem et al., 2006; Fleck et al., 2012; Hu et al., 2015). Sua contribuição em mecanismos inflamatórios também já foi descrita (Rojo et al., 2008; Lee et al., 2009).

Na cascata amiloide da DA, a BACE1 medeia a produção do peptídeo A β pela via amiloidogênica. A clivagem ocorre na porção N-terminal de APP, entre os aa metionina (posição 671) e ácido aspártico (posição 672) que segrega da membrana plasmática o derivado solúvel sAPP β . Um fragmento de 99 aa (β -CTF) acoplado a membrana na porção C-terminal é clivado por γ -secretase entre os aa 711-713 da APP, liberando para o meio extracelular o peptídeo A β_{40-42} (Sathya et. al., 2012).

A mutação no gene da APP, responsável pelo acometimento precoce da demência DA parece favorecer a formação de um sítio ideal para BACE1 na clivagem em APP, aumentando sua ação proteolítica e formação do A β (Haass, 2004). Supostamente, a formação de um local ideal para atividade de BACE1 na via amiloidogênica está ligada ao papel das proteínas

Catepsinas D e E. Um estudo revelou que estas duas enzimas são responsáveis pela ativação de BACE1 em linhagens celulares de *Escherichia coli* que contém a mutação em APP (Grüninger-Leitch et al., 2000).

Em líquido de pacientes com DA o aumento da atividade enzimática de BACE1 mostra-se associado com a diminuição do volume hipocampal dos mesmos (Ewers et al., 2011). Em complemento, estudos *postmortem* demonstram que a expressão e atividade de BACE1 estão aumentadas em idosos com DA (Coulson et al., 2010).

Manter a homeostasia dessa proteína é temática de muitos estudos, pois ao passo que seus níveis aumentados prejudicam funções importantes, a remoção de sua atividade compromete outras. Em ratos deficientes de BACE1, a produção de A β torna-se praticamente nula, melhorando a função colinérgica, reduzindo a perda neuronal e os déficits de memória (Luo et al., 2001; Ohno et al., 2004; Ohno et al., 2007). No entanto, há controvérsias que apontam prejuízo na plasticidade sináptica no hipocampo, diminuição do desempenho cognitivo, hipomielinização, elevação da sensibilidade à dor e menor expectativa de vida do animal (Garratt, 2000; Kamal et al., 2001; Dominguez et al., 2005; Laird et al., 2005; Hu et al., 2006; Lemke, 2006; Willem et al., 2006).

O A β é produzido fisiologicamente no SNC, por supostamente haver uma competição entre α e β pelo substrato de APP. Acredita-se que a clivagem nesta proteína ocorra, preferencialmente, por meio da via não amiloidogênica em cérebro normal, com a mudança no equilíbrio para a via

amiloidogênica na DA (Stockley e O'Neill, 2008). Desta maneira a diminuição ou inibição da produção de A β , por meio de inibidores da β -secretase representa um alvo terapêutico importante no tratamento dessa desordem (Luo et al.,2001).

1.5 Presenilina 1

A Presenilina 1 (PSEN1) é uma aspartil protease envolvida em processos proteolíticos de proteínas transmembranas, como a APP. Com peso molecular de aproximadamente 50kDa, seu gene está localizado no cromossomo 14q24.3. O gene de uma proteína homóloga é encontrada no cromossomo 1q42.13, conhecida como Presenilina 2 (PSEN2). Ambas com o mesmo peso molecular e com 9 domínios transmembrana (Zhang et al, 2010).

A PSEN1 é uma das quatro subunidades essenciais do multicomplexo proteico de γ -secretase: *presenilin (PSEN)*, *nicastrin (NCT)*, *anterior pharynx defective (APH1)* e *presenilin enhancer 2 (PEN-2)*. A PSEN1 confere função catalítica para γ -secretase facilitando a atividade proteolítica na bicamada lipídica. Os resíduos de aa Asp257 e Asp385, nos domínios 6 e 7, respectivamente, desempenham importante função para esta atividade em PSEN1 (De Strooper et al., 2012). Foi identificada como uma importante

proteína envolvida na patogênese da DA e sinalização Notch (Goutteet et al., 2002; De Strooper et al., 2012).

A descoberta de uma mutação em PSEN1 como uma das principais causas de início precoce da DA foi feita por Schellenberg e colaboradores (1992). A avaliação genômica detectou um polimorfismo no cromossomo 14 que resultava em uma DA pré-senil nos portadores da mutação.

Posteriores achados sugeriram que a PSEN1 estava intimamente ligada com a atividade do complexo γ -secretase: 1) as mutações ligadas à DA pré-senil parecia deslocar o local de clivagem de γ -secretase da posição 40 ao 42 do A β (Thinakaran et al., 1996); 2) a atividade de γ -secretase foi diminuída em ratos *knockout* para PSEN1 (De Strooper et al., 1998); 3) a substituição de qualquer um dos resíduos de aspartato em PSEN1 anulava a atividade de γ -secretase (Wolfe et al., 1999).

No entanto, apesar de estar presente em células de mamíferos e ser uma protease (Thinakaran et al., 1996) ainda há controvérsias sobre a real função biológica dessa proteína. Estudos bioquímicos indicam que a atividade de γ -secretase está associada com proteínas altamente estável e de elevado peso molecular (Iwatsubo, 2004). Outros apontam um papel importante na liberação e propagação de impulsos nervosos (Zhang et al., 2009) e plasticidade sináptica, visto que PSEN1 está localizada em terminais pré-sinápticos (Zhang et al., 2010) e pelo fato dos fragmentos C-terminais de APP se alojarem nestas regiões de neurônios de ratos (Saura et al., 2005).

Alguns dados sugerem que APP e PSEN1 fazem parte de uma via de sinalização comum para a ocorrência da hiperfosforilação da Tau. Após a

clivagem em APP pelo complexo γ -secretase, são liberados os peptídeos p3 e A β e um domínio AICD (domínio intracelular de APP) (Figura 7, item 1.2.1). Este último, após segregação dos dois peptídeos é capaz de interagir com o núcleo da célula e ativar a enzima GSK-3B, desencadeando a cascata de fosforilação da proteína Tau (Ittner e Gotz, 2011; Multhaup et al., 2015).

Curiosamente até o ano de 2012 a investigação da PSEN1 em pacientes com DA esporádica não tinha sido relatada. Mas, em 2013 uma pesquisa realizada na Espanha propôs a investigação dos níveis de PSEN1 em amostras de líquido. O resultado revelou níveis aumentados dessa proteína em líquido de pacientes com DA (García-Ayllón et al., 2013).

Diante dos achados, muitas propostas de intervenção terapêutica são associadas à diminuição ou inibição da atividade de PSEN1 na DA com o intuito de reduzir a produção do A β . Três delas merecem destaque: a) inibidores de γ -secretase; b) moduladores de γ -secretase e c) IChEs.

Apesar de promissor devido à quantidade de A β reduzida, o uso de inibidores de γ -secretase pode bloquear a sinalização Notch e levar ao desenvolvimento de deficiências e câncer. Sem apresentar melhora cognitiva e consequente piora da demência. Já os moduladores visam reduzir as taxas de declínio cognitivo por meio da redução seletiva do A β sem comprometer a sinalização Notch (Tan et. al., 2016). Em relação aos IChEs foi demonstrado que a ação aguda da donepezila em camundongos diminui os níveis de PSEN1 no cérebro, no entanto a administração crônica deste medicamento perde este efeito (Silveyra et al., 2012).

Até o momento não há uma definição a cerca da função essencial da PSEN1, os achados mostram-se inconsistentes. Por isso são necessários mais estudos em relação a esta proteína e seu papel em vias biológicas.

1.6 Sistema colinérgico na doença de Alzheimer

A disfunção colinérgica presente já nas fases iniciais da DA está associada ao comprometimento da cognição. Correlaciona-se com o declínio cognitivo, e constitui a base da hipótese colinérgica da DA (Perry et al., 1999; Terry e Buccafusco, 2003), caracterizada pela diminuição da oferta de acetilcolina (neurotransmissor essencial para memória, aprendizado e funções cognitivas) na fenda sináptica e prejuízo da memória recente (Beach et al., 1997).

As regiões cerebrais primariamente afetadas na doença são o hipocampo e áreas neocorticais, responsáveis pela produção e consolidação da memória (Davies e Maloney, 1976). O déficit colinérgico é uma das principais alterações fisiopatológicas da DA. Esta hipótese foi reforçada com um estudo pré-clínico em que antagonistas colinérgicos prejudicavam a memória de animais (Terry e Buccafusco, 2003). Confirmando a acentuada diminuição de colina acetiltransferase, comprometimento de neurônios colinérgicos pré-sinápticos e redução na captação de colina e liberação de acetilcolina em humanos (Perry et al., 1977; Contestabile, 2011). Além disso,

foi relatado um menor número de canais iônicos de receptores nicotínicos ($\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$) (Nordberg, 2006) e desacoplamento de receptores muscarínicos M1 (Joseph et al., 1993; Thathiah e De Strooper, 2009).

Há evidências já descritas que a redução da estimulação colinérgica está associada ao aumento de depósito A β 40/42 (Roher et al., 2000; Beach et al., 2003) e disfunção da fosforilação da Tau (Fuentealba et al., 2004) em cérebro de animais. Por outro lado, a estimulação muscarínica em M1 parece desempenhar um importante papel no metabolismo da APP favorecendo a secreção do sAPP α , enquanto é diminuída a quantidade do peptídeo neurotóxico (Lovestone, 1997).

Visto que a depleção de acetilcolina compromete funções biológicas importantes e reflete em um fenótipo típico nos acometidos com DA, a atenuação do déficit colinérgico constitui-se de uma importante estratégia terapêutica para preservar as funções cognitivas.

1.6.1 Tratamento da DA e mecanismo de ação do Donepezil

Atualmente, duas classes de fármacos são aprovadas pelas agências reguladoras para tratar os pacientes com DA: o antagonista não competitivo de receptores NMDA (Memantina) e os inibidores da colinesterase (donepezil, galantamina e rivastigmina) (Selkoe, 2004; Prvulovic e Schneider, 2014). Essas drogas geralmente tratam os sintomas de modo

paliativo, sem aparentemente modificar o curso e as bases patológicas da doença (Prvulovic e Schneider, 2014). Após início do tratamento, cerca de 40% dos pacientes apresentam melhoras sintomáticas significativas devido ao aumento da disponibilidade de acetilcolina e transmissão colinérgica (Rodgers, 2008). E de acordo com ensaios clínicos randomizados, as estratégias de combinação terapêutica têm trazido benefícios ainda maiores e a longo prazo para a sintomatologia dos acometidos (Tariot et al. 2004; Gauthier e Molinuevo, 2013).

Os IChEs compõem a principal classe medicamentosa usada para tratar os pacientes em estágios iniciais e moderado da DA. Há estudos que já propõe tratamento da fase grave com essa classe de fármacos (Cummings et al., 2013). O mecanismo de inibição dos IChEs sobre as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase; que promovem hidrólise da acetilcolina por mecanismo de *feedback*. Permite aumentar os níveis de acetilcolina na fenda sináptica e promove um estímulo prolongado de receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos, equivalente a uma estimulação excessiva (Figura 8). Esse mecanismo parece ser capaz de atenuar os sintomas da doença associados com a progressiva perda da função colinérgica e preservar o estado cognitivo, funcional e global dos pacientes (Selkoe, 2004; Massoud e Gauthier, 2010; Parsons et al., 2013).

Fonte: adaptado de Venâncio, 2008.

Figura 8 - Inibição da enzima acetilcolinesterase no sistema colinérgico

Os IChEs agem de três maneiras distintas de acordo com o tempo de ligação, ou seja, o tempo da ação inibitória: a) reversíveis ou de curta duração; b) intermediários ou pseudo-reversíveis e c) irreversíveis ou de longa duração (Jann et. al., 2002). A inibição da colinesterase pode ser mensurada no sangue, pelo exame de imagem PET e em líquido, porém com algumas incompreensões para este último (Nordberg, 2006).

Os primeiros inibidores desenvolvidos na década de 80 mostraram pouca eficácia na manutenção da função cognitiva de pacientes com DA, além de severos efeitos colaterais. A baixa atividade via administração oral, reduzida penetração pela barreira hemato-encefálica, inconsistência farmacocinética; da Fisostigmina e hepatotoxicidade; da Tacrina, levaram ao

desenvolvimento de outras estratégias farmacológicas (Sugimoto et al., 2002).

O surgimento do donepezil em 1983 implicou em novas descobertas a cerca do potencial terapêutico dos IChEs sobre a cognição. Derivado do composto piperidina, é um inibidor reversível e não competitivo da colinesterase, com ação predominantemente maior em acetilcolinesterase (Sugimoto et. al., 2002). Sua biodisponibilidade atinge a concentração plasmática máxima de 2 a 4 horas após administração por via oral, atingindo uma concentração estável em até 21 dias em humanos (Rogers e Friedhoff, 1998; Seltzer, 2005). A metabolização é realizada no fígado e a eliminação pelos rins. É importante ressaltar que o comprometimento hepático nos pacientes pode prejudicar a metabolização do donepezil mediada pelas enzimas hepáticas do citocromo CYP2D6 e CYP3A4. Deste processo é gerado um metabólito ativo (*6-O-desmethyl* donepezil) e diversos metabólitos inativos (Mihara et al., 1993; Tiseo et al., 1998; Seltzer, 2005). A meia vida de eliminação pela via renal é de aproximadamente 70 horas, o que permite sua administração uma única vez ao dia. Portanto, uma disfunção renal grave pode prejudicar o *clearance* do donepezil (Rogers e Friedhoff, 1998; Tiseo et al., 1998). De acordo com estudos em córtex e hipocampo de modelos animais, o donepezil parece efetivamente melhorar a memória com o aumento dos níveis de acetilcolina (Kawashima et al., 1994; Giacobini et al., 1996). Além disso, outros três neurotransmissores mostram-se influenciáveis por este medicamento, como a norepinefrina, dopamina e serotonina (Giacobini et al., 1996). A administração desse

modelo terapêutico e sua ação farmacológica sobre o curso sintomatológico da DA é bem estabelecida, porém pouco se sabe sobre seus efeitos neurobiológicos subjacentes. Por esta razão acredita-se que a neuroproteção promovida por esses medicamentos vai além das interferências colinérgicas. Com base nisso, os estudos científicos têm investigado a influência desses fármacos sobre as cascatas biológicas da DA, especificamente o metabolismo da APP e fosforilação da Tau.

A ação neuroprotetora do donepezil contra a neurotoxicidade do A β foi mostrada por diversas pesquisas. Há evidências que a estimulação de receptores muscarínicos associada ao uso dos IChEs regula o metabolismo da APP pela ativação da PKC, favorecendo o processamento pela α -secretase e diminuindo a formação de A β (Lovestone, 1997). Existe ainda uma hipótese que o aumento da clivagem por α -secretase está relacionado com a promoção do tráfego da ADAM10 para a membrana celular pela ação desse fármaco (Pakaski e Kasa, 2003). O donepezil também parece modificar a via amiloidogênica em humanos e em ratos, diminuindo os níveis de BACE1 em pacientes com DA (Zimmermann et al., 2005) e reduzindo consideravelmente o acúmulo de A β no interior das mitocôndrias em uma população de ratos com dupla mutação para APP/PSEN1 (Ye et al., 2015).

Normalmente, o uso desse medicamento é considerado seguro e a eficácia terapêutica é alcançada na dosagem mínima. A maioria dos efeitos colaterais incluem náusea, diarreia, vômito, fadiga, insônia e câibras musculares, no entanto, a prevalência destes eventos adversos é

substancialmente pequena na dose inicial de 5mg/dia e após aumento para a dose de 10mg/dia (Seltzer, 2005). Há relatos preliminares de reações adversas relevantes na dose de 23mg/dia para tratamento de DA grave (Cummings et al., 2013). Por este perfil seguro, alta eficácia e tolerabilidade e potencial efeito modificador o cloridrato de donepezila foi escolhido para o tratamento dos participantes deste estudo. Além disso, são poucos os estudos existentes relacionados aos efeitos dos IChEs galantamina e rivastigmina sobre o metabolismo da APP. Após breve pesquisa nas bases de dados literárias encontramos dois estudos: a) um avaliou a influência da galantamina em cultura celular de neuroblastoma (Li et al., 2010) e o outro b) tratou ratos com rivastigmina e verificou a interferência do medicamento nos animais (Ismail et al., 2013). As duas pesquisas observaram diminuição de BACE1 e A β pós-tratamento.

Em suma, as observações detalhadas corroboram a hipótese de que a preservação do estado cognitivo em pacientes com DA pode estar associada aos efeitos subjacentes do donepezil. Esses achados podem representar um mecanismo neurobiológico modulador dos IChEs sobre a patogênese da DA pela interferência no metabolismo da APP e fosforilação da proteína Tau.

1.7 Plaquetas como modelo periférico de neurônios

Os estudos de biomarcadores periféricos em plasma (Repetto et al., 1999; Hye et al., 2014; Oh et al., 2015), soro (Kim et al., 2001; Dursun et al., 2015; Inekci et al., 2015) e leucócitos (Adler et al., 2002; Sultana et al., 2013; Carboni et al., 2015) tem ganhado destaque na pesquisa das alterações bioquímicas relacionadas à fisiopatologia da DA. Destaca-se a pesquisa de mediadores inflamatórios (por ex., citocinas e interleucinas – Lee et al., 2009; Nascimento et al., 2014; Delaby et al., 2015; Leszek et al., 2016) e fatores de crescimento (pro ex., BDNF – Faria et al., 2014; Nascimento et al., 2014; Bathina e Das, 2015; Michalski et al., 2015; Passaro et al., 2015). Porém, a alta variabilidade biológica encontrada nessas matrizes impede afirmar que essas alterações são exclusivas dessa desordem, principalmente no que se refere aos processos inerentes a mediadores inflamatórios. Desta forma, torna-se incompreensível os estudos da etiologia do processo patogênico da DA nesses sistemas periféricos (Veitinger et al., 2014).

O uso das plaquetas como modelo periférico do metabolismo neurológico é eixo de investigação há mais de duas décadas (Weidemann et al., 1989; Maltese et al., 1990; Oltersdorf et al., 1990; Dugan et al., 1995; Li et al., 1995; Rosenberg et al., 1997; Colciaghi et al., 2004; Zimmermann et al., 2005; Zainaghi et al., 2007; Yu e Jia, 2009; Forlenza et al., 2011; Neumann et al., 2011; Catriala et al., 2012; Zainaghi et al., 2012; Casoli et

al., 2013; Gattaz et al. 2014; Gowert et al., 2014; Koç et al., 2014; Kniewallner et al., 2015; Manzine et al., 2014; Liu et al., 2015; Talib et al., 2015). Já foi descrito que plaquetas e neurônios compartilham de mecanismos bioquímicos e físicos semelhantes, como armazenamento e liberação do neurotransmissor serotonina (Barradas e Mikhailidis, 1993), expressão de proteínas (Li et al., 1995), estímulos cálcio-dependentes e expressão de receptores NMDA (Bush e Tanzi, 1998)

A proposta de investigar a cascata amiloide da DA em células sanguíneas surgiu em 1995, com o estudo de Li e colaboradores que mostrara possível analisar periféricamente a via amiloidogênica e não-amiloidogênica de neurônios. Esse estudo afirmou que as plaquetas expressavam a maquinaria enzimática para produzir os subprodutos da APP pela atividade de α , β e γ secretases. Após essa descoberta, diversos estudos se propuseram a detalhar o metabolismo da APP, visto que 95% desta proteína encontram-se circulante em plaquetas (Bush et al., 1990; Gardella et al., 1990; Lovestone, 1997; Di Luca et al., 1998; De Strooper e Annaert, 2000; Padovani et al., 2001; Pakaski e Kasa, 2003; Colciaghi et al., 2004; Di Luca et al., 2005; Zimmermann et al., 2005; Tang et al., 2006; Zhao et al., 2011; Zainaghi et al., 2012).

Em nosso grupo a pesquisa de biomarcadores plaquetários (Fosfolipase A2 [PLA2], GSK-3B e rAPP) tem-se mostrado altamente promissora e relevante na pesquisa translacional. Trabalhos inéditos que vão de encontro à literatura foram desenvolvidos no Laboratório de Neurociências (LIM-27), bem como em parceria com grandes institutos

dentro das diversas temáticas das desordens neuropsiquiátricas (DA, epilepsia, esquizofrenia, transtorno de humor, depressão e comprometimento cognitivo leve [CCL]) (Gattaz et al., 1996; Diniz et al., 2011; Zainaghi et al., 2007; Forlenza et al., 2011; Zainaghi et al., 2012; Joaquim et al., 2012; Gattaz et al., 2014; de Sousa et al., 2015; Talib et al., 2013; Talib et al., 2015).

Segundo os estudos de Gattaz e colaboradores (1996) e Talib e colaboradores (2013) a atividade da enzima PLA2 está reduzida em plaquetas de pacientes com DA e epilepsia refratária, correspondendo aos achados cerebrais.

A análise de plaquetas de idosos deprimidos mostrou níveis de fosforilação e razão de GSK-3B diminuídos (Diniz et al., 2011) e significativo aumento da atividade enzimática em pacientes com DA e CCL (Forlenza et al., 2011), justificando o envolvimento dessa enzima em processos neuropatológicos.

Frente a esses achados, estratégias terapêuticas com drogas antidemência, antidepressivas e estabilizadores de humor (por ex. inibidores da colinesterase, sertralina e lítio, respectivamente) parecem promover efeitos neuroprotetores por mecanismos secundários ainda não tão bem esclarecidos, mas supostamente inerentes às modulações proteicas e que podem ser observados perifericamente nas plaquetas.

Há evidências que o tratamento agudo e crônico de pacientes com DA com Donepezil aumenta significativamente a isoforma independente de cálcio da PLA2 (iPLA2) em plaquetas e, níveis aumentados de fosforilação

da GSK-3B são observados após cronicidade do tratamento (Talib et al., 2015). Além disso, a administração aguda desse medicamento parece restabelecer o metabolismo da APP nessa matriz (Lovestone, 1997; Borroni et al., 2001, Zimmermann et al., 2005).

Em idosos com depressão o uso de sertralina foi capaz de regular os níveis plaquetários da atividade de GSK-3B (Joaquim et al., 2012).

O tratamento com doses terapêuticas de lítio mostrou-se eficiente na estabilização de humor de pacientes com quadro de desordem bipolar durante episódios depressivos, aumentando a fosforilação de GSK-3B no sítio serina 9 (de Sousa et al., 2015).

A estabilidade das plaquetas e confiabilidade dos métodos de análises são descritas desde 1989, quando um estudo demonstrou que os parâmetros volume, contagem e distribuição plaquetária quase não modificavam durante um longo período de coleta sanguínea (Siebers et al., 1989). Depois, Veitinger e colaboradores (2012) por meio da metodologia de eletroferese em gel bi-dimensional por diferença de fluorescência (2D-DIGE), observaram que o coeficiente de variação (CV) das proteínas de plaquetas de indivíduos saudáveis era de 17%, conferindo à essa matriz uma estabilidade biológica.

No ano seguinte, um estudo corroborou o achado acima. Foi realizada a comparação do CV das plaquetas de pacientes com DA, doença de Parkinson, esquizofrenia e demência vascular *versus* CV das plaquetas de indivíduos saudáveis. A conclusão foi que o CV plaquetário não sofre

variação, mantendo-se baixo independentemente de uma condição patológica existente ou não (Baumgartner et al., 2013).

Mas, embora a grande vantagem de estudar o metabolismo neurológico nessa matriz, evitando a utilização de métodos extremamente invasivos como a coleta de líquido por punção lombar ou a biópsia cerebral, é necessária cautela para a obtenção das plaquetas pela coleta sanguínea, de modo a prevenir a ativação e agregação plaquetária. Normalmente as plaquetas podem ser ativadas por estímulos endógenos (trombina, colágeno, adrenalina, vasopressina e adenosina difosfato) e externos, além de conter diversos receptores de superfície que respondem a estímulos, podendo gerar uma resposta inibitória ou de ativação (Holmsen, 1991). E ainda que a coleta sanguínea seja uma técnica rápida, barata e pouco invasiva, o paciente deve estar disposto a fornecer no mínimo 1 tubo de amostra biológica para posterior análise e experimentação. Além disso, esta amostra deve ser processada até 30 minutos após a coleta.

Apesar dessas potenciais desvantagens citadas acima, inúmeros trabalhos reforçaram a noção de que o metabolismo em plaquetas pode refletir sistemas biológicos cerebrais, permitindo a investigação dos mesmos em tecido periférico. Portanto, modelos baseados em plaquetas aplicam-se ao estudo da fisiopatologia das desordens neuropsiquiátricas, com implicações para o diagnóstico baseado em biomarcadores, bem como para avaliar o potencial de modificação de anormalidades biológicas por meio de intervenções terapêuticas.

E, uma vez que as alterações patológicas responsáveis pela neurodegeneração na DA e outros distúrbios neuropsiquiátricos provavelmente iniciam-se no interior das células (Veitinger et al., 2014), reforçaremos nesse estudo a efetividade da utilização de plaquetas como matriz biológica para a análise do metabolismo da APP em tecidos periféricos e a investigação de efeitos modificadores da patogenia da DA a partir do tratamento com drogas antidepressão.

2 OBJETIVOS

- a) Determinar a expressão proteica dos fragmentos de 110 e 130kDa da proteína precursora do amiloide (APP) e as suas secretases (α , β e γ) em plaquetas de pacientes com doença de Alzheimer (DA) antes e após o tratamento com cloridrato de donepezila, comparando os achados com aqueles obtidos em plaquetas de indivíduos idosos saudáveis;
- b) Determinar a atividade enzimática das APP-secretases (α e β) em plaquetas de pacientes com doença de Alzheimer (DA) antes e após o tratamento com cloridrato de donepezila, comparando os achados com aqueles obtidos em plaquetas de idosos saudáveis.

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

a) Caracterização da amostra e critérios de elegibilidade:

Os participantes deste estudo são pacientes ou voluntários (controles) idosos atendidos no Ambulatório de Psicogeriatria do LIM-27 (Laboratório de Neurociências), do Departamento e Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde existe uma coorte de idosos com diferentes graus de acometimento cognitivo, acompanhados regularmente por equipe multiprofissional, para fins de tratamento (quando pertinente) e/ou pesquisa.

Foram recrutados 71 pacientes de ambos os sexos, com 65 anos ou mais, com o diagnóstico de DA leve ou moderada, estabelecido segundo os critérios diagnósticos do NINCDS-ADRDA (McKhann al., 1984). Os pacientes recrutados para este estudo correspondiam a casos novos admitidos consecutivamente no ambulatório do LIM-27. Foram excluídos os pacientes com deficiências sensoriais e/ou intelectuais que os impedissem de desempenhar adequadamente os testes necessários para avaliação das funções cognitivas; aqueles com quadro demencial pré-existente; portadores de doenças clínicas ou neurológicas com impacto sobre a capacidade cognitiva; pacientes com diagnóstico de doenças neurodegenerativas do sistema nervoso central (p.ex. doença de Parkinson), ou evidência clínica

prévia de ataque isquêmico transitório ou acidente vascular cerebral; pacientes clinicamente instáveis ou com saúde frágil no momento da avaliação inicial; outros transtornos psiquiátricos maiores, tais como esquizofrenia, transtorno bipolar; história ou evidências de alcoolismo ou abuso de substâncias depressoras do sistema nervoso central; uso recente ou atual de medicamentos com propriedades anticolinérgicas; recusa em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. Os participantes, ainda, não poderiam estar em tratamento com IChE no momento da avaliação basal, nem ter feito uso de drogas antidemência nos 6 meses anteriores.

Foram recrutados também 38 indivíduos cognitivamente saudáveis para compor o grupo comparativo (controles) na avaliação basal, totalizando uma casuística inicial de 109 indivíduos.

Todos os participantes incluídos no estudo realizaram exames laboratoriais de rotina (hemograma completo, função tireoidiana, função renal e hepática, perfil lipídico, dosagem de ácido fólico e vitamina B12 e sorologia para sífilis) e de imagem (tomografia computadorizada ou ressonância magnética) para afastar outras possíveis causas de demência. E o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi assinado por todos, ou por seus responsáveis, quando pertinente.

Entre os pacientes com DA que se mostraram elegíveis para o estudo, 12 foram excluídos por não atenderem aos critérios de inclusão e 13 por desistirem de participar do estudo após terem assinado o termo de consentimento. Dos pacientes que iniciaram o tratamento, 20 foram

prematuramente excluídos do estudo por fatores como: má aderência ao tratamento medicamentoso (6), descontinuação por efeitos colaterais (11), ou porque o familiar responsável optou por retirar o consentimento (3). Ainda, 3 pacientes que concluíram os primeiros três meses de tratamento foram excluídos na fase final do estudo (do terceiro ao sexto mês).

Sendo assim, a casuística efetiva deste estudo foi constituída de 23 pacientes com DA e 38 controles saudáveis. Os sujeitos do grupo controle foram submetidos à coleta de sangue apenas na avaliação basal. Os pacientes com DA foram submetidos a três coletas de sangue em tempos distintos: na avaliação basal (pré-tratamento) (T0), após 3 meses de tratamento (T1) e após 6 meses de tratamento (T2). O tratamento consistiu na administração de cloridrato de donepezila na dose inicial de 5mg/dia, em tomada única por via oral; após 30 dias de tratamento, havendo boa tolerabilidade, os pacientes passavam a receber a dose de 10 mg/dia do mesmo medicamento. Na figura 9 é possível verificar o fluxograma dos pacientes desse estudo.

Os pacientes foram acompanhados mensalmente por médico psicogeriatra experiente do Ambulatório de Psicogeriatria do LIM-27 (Dr. Sergio R. Hototian) que, após avaliação clínica, efetuava a prescrição do medicamento para retirada na farmácia do IPq. O mesmo também aplicava os testes cognitivos inerentes ao protocolo deste estudo (Mini-Exame do Estado Mental e Teste Cognitivo de Cambridge) (Folstein et. al., 1975; Roth et. al., 1986; Bertolucci et. al., 1994; Bottino et. al., 2001) em T0, T1 e T2 (Figura 9).

Figura 9 - Fluxograma do recrutamento dos pacientes e acompanhamento longitudinal prospectivo da evolução clínica

3.2 Avaliação diagnóstica

Todos os pacientes e controles tiveram avaliação neuropsiquiátrica completa e avaliação neuropsicológica antes do estabelecimento do diagnóstico cognitivo. Todos os participantes neste trabalho foram avaliados pela escala *Clinical Dementia Rating* (CDR) para determinar a gravidade dos déficits cognitivos e funcionais. Todos os pacientes com DA foram classificados como CDR 1 ou 2. Todos do grupo controle foram classificados como CDR 0. O Teste Cognitivo de Cambrigde (CAMCOG) e o Mini Exame do Estado Mental (MEEM) foram usados como medida de desempenho cognitivo global. A pontuação de ambos os testes não foi usada para o estabelecimento do diagnóstico dos pacientes.

Não houve diferença quanto à idade e o gênero, entre o grupo de pacientes com DA e o grupo controle. Já com relação à escolaridade foi observado que o grupo dos pacientes com DA tem média mais baixa (6 anos), diferindo significativamente do grupo controle, com média de 14 anos ($p < 0,0001$). Quanto aos parâmetros cognitivos, como esperado e por definição, o grupo DA foi significativamente diferente em relação ao grupo controle nos resultados de CAMCOG e MEEM ($p < 0,0001$) tanto na avaliação basal quanto no grupo que completou os seis meses do estudo (Tabela 1).

Tabela 1- Dados demográficos dos pacientes e controles analisados

Variáveis	Pacientes (n=23)	Controles (n=38)	<i>p</i>
Gênero (F/M)	17/6	26/12	0,649
Idade (média ± dp)	73,13 (±6,91)	72,26 (±6,55)	0,464
Escolaridade (média ± dp)	5,91 (±4,39)	13,81 (±5,13)	0,0001
MEEM (média ± dp)	18,56 (±5,10)	28,79 (±1,45)	0,0001
CAMCOG (média ± dp)	56,07 (±18,54)	96,61 (±5,679)	0,0001

F = Feminino, M = Masculino, dp = Desvio Padrão, *p* = *p-valeu* (nível de significância). Teste *t* de Student.

3.3 Determinação da expressão da APP e secretases

3.3.1 Obtenção e preparo de plaquetas

Para realização das análises de *western blotting* dos fragmentos de APP e das secretases, foram coletados 10 mL de sangue venoso em dois tubos a vácuo do tipo monovet contendo anticoagulante citrato de sódio 0,106 mol/L. Adicionou-se 200µL de EDTA 0,09M para cada 10 mL de sangue. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado delicadamente por inversão e centrifugado por 10 minutos a 1300 rpm em temperatura ambiente. Em seguida, 5 mL do sobrenadante PRP (plasma rico em plaquetas) foram transferidos para um tubo com capacidade de 15 mL (tipo Falcon), e este, centrifugado por 15 minutos a 2400 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante desta etapa foi removido por inversão e o depósito (*pellet*) de plaquetas foi lavado com 5 mL de Tris 10mM, pH = 7,4.

Centrifugou-se por 5 minutos a 2400 rpm em temperatura ambiente. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* com 800µL de tampão de lise (TRIS-HCl 10Mm [pH= 7,4] + EGTA 1mM + água MilliQ) + 8µL de PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride). As plaquetas foram congeladas e descongeladas para facilitar a lise e armazenadas em criotubos em temperatura de -80°C.

Após o preparo da amostra, uma alíquota de 50µL foi destinada a determinação de proteínas totais da suspensão de plaquetas pelo método de Lowry, ensaio colorimétrico para determinação de proteínas (Lowry et al., 1951), utilizando o kit Bio-Rad DC Protein assay (Bio-Rad Hercules). A determinação da concentração de proteínas totais foi obtida por meio de uma curva padrão de proteínas, empregando-se albumina de soro bovino (bovine serum albumin ou BSA; Sigma-Adrich) nas seguintes concentrações: 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 1,5 mg/mL.

3.3.2 Western blotting e Immunoblotting

Para separação das proteínas foi utilizado o método de *western blotting*, um método largamente utilizado em biologia molecular/bioquímica para separação de proteínas em amostras biológicas. A eletroforese proporciona o deslocamento das proteínas no gel, de acordo com a sua massa molecular (proteínas menores deslocam-se mais).

De acordo com o resultado obtido na determinação de proteínas totais, as amostras foram diluídas em tampão de amostra (*Laemmli buffer*) para permitir a normalização do conteúdo protéico e, em seguida, fervidas a 100°C por 5 minutos em banho seco (DRI-BLOCK DB-3, Techne) para sua desnaturação. No gel de poliacrilamida 8% foram aplicados volumes contendo 25 µg de proteína de cada amostra. A eletroforese para a separação das proteínas se desenvolveu em tampão de corrida por 120 minutos a 120V. Terminada a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose, na qual é possível a reação com os anticorpos específicos. A transferência ocorreu em tampão de transferência por 90 minutos a 200 mA. A eletroforese e transferência ocorreram em sistema Mini-Protean® II Cell, da Bio-rad.

Para o *immunoblotting* a membrana foi bloqueada com leite desnatado a 5% em TBS-Tween 0,2%, sob agitação suave em temperatura ambiente, a fim de se evitar interações inespecíficas do anticorpo primário. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo primário e, em seguida, com o anticorpo secundário. Entre o bloqueio e as incubações com os anticorpos, as membranas foram lavadas quatro vezes de 5 minutos com TBS-Tween 0,2% a temperatura ambiente e sob agitação mais vigorosa. As lavagens foram realizadas em agitador do tipo Roto Mix-50800 da Barnstead/Thermolyne. Para o bloqueio com leite e as incubações com os anticorpos foi empregado o agitador Platform Vari Mix, também da Barnstead/Thermolyne.

Sobre a membrana foi adicionado o reagente Amersham™ ECL™

Prime Western Blotting ([ECL Prime] GE Healthcare Life Sciences) que, após reagir com a peroxidase conjugada ao anticorpo, emite uma luz que é captada pela câmera do equipamento. Para adquirir a imagem da membrana foi utilizado o equipamento de imagem Chemiimager™ 4000 da Alpha Innotech, MultiImage Light Cabinet. Após aquisição da imagem, foi calculada a densitometria das bandas, que avalia indiretamente a quantidade de proteína que reagiu com o anticorpo primário, permitindo uma análise semi-quantitativa, gerando os resultados em termos de intensidade óptica (Kurien e Scolfield, 2006). Utiliza-se como parâmetro para análise o volume ajustado das bandas, que significa o volume total, diminuído do *background*. Após, foram feitas as análises estatísticas por meio de *softwares* adequados (Figura 10).

Fonte: adaptado de Racaniello, 2010.

Figura 10 - Metodologia de separação de proteínas (*Western Blotting*), reação antígeno-anticorpo (*Immunoblotting*), reação de quimioluminescência com o anticorpo ligado a proteína de interesse e visualização da banda pelo equipamento de imagem

➤ *Padrão interno*

Foi preparado um pool de amostras de plaquetas de jovens saudáveis seguindo o mesmo protocolo do preparo de amostra e feitas várias alíquotas, que foram congeladas a -80°C . Em cada gel foi aplicada esta amostra padrão em duplicata, chamada de padrão interno (Pi), para corrigir variações analíticas entre os experimentos. A média das densitometrias das amostras foi dividida pela média da densitometria do Pi em cada gel. É

importante ressaltar que o critério básico de um padrão interno é que o seu nível permaneça inalterado durante o experimento, independentemente de como é processado, ou tecidos e tipos celulares usados. Um recente estudo demonstrou que padrões internos com beta-actina e tubulina; dois controles internos usualmente utilizados em grande escala na pesquisa apresentam inconsistência de resultados, pois são diferentemente expressos em tecidos a partir de uma variedade numérica de modelos animais com neurodegeneração (Eaton et al., 2013). Em nosso laboratório o uso de um padrão interno a partir de amostras de jovens saudáveis tem-se mostrado consistente, inclusive, em relação à beta-actina observamos que os resultados não apresentam diferenças significativas quando comparamos o uso de ambos para a mesma amostra de paciente.

3.4 Método para atividade enzimática de ADAM10 e BACE1

3.4.1 Obtenção e preparo de plaquetas

Para realização das análises da atividade enzimática de ADAM10 e BACE1, foram coletados 40mL de sangue venoso em quatro tubos com capacidade de 10mL, contendo anticoagulante citrato de sódio 0,106mol/L. A cada tubo foi adicionado 1mL de ACD-NH. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado delicadamente por inversão e centrifugado durante 15

minutos a 1600 rpm a 20°C. A seguir, o sobrenadante (Plasma Rico em Plaquetas – PRP) foi transferido para outro tubo com capacidade de 50mL (tipo Falcon) e o pH, ajustado para 6,5 com ACD-NH. O PRP foi, então, transferido para quatro tubos de poliestireno (4 a 5 mL/tubo) e centrifugado durante 10 minutos a 2400 rpm à 20°C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente por inversão e adicionou-se ao *pellet* 2,5mL de solução de lavagem. Após descanso de 10 minutos, as plaquetas foram homogeneizadas cuidadosamente com uma pipeta *Pasteur* até total diluição e então foram adicionados mais 2,5mL de solução de lavagem. A mistura foi centrifugada por 8 minutos a 2400 rpm, o sobrenadante foi removido cuidadosamente, e o *pellet* ressuspendido com 0,5mL de Tris-sacarose. As plaquetas em Tris-sacarose foram armazenadas em quatro criotubos com 0,5mL e mantidas em freezer -80°C.

Após o preparo da amostra, uma alíquota de 50µL foi destinada a determinação de proteínas totais da suspensão de plaquetas pelo método de *Lowry* (conforme descrito no item 4.3.1).

3.4.2 Extração da ADAM10 e BACE1 na amostra

Realizamos a extração das secretases para aumentar a disponibilidade da proteína de interesse na amostra. Foi usado tampão de extração correspondente a cada kit, de acordo com instruções do fabricante.

As amostras foram centrifugadas a 600g por 10 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspendido em 100µL de tampão de extração refrigerado. A suspensão de células em tampão de extração foi colocada no gelo por 10 minutos e homogeneizada. A amostra foi centrifugada por 5 minutos a 10.000g a 4°C e o sobrenadante coletado foi armazenado em freezer -80°C até o uso.

Ambos os testes aplicados para verificar a atividade enzimática possuem um substrato específico marcado com um fluoróforo e um inibidor de fluorescência. Esse substrato enquanto intacto não emite fluorescência. Quando a enzima de interesse, presente na amostra, cliva este substrato há a separação do fluoróforo e inibidor de fluorescência, permitindo a emissão de luz (Figura 11). A intensidade da fluorescência é proporcional à atividade da enzima presente na amostra.

Fonte: adaptado de Ko et al., 2015.

Figura 11 - Método fluorimétrico para verificação de atividade enzimática

3.4.2.1 Atividade de ADAM10

Para a verificação da atividade de ADAM10 foi utilizado o kit *Sensolyte® 520 ADAM10 Activity Assay kit Fluorimetric*. Este kit possui uma curva padrão, empregando-se uma diluição seriada de 1mM 5-FAM *fluorescence reference standard* (Componente B) para 10μM *assay buffer* (Componente D). A curva partiu de uma concentração inicial de 10μM e foi diluída nas seguintes concentrações: 5μM; 2,5μM; 1,25μM; 0,625μM;

0,312 μ M; 0,156 μ M. Além disso, o kit contém um controle positivo (*Human recombinant* [Componente C]) e controle negativo (5-FAM/QXL™520 [Componente A]). A amostra foi retirada do freezer -80°C e descongelada em gelo. Após descongelamento dosamos as proteínas totais pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951), utilizando o kit Bio-Rad DC Protein assay (Bio-Rad Hercules). Para a reação foi necessária uma placa preta de fundo plano para evitar que a fluorescência emitida em um poço interferisse na leitura do outro. Nesta placa foram adicionados: 50 μ L de cada ponto da curva; 50 μ L da enzima ADAM10 para o controle positivo; 50 μ L de tampão para o controle negativo e branco; e 45 μ L de diferentes amostras de plaquetas para análise da atividade de ADAM10. Em todos os poços foram adicionados 50 μ L do substrato de ADAM10 e todas as reações foram feitas em duplicata. A placa foi agitada gentilmente por 30 segundos e levada ao leitor fluorimétrico (Hidex®) aquecido a 37°C. A leitura da placa foi feita após 30 minutos de reação no leitor de placa utilizando parâmetros de 490nm para excitação e 520nm para emissão do sinal.

3.4.2.2 Atividade de BACE1

Para a determinação da atividade de BACE1 foi utilizado o kit *BioVision® β -secretase Activity Fluorometric Assay Kit*. O ensaio contém um controle positivo (Active β -Secretase [Liofilizado]) e um controle negativo (β -

secretase Substrate). A amostra foi retirada do freezer -80°C e descongelada no gelo. Após descongelamento dosamos as proteínas totais pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951), utilizando o kit Bio-Rad DC Protein assay (Bio-Rad Hercules). Para a reação foi necessária uma placa preta de fundo plano para evitar que a fluorescência emitida em um poço interferisse na leitura do outro. Nesta placa foram adicionados $2\mu\text{L}$ da enzima BACE1 como controle positivo e $2\mu\text{L}$ do substrato de BACE1 + $50\mu\text{L}$ do tampão como controle negativo. Para análise da atividade de BACE1 foram adicionados $45\mu\text{L}$ das amostras de plaquetas. Em todos os poços foram adicionados $50\mu\text{L}$ do tampão + $2\mu\text{L}$ do substrato de BACE1 e todas as reações foram feitas em duplicata. A placa foi levada ao aparelho aquecido a 37°C e ficou sob agitação por 60 minutos. A leitura da placa foi feita após 60 minutos de reação em leitor de placa Hidex® utilizando parâmetros de 335-355nm para excitação e 495-510nm para emissão do sinal.

3.5 Análise estatística

Para análise dos dados obtidos utilizamos o *Test t Student* para comparar pacientes basal e controles. O teste de modelos mistos de medidas repetidas foi aplicado para verificar a influência do tratamento na expressão e atividade das proteínas nos diferentes tempos de coleta dos pacientes. Para correlações usamos o coeficiente de Pearson corrigido pelo

método de continuidade de Yates. As análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico SPSS para Windows, (versão 22 SPSS, Inc. Chicago, IL). Foram considerados significantes resultados com $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

Foram analisadas amostras de plaquetas obtidas de 23 indivíduos com DA e 38 controles saudáveis. As amostras dos pacientes foram colhidas em três momentos diferentes, isto é, antes do tratamento com cloridrato de donepezila (avaliação basal) e após 3 e 6 meses do início do mesmo; as amostras dos indivíduos do grupo controle foram colhidas uma única vez. Portanto, apresentamos os resultados da análise da expressão da razão de APP (rAPP), sAPP-110kDa, sAPP-130kDa, ADAM10, BACE1 e PSEN1, além da atividade enzimática de ADAM10 e BACE1 em 107 amostras de plaquetas subdivididas em quatro grupos: DA, basal (T0); DA após 3 meses de tratamento (T1); DA após 6 meses de tratamento (T2); grupo controle.

4.1 Expressão proteica da APP e secretases

Foi observada uma menor rAPP em pacientes com DA na avaliação inicial (T0) quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$), podendo indicar anormalidades no metabolismo desta proteína nas plaquetas. Porém, não houve modificação dos valores de rAPP nos pacientes com DA ao longo do tratamento com cloridrato de donepezila (Figura 12).

Figura 12 - a) *Immunoblotting* representativo dos fragmentos de 110kDa e 130kDa da APP dos pacientes com DA nas diferentes visitas (T0, T1 e T2), grupo controle e padrão interno (PI). **b)** Médias da rAPP em pacientes com DA e controles ($p < 0,0001$) (Teste *t* de Student). **c)** Médias rAPP em pacientes com DA tratados com cloridrato de donepezila por seis meses (T1 vs. T2, $p = 0,871$; T0 vs. T2, $p = 0,560$). T0: avaliação basal; T1: avaliação após 3 meses de tratamento; T2: avaliação após 6 meses de tratamento. (Teste de modelos mistos de medidas repetidas). As barras representam as médias ($\pm$ desvio padrão)

Observamos aumento na expressão do fragmento de 110kDa de sAPP nos pacientes com DA na avaliação basal (T0) em relação ao grupo

controle ($p=0,012$) (Figura 13a) e uma diminuição do fragmento de 130kDa ($p=0,039$) (Figura 14a). Não houve mudança na expressão desses fragmentos em pacientes com DA em resposta ao tratamento com cloridrato de donepezila (Figura 13b e 14b).

Figura 13 – a) Expressão de sAPP-110 kDa em pacientes com DA e controles ($p<0,012$) (Teste *t* de Student). b) Expressão de sAPP-110 kDa em pacientes com DA tratados com cloridrato de donepezila por seis meses (T1 vs. T2, $p= 0,096$; T0 vs. T2, $p= 0,109$) (Teste de modelos mistos de medidas repetidas). As barras representam as médias ($\pm$ desvio padrão)

Figura 14 – a) Expressão de sAPP-130 kDa em pacientes com DA e controles ($p<0,039$) (Teste *t* de Student) –. b) Expressão de sAPP-130 kDa em pacientes com DA tratados com cloridrato de donepezila por seis meses (T1 vs. T2, $p= 0,065$; T0 vs. T2, $p= 0,128$) (Teste de modelos mistos de medidas repetidas). As barras representam as médias ($\pm$ desvio padrão)

Foi observada uma diminuição da expressão de ADAM10 plaquetária nos pacientes com DA na avaliação basal (T0) em relação aos controles ($p < 0,0001$). Além disso, foi também observada diferença da expressão proteica desta enzima quando comparamos os tempos de tratamento T1 vs. T2 ($p = 0,050$), sugerindo, em relação aos valores basais, a ocorrência de um discreto aumento (T1 vs. T0) seguido de diminuição (T2 vs. T1) da expressão de ADAM10 ao longo do período tratamento; contudo, quando comparados aos valores basais (T0), não observamos diferença da expressão dessa enzima em plaquetas de pacientes com DA nos tempos T1 e T2 (Figura 15).

Figura 15 - a) Immunoblotting representativo da ADAM10 dos pacientes com DA nas diferentes visitas (T0, T1 e T2), grupo controle e padrão interno (PI). **b) Expressão de ADAM10 em pacientes com DA e controles** ($p < 0,0001$) (Teste *t* de Student). **c) Expressão de ADAM10 em pacientes com DA tratados com cloridrato de donepezila por seis meses** (T1 vs. T2, $p = 0,050$; T0 vs. T2, $p = 0,203$) (Teste de modelos mistos de medidas repetidas). As barras representam as médias (±desvio padrão). T0: avaliação basal; T1: avaliação de 3 meses de tratamento; T2: avaliação 6 meses de tratamento

Não observamos diferenças da expressão de BACE1 em plaquetas de pacientes com DA na avaliação basal (T0) em relação ao grupo controle, nem quando comparados os tempos de tratamento T1 vs. T2. Entretanto, em relação aos valores basais (T0), observamos uma diminuição da expressão proteica de BACE1 após 6 meses de tratamento com o cloridrato de donepezila, $p=0,023$ (Figura 16).

Figura 16 - a) Immunoblotting representativo da análise da BACE1 dos pacientes com DA nas diferentes visitas (T0, T1 e T2), grupo controle e padrão interno (PI). **b) Expressão de BACE1** em pacientes com DA e controles ($p=0,129$) (Teste *t* de Student). **c) Expressão de BACE1** em pacientes com DA tratados com cloridrato de donepezila por seis meses (T1 vs. T2, $p=0,539$; T0 vs. T2, $p=0,023$) (Teste de modelos mistos de medidas repetidas). As barras representam as médias (±desvio padrão). T0: avaliação basal; T1: avaliação de 3 meses de tratamento; T2: avaliação de 6 meses de tratamento

Pacientes com DA apresentaram expressão plaquetária de PSEN1 menor do que os indivíduos do grupo controle ($p= 0,004$). No entanto, não observamos diferenças da expressão proteica de PSEN1 ao longo do tratamento com cloridrato de donepezila (Figura 17).

Figura 17 - a) *Immunoblotting* representativo da análise da PSEN1 dos pacientes com DA nas diferentes visitas (T0, T1 e T2), grupo controle e padrão interno (PI). T0: avaliação basal; T1: avaliação de 3 meses de tratamento; T2: avaliação de 6 meses de tratamento. **b)** Expressão de PSEN1 em pacientes com DA e controles ($p=0,004$) (Teste *t* de Student). **c)** Expressão de PSEN1 em pacientes com DA tratados com cloridrato de donepezila por seis meses (T1 vs. T2, $p= 0,089$; T0 vs. T2, $p= 0,101$) (Teste de modelos mistos de medidas repetidas) - As barras representam as médias (±desvio padrão)

4.2 Atividade enzimática de ADAM10 e BACE1

Não observamos diferenças na atividade de ADAM10 (Figura 18a) ou BACE1 (Figura 19a) quando comparados pacientes em T0 e indivíduos do

grupo controle. O tratamento com cloridrato de donepezila também não pareceu modificar a atividade das secretases ADAM10 (Figura 18b) e BACE1 (Figura 19b).

Figura 18 - a) Atividade de ADAM10 em pacientes com DA e controles ($p=0,357$) (Teste *t* de Student). **b)** Atividade de ADAM10 em pacientes com DA tratados com cloridrato de donepezila por seis meses (T1 vs. T2, $p= 0,189$; T0 vs. T2, $p= 0,689$) (Teste de modelos mistos de medidas repetidas). As barras representam as médias ($\pm$ desvio padrão). T0- avaliação basal; T1 e T2- avaliações de 3 e 6 meses, respectivamente

Figura 19 - a) Atividade de BACE1 em pacientes com DA e controles ($p= 0,306$) (Teste *t* de Student). **b)** Atividade de BACE1 em pacientes com DA tratados com cloridrato de donepezila por seis meses (T1 vs. T2, $p= 0,333$; T0 vs. T2, $p= 0,949$) (Teste de modelos mistos de medidas repetidas). As barras representam as médias ($\pm$ desvio padrão). T0- avaliação basal; T1 e T2- avaliações de 3 e 6 meses, respectivamente

4.3 Correlação entre expressão e atividade enzimática das secretases

Não observamos correlação entre expressão de ADAM10 e atividade de ADAM10 (Figura 20a), bem como entre expressão de BACE1 e atividade de BACE1 (Figura 20b).

Figura 20 - a) Correlação entre expressão e atividade de ADAM10 ($p = 0,475$ e $R^2 = 0,008$). b) Correlação entre expressão e atividade de BACE1 ($p = 0,369$ e $R^2 = 0,009$)

5 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito do inibidor da acetilcolinesterase cloridrato de donepezila sobre o metabolismo da APP em plaquetas. Para isso determinamos a expressão dos peptídeos secretados de APP (sAPP) de 110kDa e 130kDa, bem como a razão entre os mesmos (rAPP), a expressão proteica das APP-secretases (ADAM10, BACE1 e PSEN1), e a atividade enzimática de ADAM10 e BACE1. O grupo experimental foi constituído por pacientes com DA leve ou moderada, sendo os parâmetros determinados antes e ao longo do tratamento com cloridrato de donepezila por 6 meses. Além disso, comparamos esses parâmetros com aqueles obtidos em amostras de plaquetas colhidas de indivíduos cognitivamente saudáveis.

Observamos que pacientes com DA, quando comparados a controles, apresentam uma diminuição da razão de APP (rAPP 130kDa / 110kDa). Nossos dados mostram que essa redução se deve à diminuição dos fragmentos secretados de APP de 130kDa, acompanhada de um aumento dos fragmentos de 110kDa. Estes achados corroboram resultados prévios da literatura, inclusive de estudos realizados no nosso grupo (Rosenberg et al., 1997; Di Luca et al., 1998, 2000; Zainaghi, 2006, Zainaghi et al., 2012). Em estudos clínicos, o tratamento com donepezila (assim como ocorre com outros inibidores da colinesterase) está associado a benefícios sobre a cognição e funcionalidade. Porém, há uma considerável heterogeneidade no

padrão de resposta; ou seja, nem todos os pacientes apresentam melhora cognitiva ou comportamental com o uso de inibidores da colinesterase. Portanto, a identificação de variáveis biológicas pode ajudar a explicar os mecanismos de respostas desenvolvidos pelos pacientes. No nosso estudo, o tratamento com cloridrato de donepezila por 3 e 6 meses não provocou mudança na razão entre os peptídeos secretados de APP de 130 e 110kDa (rAPP), diferentemente do que foi proposto por Borroni e colaboradores (2001), que haviam sugerido que o tratamento com donepezila (5mg/d por 4 semanas) estaria associado a um aumento de duas vezes no valor da razão de APP. Portanto, ainda há controvérsia se a ação da donepezila possa estar relacionada à modificação da expressão dos fragmentos de APP, ou se existe uma dinâmica temporal deste efeito, já que os resultados de Borroni e colaboradores (2001) foram registrados após um tempo de tratamento consideravelmente menor (4 semanas) do que o utilizado no presente estudo.

Há evidências que a estimulação dos receptores muscarínicos do tipo 1 ativa a proteína quinase C (PKC) e modifica o metabolismo da APP, favorecendo o processamento pela α -secretase, reduzindo assim a formação de A β pela β -secretase (Hung et al., 1993; Wolf et al., 1995; Lovestone, 1997). Em 2003, um estudo propôs observar a via fisiológica da ADAM10 em células COS-7 tratadas e não tratadas com 12-O-*tetradecanoylphorbol-13-acetate* (TPA); o TPA é considerado um potente ativador da PKC (Castagna et al., 1982; Nishizuka, 1984). Os resultados indicaram que as células tratadas apresentaram aumento da quantidade de

sAPP α , forma secretada por α -secretase em APP quando comparadas com as células não tratadas. Desta forma, estudos longitudinais acima de 6 meses de tratamento devem ser considerados, pois o aumento da rAPP, via favorecimento da clivagem fisiológica por α -secretase, pode estar relacionado a um maior tempo de tratamento.

Os processos traducionais (de N e O-glicosilação) e pós-traducionais (como os de fosforilação e sulfatação de resíduos de tirosina) propiciam a maturação da APP no complexo de Golgi, e dessa maneira é possível observar duas bandas da APP que são separadas pelo SDS-Page: uma de 110kDa e outra de 130kDa, representadas como formas imatura (N-glicosilada) e madura (N e O-glicosilada e tirosina sulfatada), respectivamente (Weidemann et al., 1989; Maltese et al., 1990; Oltersdorf et al., 1990; Dugan et al., 1995; De Strooper e Annaert, 2000; Zhao et al., 2011). Essas bandas provavelmente correspondem a peptídeos secretados (solúveis) originados pela clivagem de APP, embora não se saiba ao certo se: (a) ambos correspondem a sAPP-alfa (ie., decorrentes da clivagem de isoformas distintas de APP pela alfa secretase); ou se (b) correspondem aos peptídeos sAPPalfa e sAPPbeta, sendo o mais longo (130kDa) originado pela clivagem pela α -secretase e o mais curto (110kDa) originado pela clivagem da APP pela β -secretase.

Quando analisados separadamente observamos uma diminuição na expressão de sAPP-130kDa em pacientes com DA (T0) em relação aos controles, e um aumento na expressão de sAPP-110kDa. Em relação ao tratamento não observamos mudanças nesses fragmentos.

São necessários estudos mais específicos, por exemplo, com métodos de proteômica para confirmar que esses fragmentos de 130kDa e 110kDa correspondem às formas madura e imatura de sAPP, respectivamente (Weidemann et al., 1989; Maltese et al., 1990; Oltersdorf et al., 1990; Dugan et al., 1995; De Strooper e Annaert, 2000; Zhao et al., 2011). Porém nossos achados sugerem que o aumento da forma imatura (de 110kDa) ou diminuição da forma madura (de 130kDa) nos pacientes com DA corresponde a um processamento inadequado do metabolismo da APP em direção à amiloidogênese.

Além da APP, que ocupa uma posição central na fisiopatologia da DA, e os produtos da sua clivagem, sobretudo o peptídeo beta-amiloide ($A\beta$) (Cummings et al., 1998) as APP-secretases também têm sido alvos de estudos na busca de biomarcadores. A ADAM10 cliva a APP pela via não-amiloidogênica dentro do domínio $A\beta_{1-42}$, desfavorecendo a produção desse peptídeo, além de liberar um peptídeo supostamente neuroprotetor. Por outro lado, a BACE1 cliva a APP pela via amiloidogênica no limite N-terminal do domínio $A\beta$ favorecendo a produção do peptídeo que, após sua liberação para o meio extracelular e ulterior agregação, exercerá efeito neurotóxico no tecido adjacente. O papel da PSEN1 é liberar os substratos ancorados a membrana após a clivagem da APP por ADAM10 ou BACE1.

Com relação às secretases, os pacientes do presente estudo realmente apresentaram diminuição da expressão proteica de ADAM10 na avaliação basal, confirmando achados descritos por Colciaghi e colaboradores (2004) e Di Luca e colaboradores (2005), o que poderia

significar uma diminuição da via não-amiloidogênica nos pacientes. Entretanto, não observamos diferença na atividade enzimática propriamente dita de ADAM10 entre pacientes e controles.

Em 2005, Zimmermann e colaboradores demonstraram que a administração aguda (30 dias) do cloridrato de donepezila leva ao aumento dos níveis plaquetários de ADAM10 e que esse aumento poderia estar relacionado com a promoção do tráfego de ADAM10 para a membrana da célula pela ação do medicamento de um modo independente do sistema colinérgico (Pakaski e Kasa, 2003). Entretanto, o presente estudo mostrou uma diminuição dos níveis proteicos de ADAM10 após 6 meses de tratamento. Ressaltamos que os nossos achados não descartam a possibilidade de que ocorra aumento da expressão de ADAM10 em resposta ao tratamento agudo, o qual eventualmente não se mantém no tratamento crônico, já que observamos um discreto aumento (medido após 3 meses de tratamento) seguido de redução após 6 meses de tratamento contínuo. Além disso, é importante compreender melhor, em estudos futuros, a relação entre a expressão e a atividade das APP secretases, já que os achados não se correlacionaram entre si no presente estudo. Portanto, é possível que o efeito terapêutico do cloridrato de donepezila não seja devido primeriamente à modulação das vias de clivagem da APP, especialmente a via não-amiloidogênica.

O aumento da produção do peptídeo A β representa uma das principais características fisiopatológicas encontrada nos pacientes com DA e esse aumento já foi relacionado com níveis elevados da BACE1

encontrado nesses pacientes. Ewers e colaboradores (2011) descreveram que o aumento de BACE1 no líquido de pacientes está relacionado à quantidade de A β cerebral e diminuição hipocampal. No presente estudo não observamos diferença na expressão e atividade plaquetária desta proteína entre pacientes e controles. A falta de significância estatística do nosso achado pode ser decorrente da insuficiência amostral para os métodos aplicados.

Já com relação à expressão da BACE1, o presente estudo sugere que o tratamento crônico com cloridrato de donepezila pode ser capaz de modular seus níveis plaquetários, que se mostraram diminuídos (em relação à avaliação basal) ao final de 6 meses de tratamento. Em um estudo com modelo animal conduzido por Li e colaboradores (2012) observou-se que a expressão (mRNA) de BACE1 foi diminuída no hipocampo de ratos pelo tratamento com cloridrato de donepezila; além disso, o tratamento mostrou-se associado ao aumento da produção da enzima colina acetilcolinesterase. Tais efeitos mostraram associação com melhora em parâmetros de memória e aprendizado no modelo animal. Sabe-se que a BACE1 é a secretase responsável pela clivagem amiloidogênica da APP, propiciando a formação de A β . Portanto, a diminuição de BACE1 observada com o tratamento pode indicar que os agentes anticolinesterásicos agem preterindo a via amiloidogênica e não necessariamente priorizando a via não-amiloidogênica.

A busca por inibidores da atividade de β secretase de BACE1 é alvo terapêutico. Em nosso estudo procuramos avaliar se o cloridrato de donepezila poderia modular a atividade enzimática de BACE1 nesses

pacientes ao longo do tempo de tratamento. Entretanto, não observamos quaisquer mudanças significantes em 3 e 6 meses de tratamento, apesar de o medicamento ter sido capaz de diminuir os níveis plaquetários da expressão de BACE1 nos pacientes. Ainda há poucos estudos sobre a atividade enzimática de BACE1, e não há estudos em plaquetas. Os estudos disponíveis inferem a atividade enzimática pela expressão gênica cerebral (Coulson et al., 2010), expressão proteica em líquido (Barao et al., 2013) e pelos níveis plasmáticos de BACE1, sAPP α , sAPP β e A β (Wu et al., 2012). Até o momento não há achados que expliquem como se comporta a atividade enzimática da BACE1 nas mais diversas matrizes celulares, muito menos sobre medicamentos que possam levar a alguma alteração dessa função. Para isso é preciso o desenvolvimento de metodologias mais eficazes que possam demonstrar a atividade de BACE1 *in vivo*.

O papel da PSEN1 é promover a liberação dos substratos de ADAM10 e BACE1 ancorados à membrana plasmática, quando analisamos a PSEN1 observamos uma menor expressão da proteína em pacientes na avaliação basal quando comparados aos controles. Já foi descrito que uma mutação no gene que codifica a PSEN1 parece deslocar a clivagem em APP para a produção de A β 42 (Thinakaran et al., 1996). Porém, pouco se sabe sobre o papel essencial dessa proteína em vias celulares. Talvez a expressão de PSEN1 não esteja condizendo com sua atividade enzimática, ou seja, apesar de sua baixa expressão, a atividade enzimática pode estar elevada e promovendo clivagem proporcional à quantidade de A β cerebral. Além disso, sabe-se que a PSEN1 está localizada em terminais pré-

sinápticos de ratos, caso essa hipótese se espelhe em cérebro humano a neurodegeneração observada em pacientes com DA pode contribuir para a diminuição de PSEN1, o que corroboraria com o este estudo.

Já com o tratamento, o cloridrato de donepezila não modificou os níveis de expressão de PSEN1, apesar de já ter sido descrito que a administração aguda da donepezila em camundongos diminuía os níveis dessa proteína no cérebro; em contrapartida, a administração crônica da donepezila perdia esse efeito (Silveyra et al., 2012). Estes achados são coerentes com os nossos resultados negativos sobre o possível efeito da donepezila sobre a atividade de PSEN1. São necessários mais estudos no que se refere à alteração dos níveis de PSEN1 em pacientes com DA. Podemos considerar mais interessante verificar se essa diminuição de PSEN1 não poderia ser uma estratégia compensatória do organismo em diminuir a clivagem amiloidogênica. Além disso, é importante entender como o medicamento age não somente na expressão desta proteína em plaquetas, como também na sua atividade.

6 CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo, complementados por dados da literatura, permitem concluir que: o tratamento com cloridrato de donepezila, não interfere com o metabolismo da APP, apesar dos seus efeitos benéficos para a cognição.

7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

- Seleção e inclusão dos pacientes (não poderiam estar em tratamento atual ou ter feito uso de algum inibidor da colinesterase nos últimos seis meses);
- Desistência dos participantes ao longo do estudo;
- Insuficiência amostral;
- Inacurácia do método de atividade enzimática em plaquetas;
- Heterogeneidade no padrão de respostas dos pacientes a intervenção com donepezil.

8 ANEXOS

ANEXO A - Padronização do *immunoblotting* da APP e secretases em plaquetas

Para fazer a padronização do método para determinação das proteínas foi usado um pool de plaquetas de indivíduos saudáveis, seguindo o mesmo protocolo do preparo de amostra (Figura 21, 22, 23 e 24).

Figura 21 - Imagem do *western blotting* das isoforma da proteína APP em diferentes condições para *immunoblotting*. A) bloqueio 1 hora, anticorpo primário 1:300 e anticorpo secundário 1:300; B) bloqueio 1 hora, anticorpo primário 1:500 e anticorpo secundário 1:400; C) bloqueio 1 hora, anticorpo primário 1:1500 e anticorpo secundário 1:1500; D) bloqueio 1 hora, anticorpo primário 1:1500 e anticorpo secundário 1:1600

Figura 22 - Imagem do *western blotting* da ADAM10 em diferentes condições para *immunoblotting*. A) bloqueio 1 hora, anticorpo primário 1:1000 e anticorpo secundário 1:20.000; B) bloqueio 1 hora, anticorpo primário 1:5000 e anticorpo secundário 1:20.000; C) bloqueio 1 hora, anticorpo primário 1:5000 e anticorpo secundário 1:30.000

Figura 23 - Imagem do *western blotting* da BACE1 em diferentes condições para *immunoblotting*. A) bloqueio 1 hora, anticorpo primário 1:5000 e anticorpo secundário 1:20.000; B) bloqueio 1 hora, anticorpo primário 1:10.000 e anticorpo secundário 1:20.000; C) bloqueio *overnight*, anticorpo primário 1:10.000 e anticorpo secundário 1:20.000

Figura 24 - Imagem do *western blotting* da PSEN1 em diferentes condições para *immunoblotting*. A) bloqueio 1 hora, anticorpo primário 1:5000 e anticorpo secundário 1:20.000; B) bloqueio 1 hora, anticorpo primário 1:10.000 e anticorpo secundário 1:20.000; C) bloqueio *overnight*, anticorpo primário 1:10.000 e anticorpo secundário 1:20.000

Com base nos resultados obtidos na padronização do *immunoblotting* da APP e secretases determinamos o protocolo a ser seguido conforme a tabela abaixo para análise das amostras dos participantes incluídos neste estudo (Tabela 2).

Tabela 2 - Bloqueio, diluição e tempo de incubação dos anticorpos da proteína APP e secretases

Proteína	Tempo de Bloqueio	Diluição e tempo de incubação do anticorpo (Ac)	
		Ac. Primário	Ac. Secundário
APP	60min	<ul style="list-style-type: none"> • 1:1.500 • 120min <i>Anti-Alzheimer Precursor Protein A4, clone 22C11 (Millipore)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 1:1.500 • 60min <i>Anti-Mouse IgG – conjugado a peroxidase (Sigma-Adrich)</i>
ADAM10	60min	<ul style="list-style-type: none"> • 1:5.000 • Overnight <i>Anti-ADAM10 antibody (Abcam)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 1:30.000 • 60min <i>Anti-Rabbit IgG – conjugado a peroxidase (GE Healthcare Life Sciences)</i>
BACE1	Overnight	<ul style="list-style-type: none"> • 1:10.000 • 60min <i>Anti-BACE1 antibody (Abcam)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 1:20.000 • 60min <i>Anti-Rabbit IgG – conjugado a peroxidase (GE Healthcare Life Sciences)</i>
PSEN1	Overnight	<ul style="list-style-type: none"> • 1:10.000 • 60min <i>Anti-PSEN1 antibody (Abcam)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 1:20.000 • 60min <i>Anti-Rabbit IgG – conjugado a peroxidase (GE Healthcare Life Sciences)</i>

Anexo B - Resultados individuais da razão de APP (rAPP), ADAM10, BACE1, PSEN1, atividade de ADAM10 e BACE1 em plaquetas dos participantes incluídos no estudo.

Tabela 3 - Resultados individuais da expressão da rAPP e dos fragmentos secretados de 130 e 110kDa das amostras de pacientes

			Expressão protéica nos diferentes tempos de coleta								
			T0			T1			T2		
Pacientes	Sexo	Idade (anos)	rAPP	APP130kDa	APP110kDa	rAPP	APP130kDa	APP110kDa	rAPP	APP130kDa	APP110kDa
1	M	82	1,48	1,47	1,00	1,83	1,60	0,86	2,00	1,40	0,68
2	F	69	0,94	0,78	0,96	0,74	0,80	1,03	0,33	0,32	0,93
3	F	61	1,52	0,88	0,53	1,05	0,88	0,77	1,53	1,13	0,68
4	F	76	1,30	1,20	0,88	1,19	1,89	1,54	0,37	0,82	2,11
5	F	65	0,57	0,96	1,73	0,45	0,83	1,88	0,99	0,96	0,98
6	F	76	0,79	1,50	1,76	1,07	1,35	1,25	0,71	1,02	1,43
7	F	80	1,20	2,29	1,78	0,76	1,63	2,06	0,79	1,37	1,67
8	F	74	1,16	1,60	1,38	0,86	1,25	1,45	1,27	1,83	1,43
9	M	87	1,32	1,28	0,97	1,85	2,33	1,32	1,42	1,80	1,32
10	F	71	1,29	1,67	1,30	1,66	3,17	1,89	0,63	0,81	1,30
11	M	67	1,21	2,34	1,98	0,76	0,89	1,20	1,88	1,78	0,96
12	F	69	2,38	2,21	0,92	1,48	1,37	0,92	0,37	0,53	1,46
13	F	89	1,23	0,88	0,71	1,33	1,00	0,74	1,30	0,36	0,29

14	F	65	1,50	1,32	0,86	1,03	1,61	1,52	1,30	1,20	0,88
15	M	76	1,18	1,05	0,82	1,88	1,30	0,68	2,16	1,18	0,54
16	F	77	1,43	1,38	0,95	1,39	1,73	1,24	1,64	1,93	1,14
17	F	68	1,64	1,50	0,92	1,44	1,27	0,89	1,89	1,67	0,89
18	M	75	0,72	1,78	2,47	1,69	1,70	0,99	1,8	1,22	0,68
19	M	73	0,82	0,87	1,09	0,73	0,90	1,25	1,44	0,81	0,44
20	F	72	0,49	1,35	2,74	0,82	1,01	1,23	0,82	0,96	1,11
21	F	69	0,73	0,82	1,10	0,98	1,14	1,14	0,71	0,90	1,10
22	F	74	3,09	0,71	0,4	1,00	0,85	0,85	1,14	0,88	0,66
23	F	67	1,18	0,85	0,72	1,06	0,61	0,58	0,73	0,72	0,61

Tabela 4 - Resultados individuais da expressão de ADAM10, BACE1 e PSEN1 das amostras de pacientes

Pacientes	Sexo	Idade (anos)	Expressão protéica nos diferentes tempos de coleta								
			T1			T2			T2		
			ADAM10	BACE1	PSEN1	ADAM10	BACE1	PSEN1	ADAM10	BACE1	PSEN1
1	M	82	0,89	0,74	0,38	0,35	0,47	0,67	0,17	0,68	1,31
2	F	69	1,71	1,60	1,05	0,58	1,21	0,20	1,02	1,56	0,35
3	F	61	0,62	0,96	1,39	0,56	0,87	0,59	1,20	0,79	2,59
4	F	76	0,77	1,43	0,87	1,31	1,20	1,61	0,73	1,66	1,05
5	F	65	0,45	1,29	0,78	0,86	1,26	1,30	0,04	1,29	0,90
6	F	76	0,76	1,23	1,03	0,68	1,31	1,10	0,61	1,12	0,61
7	F	80	1,24	0,87	2,21	1,18	0,67	1,09	0,43	0,96	2,28
8	F	74	0,93	2,43	1,09	0,65	0,93	0,58	0,09	0,43	1,00
9	M	87	0,43	2,63	1,09	0,77	1,56	1,37	0,23	2,56	2,44
10	F	71	0,37	3,79	0,91	0,08	3,17	1,74	0,83	1,92	1,74
11	M	67	0,83	1,90	1,14	0,46	0,70	0,34	0,49	1,00	1,53
12	F	69	0,15	2,17	1,31	1,68	1,39	1,31	0,22	0,83	1,42
13	F	89	0,04	0,44	0,57	1,23	0,47	1,19	0,26	0,50	1,44
14	F	65	0,16	1,06	1,51	0,87	0,94	1,17	0,28	1,06	2,15
15	M	76	0,18	1,04	1,86	0,28	1,75	2,91	0,27	1,71	2,42

16	F	77	0,12	1,29	0,79	0,20	1,04	0,98	0,83	1,07	0,98
17	F	68	0,08	0,67	0,93	0,11	0,62	1,01	0,13	0,71	1,55
18	M	75	0,68	1,22	0,69	0,57	1,04	0,95	0,04	1,08	0,85
19	M	73	0,92	0,65	0,48	0,76	0,46	0,53	1,21	0,67	1,17
20	F	72	0,79	0,30	0,40	0,67	1,36	1,46	0,24	0,37	0,37
21	F	69	1,24	0,83	0,60	1,50	0,69	0,64	1,20	0,50	0,37
22	F	74	1,19	3,05	2,06	0,82	2,41	1,29	0,88	1,48	1,40
23	F	67	0,89	0,81	0,90	1,06	0,64	1,05	0,38	0,63	0,63

Tabela 5 - Resultados individuais da atividade enzimática de ADAM10 e BACE1 das amostras de pacientes

			Atividade enzimática nos diferentes tempos de coleta					
			ADAM10			BACE1		
Pacientes	Sexo	Idade (anos)	T0	T1	T2	T0	T1	T2
1	M	82	510,66	609,92	610,82	195,60	126,14	91,56
2	F	69	554,75	136,40	264,50	115,44	111,21	151,75
3	F	61	696,18	2159,62	688,48	165,30	150,79	103,05
4	F	76	458,48	296,84	543,78	167,14	131,72	181,65
5	F	65	511,90	277,91	421,39	89,94	162,81	125,78
6	F	76	352,72	1715,87	591,31	129,97	111,35	115,03
7	F	80	545,98	423,96	471,63	192,30	131,71	207,09
8	F	74	624,53	578,38	478,48	177,74	287,70	86,88
9	M	87	532,17	575,44	367,62	87,39	240,81	94,11
10	F	71	186,92	544,64	427,40	121,53	126,75	85,00
11	M	67	398,92	619,64	517,57	190,08	132,82	154,74
12	F	69	685,48	593,90	444,98	162,75	104,82	106,00
13	F	89	638,01	563,18	673,58	150,66	120,27	116,26
14	F	65	203,69	289,01	343,07	111,66	84,76	92,63
15	M	76	389,87	465,40	287,68	112,28	101,15	126,38
16	F	77	351,24	353,11	211,04	117,75	116,22	105,90
17	F	68	444,16	376,91	526,00	107,61	101,83	83,68
18	M	75	441,48	386,98	628,22	135,87	148,32	189,46
19	M	73	441,50	900,57	489,11	133,18	243,73	183,43
20	F	72	922,67	1032,52	832,45	177,42	174,02	246,40
21	F	69	613,64	1164,22	1205,12	161,07	433,23	333,66
22	F	74	572,61	356,97	769,53	177,75	221,06	241,47
23	F	67	916,45	984,08	1078,06	256,90	213,23	240,82

Tabela 6 - Resultados individuais da expressão da rAPP e dos fragmentos secretados de 130 e 110kDa das amostras do grupo controle

			Avaliação Basal – T0		
			Expressão protéica		
Controles	Sexo	Idade (anos)	rAPP	APP130kDa	APP110kDa
1	F	71	1,28	1,96	1,54
2	M	74	1,61	1,51	1,31
3	M	65	1,65	2,39	0,93
4	F	73	1,12	1,38	1,13
5	M	80	1,36	1,18	1,07
6	F	70	1,05	1,33	1,32
7	F	72	2,42	1,28	1,07
8	F	74	1,78	0,96	0,87
9	F	75	3,01	1,13	1,11
10	F	72	1,25	2,26	0,67
11	M	62	4,14	2,23	0,78
12	F	82	1,77	2,84	1,12
13	F	86	1,87	1,81	0,78
14	M	82	3,16	1,56	1,50
15	F	76	0,77	1,42	0,77
16	F	67	2,16	0,44	1,27
17	F	65	2,58	1,25	1,26
18	F	74	1,68	3,13	0,97
19	F	82	2,23	1,34	0,66
20	M	72	1,23	1,71	0,54
21	F	66	1,82	0,73	1,81
22	M	68	2,22	1,51	2,15
23	F	73	2,09	1,20	1,00
24	F	72	2,34	1,99	1,16
25	F	82	2,50	2,10	0,97
26	F	73	1,50	1,10	2,11
27	M	73	2,74	2,39	4,22
28	M	57	1,64	1,88	1,78
29	F	66	3,34	1,11	1,63
30	M	74	1,26	2,14	0,67
31	M	79	2,35	1,04	1,26

32	F	82	2,34	2,80	1,08
33	F	66	1,57	2,03	1,00
34	F	65	1,45	0,58	0,54
35	M	66	1,89	0,90	0,84
36	F	65	4,67	2,65	0,46
37	F	69	3,02	0,88	0,54
38	F	76	4,39	1,29	1,08

Tabela 7 - Resultados individuais da expressão de ADAM10, BACE1 e PSEN1 e da atividade enzimática de ADAM10 e BACE1 das amostras do grupo controle

			Avaliação Basal – T0				
			Expressão protéica			Atividade Enzimática	
Controles	Sexo	Idade (anos)	ADAM10	BACE1	PSEN1	ADAM10	BACE1
1	F	71	1,96	1,54	1,26	371,26	134,40
2	M	74	1,51	1,31	1,07	416,90	127,94
3	M	65	2,39	0,93	1,95	724,36	131,81
4	F	73	1,38	1,13	0,97	405,41	139,77
5	M	80	1,18	1,07	1,21	419,60	134,73
6	F	70	1,33	1,32	1,17	608,65	249,31
7	F	72	1,28	1,07	1,04	677,52	249,61
8	F	74	0,96	0,87	0,87	498,86	151,61
9	F	75	1,13	1,11	0,59	465,32	184,10
10	F	72	2,26	0,67	1,87	790,06	182,61
11	M	62	2,23	0,78	0,89	672,35	221,44
12	F	82	2,84	1,12	2,85	568,94	116,13
13	F	86	1,81	0,78	1,49	589,01	171,85
14	M	82	1,56	1,50	2,70	474,82	129,35
15	F	76	1,42	0,77	1,28	602,39	219,55
16	F	67	0,44	1,27	0,54	551,59	142,73
17	F	65	1,25	1,26	1,62	382,73	114,27
18	F	74	3,13	0,97	2,65	557,21	262,60
19	F	82	1,34	0,66	1,57	876,87	183,98
20	M	72	1,71	0,54	2,59	364,28	163,29
21	F	66	0,73	1,81	0,44	456,60	134,91
22	M	68	1,51	2,15	2,57	497,02	173,50
23	F	73	1,20	1,00	2,41	453,86	173,86
24	F	72	1,99	1,16	1,15	430,16	158,51
25	F	82	2,10	0,97	1,98	1216,09	130,44
26	F	73	1,10	2,11	1,24	471,93	178,02
27	M	73	2,39	4,22	1,10	499,62	168,72
28	M	57	1,88	1,78	1,30	649,76	169,67
29	F	66	1,11	1,63	1,48	527,39	203,94
30	M	74	2,14	0,67	2,20	420,83	100,81
31	M	79	1,04	1,26	1,24	673,48	179,01

32	F	82	2,80	1,08	1,38	753,72	161,90
33	F	66	2,03	1,00	1,93	491,47	162,76
34	F	65	0,58	0,54	0,61	651,88	103,98
35	M	66	0,90	0,84	0,84	771,26	170,78
36	F	65	2,65	0,46	2,11	649,89	112,02
37	F	69	0,88	0,54	2,29	445,28	92,84
38	F	76	1,29	1,08	1,32	372,09	120,46

Anexo C - Lista de reagentes e soluções

- ACD-NH: Glicose 124mM, citrato de sódio dihidratado 84mM, ácido cítrico 41 mM;
- Solução de Lavagem: Citrato de sódio 0,1M, KCl 0,155M, MgCl₂ 0,1M, glicose 0,33M, CaCl₂ 0,1M, albumina 200mg/mL, NaCl 0,9% e apyrase 2U/mL;
- Tris-sacarose: Tris-HCL 50mM pH = 7,4, sacarose 233mM;
- Tampão de Lise: Tris-HCL 10mM, pH = 7,4, EGTA 1mM. Adicionar no momento do uso, para cada 1mL de tampão: 10 µL de PMSF 100mM e 10µL do coquetel de inibidor de protease (AEBSF, aprotinina, bestatina, E64, leupeptina, da AMRESCO);
- BSG: NaCl 117mM, citrato de sódio dihidratado 13.6mM, glicose 11.1mM, Na₂HPO₄ 8.6mM, K₂HPO₄ 1.6mM, pH = 7,4;
- Tris Isosmótico: Tris-HCL 50mM, NaCl 10mM, EDTA 20mM, pH = 6,3;
- Tris Hipotônico: Tris-HCL 5mM, EDTA 5mM, pH = 8,0;
- PBS: NaCl 120mM, Na₂HPO₄ 15,3mM, K₂HPO₄ 1,46mM, KCl 1,68mM, pH = 7,4;
- Tampão de amostra (*Laemmli Buffer*): Tris 0,8M, Mercaptoetanol 12%, glicerol 10%, SDS 8%, azul de bromofenol 0,2%;
- Gel de poliacrilamina a 8%:
- Tampão de corrida: Tris 25mM, glicina 160mM, SDS 0,1%;
- Tampão de transferência: Tris 25mM, glicina 192mM, metanol 20%;
- TBS-Tween: TBS 10X (Tris 25mM, NaCl 140mM, KCl 5mM), água destilada, Tween 0,2%.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADI (Alzheimer's Disease International). Policy brief for heads of government: The global impact of dementia 2013–2050. Londres: Alzheimer's Disease International. 2013.

Adler KA, Mills PJ, Dimsdale JE, Ziegler MG, Patterson TL, Sloan RP, Grant I. Temporal stability of acute stress-induced changes in leukocyte subsets and cellular adhesion molecules in older adults. *Brain Behav Immun*. 2002;16(3):262-74.

Alzheimer's Association. What Is Alzheimer's? Disponível em: <http://www.alz.org/alzheimers_disease_what_is_alzheimers.asp>. Acesso em: outubro/2015.

Amour A, Knight CG, Webster A, Slocombe PM, Stephens PE, Knäuper V, Docherty AJ, Murphy G. The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett*. 2000;19;473(3):275-9.

APA (American Psychiatric Association). Manual diagnóstico e estatístico dos transtornos mentais-DSM-IV. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 2002.

Aprahamian I, Martinelli JE, Yassuda MS. Doença de Alzheimer: revisão da epidemiologia e diagnóstico. *Rev Bras Clin Med*, 2009;7:27-35.

Araújo AC, Lotufo Neto F. A nova classificação americana para os transtornos mentais – o DSM-5. *Jornal de Psicanálise*. 2013;46 (85), 99-116.

Ávila R. Resultados da reabilitação neuropsicológica em paciente com doença de Alzheimer leve. *Rev. Psiq. Clín*. 2003;30 (4):139-146.

Barao S, Zhou L, Adamczuk K, Vanhoutvin T, van Leuven F, Demedts D, Vijverman AC, Bossuyt X, Vandenberghe R, De Strooper B. BACE1 levels correlate with phospho-tau levels in human cerebrospinal fluid. *Curr Alzheimer Res*. 2013;10(7):671-8.

Barradas MA, Mikhailidis DP. The use of platelets as models for neurons: possible applications to the investigation of eating disorders. *Biomed Pharmacother*. 1993;47(1):11-8.

Bathina S, Das UN. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Arch. Med. Sci*. 2015;10;11(6):1164-78.

Beach TG, Honer WG, Hughes LH. Cholinergic fibre loss associated with diffuse plaques in the non-demented elderly: The preclinical stage of Alzheimer's disease? *Acta. Neuropathol*. 1997;9(2):146-53.

Beach Tg, Sue L, Scott S, Layne K, Newell A, Walker D, Baker M, Sahara N, Yen SH, Hutton M, Casalli R, Adler C, Connor D, Sabbagh M. Hippocampal sclerosis dementia with taupathy. *Brain Pathol.* 2003;13(3):263-78.

Bertolucci PHF, Brucki SMD, Campacci SR, Juliano Y. O mini-exame do estado mental em uma população geral: impacto da escolaridade. *Arq Neuropsiquiatr* 1994;52:1-7.

Borroni B, Colciaghi F, Pastorino L, Pettenati C, Cottini E, Rozzini L, Monastero R, Lenzi GL, Cattabeni F, Di Luca M, Padovani A. Amyloid precursor protein in platelets of patients with Alzheimer disease: Effect of acetylcholinesterase inhibitor treatment. *Arch. Neurol.* 2001;58(3):442-6.

Bottino CMC, Stoppe AJr, Scalco AZ, Ferreira RCR, Hototian SR, Scalco MZ. Validade e confiabilidade da versão brasileira do CAMDEX. *Arq Neuropsiquiatr.* 2001; 59 Suppl 3:20.

Brookmeyer R, Corrada MM, Curriero FC, Kawas C. Survival following a diagnosis of Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2002;59(11):1764-7.

Bush AI, Martins RN, Rumble B, Moir R, Fuller S, Milward E, Currie J, Ames D, Weidemann A, Fischer P, et al. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is released by human platelets. *J Biol Chem.* 1990 Sep 15;265(26):15977-83.

Bush AI, Tanzi RE. Alzheimer disease-related abnormalities of amyloid β precursor protein in the platelet [editorial]. *Arch Neurol.* 1998; 55: 1179-1180.

Caillé I, Allinquant B, Dupont E, Bouillot C, Langer A, Müller U, Prochiantz A. Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development.* 2004;131(9):2173-81.

Caramelli P, Teixeira AL, Buchpiguel CA, Lee HW, Livramento JA, Fernandez, LL, Anghinah R. Diagnóstico de doença de Alzheimer no Brasil-Exames complementares. *Dement Neuropsychol.* 2011;5(Suppl 1):11-20.

Carboni L, Lattanzio F, Candeletti S, Porcellini E, Raschi E, Licastro F, Romualdi P. Peripheral leukocyte expression of the potential biomarker proteins Bdnf, Sirt1, and Psen1 is not regulated by promoter methylation in Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett.* 2015;605:44-8.

Casoli T, Baliaetti M, Giorgetti B, Solazzi M, Scarpino O, Fattoretti P. Platelets in Alzheimer's disease-associated cellular senescence and inflammation [Abstract]. *Curr Pharm Des.* 2013;19(9):1727-38.

Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem.* 1982;10;257(13):7847-51.

Catricala S, Torti M, Ricevuti G. Alzheimer disease and platelets: how's that relevant. *Immun. ageing*. 2012;17:9(1):20.

Cavallucci V, D'Amelio M, Cecconi F. A β toxicity in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2012; 45(2):366-78.

Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends cell. biol*. 2001;11(11):S37-43.

Chasseigneaux S, Dinc L, Rose C, Chabret C, Couplier F, Topilko P, Mauger G, Allinquant B. Secreted amyloid precursor protein β and secreted amyloid precursor protein α induce axon outgrowth in vitro through Egr1 signaling pathway. *PLoS One*. 2011;27;6(1):e16301.

Chaves MLF. Diagnóstico diferencial das doenças demenciais. In: Forlenza, OV, Caramelli P. *Neuropsiquiatria geriátrica*. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 81-106.

Colciaghi F, Marcello E, Borroni B, Zimmermann M, Caltagirone C, Cattabeni F, Padovani A, Di Luca M. Platelet APP, ADAM 10 and BACE alterations in the early stages of Alzheimer disease. *Neurology*. 2004;10;62(3):498-501.

Colletier JP, Laganowsky A, Landau M, Zhao M, Soriaga AB, Goldschmidt L, Flotb D, Cascio D, Sawaya MR, Eisenberg D. Molecular basis for amyloid- β polymorphism. *PNAS*. 2011;108 (41),16938–16943.

Contestabile A. The history of the cholinergic hypothesis. *Behav Brain Res*. 2011; 221(2):334-40.

Côrrea NM. Placas senis, Peptídeo beta-amilóide e a Doença de Alzheimer. *Química Alzheimer*. Disponível em: <<http://anatpat.unicamp.br/bineualzheimer.html>>. Acesso em: março/2015.

Coulson DT, Beyer N, Quinn JG, Brockbank S, Hellemans J, Irvine GB, Ravid R, Johnston JA. BACE1 mRNA expression in Alzheimer's disease postmortem brain tissue. *J Alzheimers Dis*. 2010;22(4):1111-22.

Cummings JL, Geldmacher D, Farlow M, Sabbagh M, Christensen D, Betz P. High-dose donepezil (23 mg/day) for the treatment of moderate and severe Alzheimer's disease: drug profile and clinical guidelines [Review]. *CNS Neurosci Ther*. 2013;19(5):294-301.

Cummings JL, Vinters HV, Cole GM. Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. *Neurol*. 1998;(51):(1 Suppl 1),S2-17.

Davies P, Maloney AJF. Selective loss of central cholinergic neurones in Alzheimer's disease. *Lancet*. 1976;2:1403.

de Sousa RT, Zanetti MV, Talib LL, Serpa MH, Chaim TM, Carvalho AF, Brunoni AR, Busatto GF, Gattaz WF, Machado-Vieira R. Lithium increases platelet serine-9

phosphorylated GSK-3 β levels in drug-free bipolar disorder during depressive episodes. *J. Psychiatr. Res.* 2015;62:78-83.

De Strooper B, Annaert W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci.* 2000;113:1857-1870.

De Strooper B, Iwatsubo T, Wolfe MS. Presenilins and γ -Secretase: Structure, Function, and Role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2(1): a006304.

De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F: Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 1998;391:387-390.

Delaby C, Gabelle A, Blum D, Schraen-Maschke S, Moulinier A, Boulanghien J, Séverac D, Buée L, Rème T, Lehmann S. Central Nervous System and Peripheral Inflammatory Processes in Alzheimer's Disease: Biomarker Profiling Approach. *Front. Neurol.* 2015;24;6:181.

Departament of Econimoc ans Social Affairs (UN). Revision of World Population Prospects. Disponível em: <<http://esa.un.org/unpd/wpp/>>. Acesso em 11/08/2015.

Di Luca M, Colciaghi F, Pastorino L, Borroni B, Padovani A, Cattabeni F. Platelets as a peripheral district were to study pathogenetic mechanisms of Alzheimer disease: the case of amyloid precursor protein. *European Journal of Pharmacology.* 2000;405:277-283.

Di Luca M, Grossi E, Borroni B, Zimmermann M, Marcello E, Colciaghi F, Gardoni F, Intraligi M, Padovani A, Buscema M. Artificial neural networks allow the use of simultaneous measurements of Alzheimer Disease markers for early detection of disease. *Journal of Translational Medicine.* 2005;3:30.

Di Luca M, Pastorino L, Bianchetti A, Perez J, Viagnolo LA, Lenzi GL, Trabucchi M, Cattebeni F, Padovani A. Differential level of platelet amyloid β precursor protein isoforms – an early marker for Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 1998;55:1195-1200.

Diniz BS, Talib LL, Joaquim HP, de Paula VR, Gattaz WF, Forlenza OV. Platelet GSK3B activity in patients with late-life depression: marker of depressive episode severity and cognitive impairment? *World J Biol Psychiatry.* 2011;12(3):216-22.

Dominguez D, Tournoy J, Hartmann D, Huth T, Cryns K, Deforce S, Serneels L, Camacho IE, Marjaux E, Craessaerts K, Roebroek AJ, Schwake M, D'Hooge R, Bach P, Kalinke U, Moechars D, Alzheimer C, Reiss K, Saftig P, De Strooper B. Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *J Biol Chem.* 2005;280(35):30797-806.

Dugan JM, DeWit C, McConlogue L, Maltese WA. The Ras-related GTP-binding protein, Rab1B, regulates early steps in exocytic transport and processing of beta-amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 1995;270(18):10982–10989.

Dursun E, Gezen-Ak D, Hanağası H, Bilgiç B, Lohmann E, Ertan S, Atasoy İL, Alaylıoğlu M, Araz ÖS, Önal B, Gündüz A, Apaydın H, Kızıltan G, Ulutin T, Gürvit H, Yılmaz S. The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease. *J Neuroimmunol.* 2015;283:50-7.

Eaton SL, Roche SL, Llaverro Hurtado M, et al. Total Protein Analysis as a Reliable Loading Control for Quantitative Fluorescent Western Blotting. Kahle PJ. *PLoS ONE.* 2013;8(8):e72457.

Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol.* 2003;6;160(1):113-23.

Engelhardt E, Gomes MM. Alzheimer's 100th anniversary of death and his contribution to a better understanding of Senile dementia (O 100º aniversário de morte de Alzheimer e sua contribuição para uma melhor compreensão da Demência senil). *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 2015;73(2).

Evin G, Li QX. Platelets and Alzheimer's disease: Potential of APP as a biomarker. *World J Psychiatry.* 2012;22:2(6):102-13.

Ewers M, Cheng X, Zhong Z, Nural HF, Walsh C, Meindl T, Teipel SJ, Buerger K, He P, Shen Y, Hampel H. Increased CSF-BACE1 activity associated with decreased hippocampus volume in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2011;25(2):373-81.

Faria MC, Gonçalves GS, Rocha NP, Moraes EN, Bicalho MA, Gualberto Cintra MT, Jardim de Paula J, José Ravic de Miranda LF, Clayton de Souza Ferreira A, Teixeira AL, Gomes KB, Carvalho Md, Sousa LP. Increased plasma levels of BDNF and inflammatory markers in Alzheimer's disease. *J. Psychiatr. Res.* 2014;53:166-72.

Fleck D, Garratt AN, Haass C, Willem M. BACE1 dependent neuregulin processing: review. *Curr Alzheimer Res.* 2012;9(2):178-83.

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975;12(3):189-198.

Forlenza OV, Torres CA, Talib LL, de Paula VJ, Joaquim HP, Diniz BS, Gattaz WF. Increased platelet GSK3B activity in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res.* 2011;45(2):220-4.

Frota NAF, Nitrini R, Damasceno BP, Forlenza O, Dias-Tosta E, Silva AB, Herrera Junior E, Magaldi RM. Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer. *Dement Neuropsychol.* 2011;5(Suppl 1):5-10.

Fuentealba RA, Farias G, Scheu J, Bronfman M, Marzolo MP, Inestrosa NC. Signal transduction during amyloid β peptide neurotoxicity: Role in Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews.* 2004;47:275-289.

Gakhar-Koppole N, Hundeshagen P, Mandl C, Weyer SW, Allinquant B, Müller U, Ciccolini F. Activity requires soluble amyloid precursor protein alpha to promote neurite outgrowth in neural stem cell-derived neurons via activation of the MAPK pathway. *Eur J Neurosci.* 2008;28(5):871-82.

García T, Jay D. Fosforilación de tau y enfermedad de Alzheimer. *Gaceta médica de México.* 2004;140(3), 329-333.

García-Ayllón MS, Campanari ML, Brinkmalm G, Rábano A, Alom J, Saura CA, Andreasen N, Blennow K, Sáez-Valero J. CSF Presenilin-1 complexes are increased in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2013;6;1:46.

Gardella JE, Ghiso J, Gorgone GA, Marratta D, Kaplan AP, Frangione B, Gorevic PD. Intact Alzheimer amyloid precursor protein (APP) is present in platelet membranes and is encoded by platelet mRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;31;173(3):1292-8.

Garratt AN, Britsch S, Birchmeier C. Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell. *Bioessays.* 2000;22(11):987-96.

Gattaz WF, Cairns NJ, Levy R, Förstl H, Braus DF, Maras A. Decreased phospholipase A2 activity in the brain and in platelets of patients with Alzheimer's disease. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 1996;246(3):129-31.

Gattaz WF, Talib LL, Schaeffer EL, Diniz BS, Forlenza OV. Low platelet iPLA₂ activity predicts conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease: a 4-year follow-up study. *J Neural Transm.* 2014;121(2):193-200.

Gauthier S, Molinuevo JL. Benefits of combined cholinesterase inhibitor and memantine treatment in moderate–severe Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2013;9(3):326-31.

Giacobini E, Zhu X D, Williams E, Sherman KA. The effect of the selective reversible acetylcholinesterase inhibitor E2020 on extracellular acetylcholine and biogenic amine levels in rat cortex. *Neuropharmacology.* 1996;35(2):205-11

Giau VV, Bagyinszky E, An SS, Kim SY. Role of apolipoprotein E in neurodegenerative diseases. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2015;16(11):1723-37.

Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gajdusek DC. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science.* 1987;235(4791):877-80.

Goutte C, Tsunozaki M, Hale VA, Priess JR. APh-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(2):775-9.

Gowert NS, Donner L, Chatterjee M, Eisele YS, Towhid ST, Münzer P, Walker B, Ogorek I, Borst O, Grandoch M, Schaller M, Fischer JW, Gawaz M, Weggen

S, Lang F, Jucker M, Elvers M. Blood platelets in the progression of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2014;9(2):e90523.

Grüninger-Leitch F, Berndt P, Langen H, Nelboeck P, Döbeli H. Identification of beta-secretase-like activity using a mass spectrometry-based assay system. *Nat Biotechnol*. 2000 Jan;18(1):66-70.

Haass C. Take five-Bace and the γ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid β -peptide generation. *The EMBO Journal*. 2004;23(3):483-488.

Holmsen H. Signal transducing mechanisms in platelets. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China. B*. 1991;15(3):147-52.

Hooper NM, Turner AJ. The search for alpha-secretase and its potential as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Curr Med Chem*. 2002;9(11):1107-19.

Hu X, Hicks CW, He W, Wong P, Macklin WB, Trapp BD, Yan R. Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci*. 2006;9:1520–1525.

Hu X, Hu J, Dai L, Trapp B, Yan R. Axonal and Schwann cell BACE1 is equally required for remyelination of peripheral nerves. *J Neurosci*. 2015;4;35(9):3806-14.

Hung AY, Haass C, Nitsch RM, Qiu WQ, Citron M, Wurtman RJ, Growdon JH, Selkoe DJ. Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein. *J Biol Chem*. 1993 Nov 5;268(31):22959-62.

Huovila APJ, Turner AJ, Peltö-Huikko M, Kärkkäinen L, Ortiz RM. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends biochem. Sci*. 2005;30(7):413-22.

Hye A, Riddoch-Contreras J, Baird AL, Ashton NJ, Bazenet C, Leung R, et al. Plasma proteins predict conversion to dementia from prodromal disease. *Alzheimers Dement*. 2014;10(6):799-807.e2.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Projeção da população do Brasil e das Unidades da Federação. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>>.[Acesso em 11/08/2015].

Inekci D, Henriksen K, Linemann T, Karsdal MA, Habib A, Bisgaard C, Eriksen FB, Vilholm OJ [Abstract]. Serum fragments of Tau for the differential diagnosis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2015. [Epub ahead of print].

Ismail MF, Elmeshad AN, Salem NA. Potential therapeutic effect of nanobased formulation of rivastigmine on rat model of Alzheimer's disease. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:393-406.

Ittner LM, Gotz J. Amyloid-beta and tau – a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci*. 2011;12, 65–72.

Iwatsubo T. The gamma-secretase complex: machinery for intramembrane proteolysis. *Curr Opin Neurobiol.* 2004;14(3):379-83.

Jann MW, Shirley KL, Small GW. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of cholinesterase inhibitors [Review]. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(10):719-39.

Joaquim HP, Talib LL, Forlenza OV, Diniz BS, Gattaz WF. Long-term sertraline treatment increases expression and decreases phosphorylation of glycogen synthase kinase-3B in platelets of patients with late-life major depression. *J Psychiatr Res.* 2012;46(8):1053-8.

Joseph JA, Cutler R, Roth GS. Changes in G protein-mediated signal transduction in aging and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;695:42–45

Kamal A, Almenar-Queralt A, LeBlanc JF, Roberts EA, Goldstein LS. Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* 2001;414:643–648.

Kawashima K, Sato A, Yoshizawa M, Fujii T, Fujimoto K, Suzuki T. Effects of the centrally acting cholinesterase inhibitors tetrahydroaminoacridine and E2020 on the basal concentration of extracellular acetylcholine in the hippocampus of freely moving rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1994;350(5):523-8.

Kim DK, Seo MY, Lim SW, Kim S, Kim JW, Carroll BJ, Kwon DY, Kwon T, Kang SS. Serum melanotransferrin, p97 as a biochemical marker of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology.* 2001;25(1):84-90.

Kniewallner KM, Ehrlich D, Kiefer A, Marksteiner J, Humpel C. Platelets in the Alzheimer's disease brain: do they play a role in cerebral amyloid angiopathy? *Curr Neurovasc Res.* 2015;12(1):4-14.

Ko CY, Zhu M, Gurinovich O, Li F, Zhang RJ, Zhong J, Rakhmanova V. FRET-Based Assays for the Detection of Amyloid Degrading Protease Activity. AnaSpec, EGT Group, 34801 Campus Dr. Fremont, CA 94555, USA. Disponível em: https://www.anaspec.com/servePdf.asp?f=c_publications50.

Koç ER, Uzar E, Çirak Y, Parlak Demir Y, İlhan A. The increase of mean platelet volume in patients with Alzheimer disease [Abstract]. *Turk J Med Sci.* 2014;44(6):1060-6.

Kua EH, Ho E, Tan HH, Tsoi C, Thng C, Mahendran R. The natural history of dementia. *Psychogeriatrics.* 2014;14(3):196-201.

Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods.* San Diego. v.38, p.283-293, 2006.

Laferla FM. Calcium Dyshomeostasis And Intracellular Signalling In Alzheimer's Disease. *Nature.*2002;(3):862-872.

Lammich S, Kojro E, Portina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F. Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999;96:3922-3927.

LeBlanc AC, Gambetti P. Production of Alzheimer 4kDa beta-amyloid peptide requires the C-terminal cytosolic domain of the amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;15;204(3):1371-80.

Lee KS, Chung JH, Choi TK, Suh SY, Oh BH, Hong CH. Peripheral cytokines and chemokines in Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2009;28(4):281-7.

Lemke G. Neuregulin-1 and myelination. *Sci STKE.* 2006;7;2006(325):pe11.

Leszek J, Barreto GE, Gąsiorowski K, Koutsouraki E, Ávila-Rodrigues M, Aliev G. Inflammatory Mechanisms and Oxidative Stress as Key Factors Responsible for Progression of Neurodegeneration: Role of Brain Innate Immune System [Abstract]. *CNS. Neurol. Disord. Drug. Targets.* 2016;15(3):329-36.

Li Q, Chen M, Liu H, Yang L, Yang G. Expression of APP, BACE1, AChE and ChAT in an AD model in rats and the effect of donepezil hydrochloride treatment. *Mol Med Rep.* 2012;6(6):1450-4.

Li Q, Wu D, Zhang L, Zhang Y. Effects of galantamine on β -amyloid release and beta-site cleaving enzyme 1 expression in differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Exp Gerontol.* 2010;45(11):842-7.

Li QX, Evin G, Small DH, Multhaup G, Beyreuther K, Masters CL. Proteolytic processing of Alzheimer's disease beta A4 amyloid precursor protein in human platelets. *J Biol Chem.* 1995;270(23):14140-7.

Lichtenthaler SF. Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J Neurochem.* 2011;116:10-21.

Liu L, Zhang K, Tan L, Chen YH, Cao YP. Alterations in cholesterol and ganglioside GM1 content of lipid rafts in platelets from patients with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord [Abstract].* 2015;29(1):63-9.

Löffler J, Huber G. Beta-amyloid precursor protein isoforms in various rat brain regions and during brain development. *J. Neurochem.* 1992;59, 1316–1324.

Lovestone S. Muscarinic therapies in Alzheimer's disease; from palliative treatments to disease modification. *Int J Psychiatry Clin Pract.* 1997;1(1):15-20.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin-phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 1951;193:265-275.

Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R. Mice

deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci.* 2001;4:231–232.

Maltese WA, Sheridan KM, Repko EM, Erdman RA. Post-translational modification of low molecular mass GTP-binding proteins by isoprenoid. *J. Biol. Chem.* 1990; 265(4):2148-55.

Manzine PR, Barham EJ, Vale FA, Selistre-de-Araújo HS, Pavarini SC, Cominetti MR. Platelet α disintegrin and metalloproteinase 10 expression correlates with clock drawing test scores in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2014;29(4):414-20.

Massoud F, Gauthier S. Update on the pharmacological treatment of Alzheimer's disease. *Curr Neuropsychopharmacol.* 2010;8(1):69-80.

Mattson MP, Chan SL. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium.* 2003;34(4-5):385-97.

Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nat.* 2004;v. 430(7000), p.631-9.

Mattsson N, Andreasson U, Persson S, Arai H, Batish SD, Bernardini S, et al. The Alzheimer's Association external quality control program for cerebrospinal fluid biomarkers. *Alzheimers Dement.* 2011 Jul;7(4):386-395.e6.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology.* 1984;34(7):939-44.

Michalski B, Corrada MM, Kawas CH, Fahnestock M. Brain-derived neurotrophic factor and TrkB expression in the "oldest-old," the 90+ Study: correlation with cognitive status and levels of soluble amyloid-beta. *Neurobiol Aging.* 2015 Dec;36(12):3130-9.

Mihara M, Ohnishi A, Tomono Y, Hasegawa J, Shimamura Y, Yamazaki K, Morishita N. Pharmacokinetics of E2020, a new compound for Alzheimer's disease, in healthy male volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* 1993;31(5):223-9.

Mowrer KR, Wolfe MS. Promotion of BACE1 mRNA alternative splicing reduces amyloid beta-peptide production. *J Biol Chem* 2008; 283(27):18694-701.

Multhaup G, Huber O, Buée L, Galas MC. Amyloid Precursor Protein (APP) Metabolites APP Intracellular Fragment (AICD), A β 42, and Tau in Nuclear Roles. *J Biol Chem.* 2015;290(39):23515-22.

Nascimento CM, Pereira JR, de Andrade LP, Garuffi M, Talib LL, Forlenza OV, Cancela JM, Cominetti MR, Stella F. Physical exercise in MCI elderly promotes reduction of pro-inflammatory cytokines and improvements on cognition and BDNF peripheral levels [Abstract]. *Curr. Alzheimer Res.* 2014;11(8):799-805.

Neumann K, Farías G, Slachevsky A, Perez P, Maccioni RB. Human platelets tau: a potential peripheral marker for Alzheimer's disease [Abstract]. *J Alzheimers Dis.* 2011;25(1):103-9.

Nicolas M, Hassan BA. Amyloid precursor protein and neural development. *Development.* 2014;141(13):2543-8.

Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature.* 1984;19-25;308(5961):693-8.

Nitrini R, Caramelli P, Bottino CMC, Damasceno BP, Brucki SMD, Anghinah R. Diagnóstico de Doença De Alzheimer no Brasil /Critérios Diagnósticos e Exames Complementares. *Arq Neuropsiquiatr* 2005;63(3-A):713-719.

Nordberg A. Mechanisms behind the neuroprotective actions of cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease [Review]. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2006;20(2 Suppl 1):S12-8.

Oh ES, Marano CM, Leoutsakos JM, Lee RW, Rissman RA, Smith GS, Craft S, Lyketsos CG. Oral glucose tolerance testing to modulate plasma amyloid levels: A novel biomarker [Abstract]. *Alzheimers Dement (Amst).* 2015;1(3):311-315.

Ohno M, Cole SL, Yasvoina M, Zhao J, Citron M, Berry R, Disterhoft JF, Vassar R. BACE1 gene deletion prevents neuron loss and memory deficits in 5XFAD APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Dis.* 2007;26:134-145.

Ohno M, Sametsky EA, Younkin LH, Oakley H, Younkin SG, Citron M, Vassar R, Disterhoft JF. BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron.* 2004;41:27–33.

Oltersdorf T, Ward PJ, Henricksson T, Beattie EC, Neve IL, Lieberburg I, Fritz LC. The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. *J. Biol. Chem.* 1990;265:4492–4497.

Ott MO, Bullock SL. A gene trap insertion reveals that amyloid precursor protein expression is a very early event in murine embryogenesis. *Dev. Genes Evol.* 2001;211, 355–357.

Padovani A, Borroni B, Colciaghi F, Pastorino L, Archetti S, Cottini E, Caimi L, Cattabeni F, Di Luca M. Platelet amyloid precursor protein forms in AD: a peripheral diagnostic tool and a pharmacological target. *Mech Ageing Dev.* 2001;122(16):1997-2004.

Pakaski M, Kasa P. Role of acetylcholinesterase inhibitors in the metabolism of amyloid precursor protein. *Curr. Drug Target CNS Neurol. Disord.* 2003;3,163– 171.

Palmer K, Lupo F, Perri R, Salamone G, Fadda L, Caltagirone C, Musicco M, Cravello L. Predicting Disease Progression in Alzheimer's Disease: The Role of Neuropsychiatric Syndromes on Functional and Cognitive Decline. *J Alzheimers Dis.* 2011;24(1):35-45.

Parsons CG, Danysz W, Dekundy A, Pulte I. Memantine and cholinesterase inhibitors: complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurotox Res.* 2013;24(3):358-69.

Passaro A, Dalla Nora E, Morieri ML, Soavi C, Sanz JM, Zurlo A, Fellin R, Zuliani G. Brain-derived neurotrophic factor plasma levels: relationship with dementia and diabetes in the elderly population. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2015;70(3):294-302.

Perry E, Walker M, Grace J, Perry R. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci.* 1999; 22:273–280.

Perry EK, Gibson PH, Blessed G, Perry RH, Tomlinson BE. Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J Neurol Sci.* 1977; 34:247–65.

Pimplikar SW, Ghosal K. Amyloid precursor protein: more than just neurodegeneration. *Stem Cell Res Ther.* 2011;14;2(5):39.

Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* 2006;26, 7212–7221.

Primakoff P, Myles D G. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet.* 2000;16(2):83-7.

Prvulovic D, Schneider B. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of donepezil for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2014;10(7):1039-50.

Racaniello V. Virology toolbox: the western blot. *Virology Blog.* 2010. Disponível em: <<http://www.virology.ws/2010/07/07/virology-toolbox-the-western-blot/>>. Acesso em 12/02/2014.

Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and Biomarkers. *Biochem Pharmacol.* 2014.15;88(4):640-51.

Repetto MG, Reides CG, Evelson P, Kohan S, de Lustig ES, Llesuy SF. Peripheral markers of oxidative stress in probable Alzheimer patients. *Eur J Clin Invest.* 1999;29(7):643-9.

Rodgers AB. Alzheimer's Disease. National Institutes of Health, Unraveling the Mystery. 2008, 08-3782.

Rogers SL, Friedhoff LT. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of donepezil HCl following single oral doses. *Br J Clin Pharmacol.* 1998; 46(Suppl 1): 1–6.

Roher AE, Baudry J, ChaNey MO, Kuo YM, Stine WB, Emmerling MR. Oligomerization and fibril assembly of the amyloid-beta protein. *Biochim Biophys Acta*. 2000;26:1502(1):31-43.

Rojo LE, Fernandez JA, Maccioni AA, Jimenez JM, Maccioni RB: Neuroinflammation: implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Med Res*. 2008;39:1–16.

Rosenberg RN, Baskin F, Fosmire JA, Risser R, Adams P, Svetlik D, Honig LS, Cullum CM, Weiner MF. Altered amyloid protein processing in platelets of patients with Alzheimer disease [Abstract]. *Arch Neurol*. 1997;54(2):139-44.

Roth M, Tym E., Mountjoy CO, Huppert FA, Hendrie H, Verma S, Goddard R. CAMDEX: a standardized instrument for the diagnosis of mental disorders in the elderly with special reference to the early detection of dementia. *Br J Psychiatry* 1986; 149: 698-709.

Sarasa M, Sorribas V, Terradoa J, Climent S, Palacios JM, Mengod G. Alzheimer beta-amyloid precursor proteins display specific patterns of expression during embryogenesis. *Mech. Dev*. 2000;94, 233–236.

Sathya M, Premkumar P, Karthick C, Moorthi P, Jayachandran KS, Anusuyadevi M. BACE1 in Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta*. 2012;24;414:171-8.

Saura CA, Chen G, Malkani S, Choi SY, Takahashi RH, Zhang D, Gouras GK, Kirkwood A, Morris RG, Shen J. Conditional inactivation of presenilin 1 prevents amyloid accumulation and temporarily rescues contextual and spatial working memory impairments in amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci*. 2005;25(29):6755–6764,

SCB (Statistiska centralbyrån, Sverige [Statistics Sweden]: Life tables 2008–2012. http://www.scb.se/Pages/ProductTables_25809.aspx, 2013 apud Wattmo C, Londos E, Minthon L. Risk Factors That Affect Life Expectancy in Alzheimer's Disease: A 15-Year Follow-Up. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord*. 2014;38:286–299.

Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME, et al. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science*. 1992; 23;258(5082):668-71.

Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev*. 2003;17:7-30.

Selkoe D. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev*. 2001;81(2):741-766.

Selkoe DJ, Schenk D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 2003;(43):545-584.

Selkoe DJ. American College of Physicians; American Physiological Society. Alzheimer disease: Mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann Intern. Med.* 2004;20:140(8):627-38. Review.

Seltzer B. Donepezil: a review. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2005;1(3):527-36.

Shea YF, Chu LW, Chan AO, Ha J, Li Y, Song YQ. A systematic review of familial Alzheimer's disease: Differences in presentation of clinical features among three mutated genes and potential ethnic differences. *J. Formos. Med. Assoc.* 2016;115(2):67-75.

Siebers RW, Wakem PJ, Carter JM. Long-term intra-individual variation of platelet parameters [Abstract]. *Med Lab Sci.* 1989; 46 (1): 77-8.

Silveyra MX, García-Ayllón MS, Serra-Basante C, Mazzoni V, García-Gutierrez MS, Manzanares J, Culvenor JG, Sáez-Valero J. Changes in acetylcholinesterase expression are associated with altered presenilin-1 levels. *Neurobiol Aging.* 2012;33(3):627.e27-37.

Simon R, Girod M, Fonbonne C, Salvador A, Clément Y, Lantéri P, Amouyel P, Lambert JC, Lemoine J. Total ApoE and ApoE4 isoform assays in an Alzheimer's disease case-control study by targeted mass spectrometry (n=669): a pilot assay for methionine-containing proteotypic peptides. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11(11):1389-403.

Sisodia SS, Koo EH, Hoffman PN, Perry G, Price DL. Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J Neurosci.* 1993;13(7):3136-42.

Sodero ACR, De Simone SG, Silva-Jr FP. Mecanismo catalítico e estado de protonação do sítio ativo de aspartil proteases pepsina-símiles. *Rev. Virtual Quim.* 2009;1(2):128-137.

St. George-Hyslop PH, Westaway DA. Alzheimer's disease: Antibody clears senile plaques. *Nature.* 1999;(400):116-17.

Stockley JH, O'Neill C. Understanding BACE1: essential protease for amyloid-beta production in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Oct;65(20):3265-89.

Sugimoto H, Ogura H, Arai Y, Limura Y, Yamanishi Y. Research and development of donepezil hydrochloride, a new type of acetylcholinesterase inhibitor [Review]. *Jpn J Pharmacol.* 2002;89(1):7-20.

Sultana R, Baglioni M, Cecchetti R, Cai J, Klein JB, Bastiani P, Ruggiero C, Mecocci P, Butterfield DA. Lymphocyte mitochondria: toward identification of peripheral biomarkers in the progression of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:595-606.

Talib LL, Hototian SR, Joaquim HP, Forlenza OV, Gattaz WF. Increased iPLA2 activity and levels of phosphorylated GSK3B in platelets are associated with

donepezil treatment in Alzheimer's disease patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2015;265(8):701-6.

Talib LL, Valente KD, Vincentiis S, Gattaz WF. Correlation between platelet and brain PLA(2) activity. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty. Acids.* 2013;89(4):265-8.

Tan Y, Zhang Q, Wong SG, Hua Q. Anti-Alzheimer Therapeutic Drugs Targeting γ -Secretase. *Curr Top Med Chem.* 2016;16(5):549-57.

Tanahashi H, Tabira T. Three novel alternatively spliced isoforms of the human beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE) and their effect on amyloid beta-peptide production. *Neurosci Lett* 2001; 307(1):9-12.

Tang K, Hynan LS, Baskin F, Rosenberg RN. Platelet amyloid precursor protein processing: A bio-marker for Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 2006;240(1-2):53-58.

Tanzi R, Bertram L. New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron.* 2001;32(2):181-184.

Tariot PN, Farlow MR, Grossberg GT, Graham SM, McDonald S, Gergel I, Memantine Study Group. Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2004;291:317–24.

Terry AV Jr, Buccafusco JJ. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;306:821–827.

Thathiah A, De Strooper B. G protein-coupled receptors, cholinergic dysfunction, and Abeta toxicity in Alzheimer's disease. *Sci Signal.* 2009; 20;2(93):re8.

Thinakaran G, Borchelt DR, Lee MK, Slunt HH, Spitzer L, Kim G, Ratovitsky T, Davenport F, Nordstedt C, Seeger M et al. Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron.* 1996;17:181-190.

Tiseo PJ, Perdomo CA, Friedhoff. Metabolism and elimination of ¹⁴C-donepezil in healthy volunteers: a single-dose study. *Br J Clin Pharmacol.* 1998; 46(Suppl 1):19–24.

Uniprot Consortium. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/P05067>> [Acesso em 28/10/2014].

Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999; 286(5440):735-41.

Vassar R, Kovacs DM, Yan R, Wong PC. The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J Neurosci*. 2009; 14;29(41):12787-94.

Veitinger M1, Umlauf E, Baumgartner R, Badrnya S, Porter J, Lamont J, Gerner C, Gruber CW, Oehler R, Zellner M. A combined proteomic and genetic analysis of the highly variable platelet proteome: from plasmatic proteins and SNPs. *J Proteomics*. 2012; 22;75(18):5848-60.

Veitinger M, Varga B, Guterres SB, Zellner M. Platelets, a reliable source for peripheral Alzheimer's disease biomarkers? *Acta Neuropathol Commun*. 2014;16;2:65.

Venâncio F. Tratamento do Mal de Alzheimer. 2008. Disponível em: <<http://neuromed87.blogspot.com.br/>>.

Vincent B, Checler F. α -Secretase in Alzheimer's disease and beyond: mechanistic, regulation and function in the shedding of membrane proteins. *Curr Alzheimer Res*. 2012 Feb;9(2):140-56.

Vingtdeux V, Marambaud P. Identification and biology of α -secretase. *J Neurochem*. 2012;120(1):34-45.

Walter J, Fluhner R, Hartung B, Willem M, Kaether C, Capell A, Lammich S, Multhaup G, Haass C. Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J Biol Chem*. 2001;276(18):14634–41.

Wasco W, Gurubhagavatula S, Paradis MD, Romano DM, Sisodia SS, Hyman BT, Neve RL, Tanzi RE. Isolation and characterization of A β 2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet*. 1993;5(1):95-100.

Wattmo C, Londos E, Minthon L. Longitudinal Associations between Survival in Alzheimer's Disease and Cholinesterase Inhibitor Use, Progression, and CommunityBased Services. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord*. 2015;40:297–310.

Weidemann A, König G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*. 1989;57:115–126.

Willem M, Garratt AN, Novak B, Citron M, Kaufmann S, Rittger A, DeStrooper B, Saftig P, Birchmeier C, Haass C. Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science*. 2006.27;314(5799):664-6.

Wolf BA, Wertkin AM, Jolly YC, Yasuda RP, Wolfe BB, Konrad RJ, Manning D, Ravi S, Williamson JR, Lee VM. Muscarinic regulation of Alzheimer's disease amyloid precursor protein secretion and amyloid beta-protein production in human neuronal NT2N cells. *J Biol Chem*. 1995;3;270(9):4916-22.

Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ: Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and c-secretase activity. *Nature*. 1999;398:513-517..

Wu G, Sankaranarayanan S, Wong J, Tugusheva K, Michener MS, Shi X, Cook JJ, Simon AJ, Savage MJ. Characterization of plasma β -secretase (BACE1) activity and soluble amyloid precursor proteins as potential biomarkers for Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2012;90(12):2247-58.

Xu H, Finkelstein DI, Adlard PA. Interactions of metals and Apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 2014;6:21.

Ye CY, Lei Y, Tang XC, Zhang HY. Donepezil attenuates A β -associated mitochondrial dysfunction and reduces mitochondrial A β accumulation in vivo and in vitro. *Neuropharmacology*. 2015;95:29-36.

Yu J, Jia JP. Platelet function in patients with Alzheimer disease: analysis of 40 cases [Abstract]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2009;89(3):183-6.

Zainaghi IA, Forlenza OV, Gattaz WF. Abnormal APP processing in platelets of patients with Alzheimer's disease: correlations with membrane fluidity and cognitive decline. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007;192(4):547-53.

Zainaghi IA, Talib LL, Diniz BS, Gattaz WF, Forlenza OV. Reduced platelet amyloid precursor protein ratio (APP ratio) predicts conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 2012;119(7):815-9.

Zainaghi IA. Fosfolipase A2, fluidez de membrana e proteína precursora do amilóide em plaquetas na doença de Alzheimer e comprometimento cognitivo leve [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2006.

Zhang C, Wu B, Beglopoulos V, Wines-Samuelson M, Zhang D, Dragatsis I, Sudhof TC, Shen J. Presenilins are essential for regulating neurotransmitter release. *Nature*. 2009;460:632–636.

Zhang D, Zhang C, Ho A, Kirkwood A, Sudhof TC, Shen J. Inactivation of presenilins causes pre-synaptic impairment prior to postsynaptic dysfunction. *J. Neurochem*. 2010;115(5):1215–1221.

Zhang H, Sun S, Herreman A, De Strooper B, Bezprozvanny I. Role of presenilins in neuronal calcium homeostasis. *J Neurosci*. 2010;30(25):8566-8580.

Zhao J, O'Connor T, Vassar R. The contribution of activated astrocytes to A β production: Implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neuroinflammation*. 2011;2;8:150.

Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsinghji DJ, Hopkins R, Smith DW, Heavens RP, Dawson GR, Boyce S, Conner MW, Stevens KA, Slunt HH, Sisoda SS, Chen HY, Van der Ploeg LH. beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell*. 1995;19;81(4):525-31.

Zheng H, Koo EH. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener.* 2006; 3:1:5.

Zhou ZD, Chan CH, Ma QH, Xu XH, Xiao ZC, Tan EK. The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease. *Cell Adh Migr.* 2011;5(4):280-92.

Zimmermann M, Borroni B, Cattabeni F, Padovani A, Di Luca M. Cholinesterase inhibitors influence APP metabolism in Alzheimer disease patients. *Neurobiol Dis.* 2005;19(1-2):237-42.

APÊNDICE

Certificado obtido pela apresentação de pôster na Internacional
Alzheimer's Association International Conference 2014

<p>Alzheimer's Association International Conference July 12-17, 2014</p>
<p>POSTER PRESENTER</p>	
<p>This certifies that</p>	
<p>Tamires Alves</p>	
<p>presented poster number P4-031 titled</p>	
<p><i>Platelet APP Ratio in AD Patients Treated With Donepezil</i></p>	
<p>at the Alzheimer's Association International Conference (AAIC) on <i>Wednesday, July 16, 2014.</i></p>

<p>Edward Koo, MD Chair, AAIC Scientific Program Committee</p>	<p>Glenda Halliday, PhD Chair, AAIC Scientific Program Committee</p>
<p>Bella Center Copenhagen, Denmark</p>	

Publicação em anal de congresso: *Platelet APP ratio in AD patients treated with donepezil. Alzheimer's & Dementia, 2014 - Alzheimer's Association International Conference 2014*

Alzheimer's & Dementia

Volume 10, Issue 4, Supplement, July 2014, Pages P794

Alzheimer's Association International Conference 2014

Alzheimer's Association International Conference 2014

Platelet APP ratio in AD patients treated with donepezil

Tamires Alves Samo¹, Helena Passarelli Giroud Joaquim¹, Leda Leme Talib², Sergio Hototian³, Wagner Gattaz⁴, Orestes Vicente Forlenza³

[Show more](#)

doi:10.1016/j.jalz.2014.05.1545

[Get rights and content](#)

Background: The search for peripheral biomarkers of Alzheimer's disease (AD) has become a major focus of research. AD biomarkers are measurable correlates of core pathological markers of the disease, namely those related to intracerebral amyloidosis or its downstream effects within the brain. AD biomarkers can be used for diagnostic purposes, for the prediction of dementia in samples of at-risk individuals, and to monitor biological effects of treatments with antidementia drugs. Platelets are the main source of circulating APP and contain the enzymatic machinery required for its proteolytic metabolism. Studies demonstrated that platelet APP ratio (130/100 kDa sAPP) is altered in patients with AD, reflecting systemic changes in APP metabolism. In the present study, we address the modification of APP ratio in platelets from AD patients treated with donepezil for six months. The aim of this study was compare baseline APP ratio in platelets of patients with AD as compared to healthy controls, and to determine the effect of short- and long-term donepezil treatment on the expression of 130 and 110kDa sAPP peptides.

Methods: 18 non-medicated older adults with AD were included in this study. The comparison group comprised 37 age-matched, healthy individuals. The expression of APP was determined in platelets of patients and controls at baseline and after 3 and 6 months of donepezil treatment by western blotting using the 22C11 antibody.

Results: The 130/110kDa APP ratio was lower in patients compared to healthy controls ($p < 0.001$) at baseline. No differences were observed in APP ratio after donepezil treatment (preliminary analysis).

Conclusions: Our findings confirm that platelet APP ratio is reduced in AD, indicating that abnormalities affecting the APP metabolism can be detected in platelets drawn from peripheral blood. Our preliminary findings do not support the modification of this marker as a consequence of donepezil treatment.

Copyright © 2014 Published by Elsevier B.V.

Certificado obtido pela apresentação de pôster no 12th World Congress of Biological Psychiatry (WFSBP), Atenas- Grécia. “Donepezil decreases β -secretase BACE1 expression in platelets of Alzheimer Disease patients”.

12th World Congress of Biological Psychiatry 14 – 18 June 2015 • Athens, Greece
<p>Congress President Constantin R. Soldatos Athens University Medical School Mental Health Care Unit Evgenidion Hospital 5 Eginou Street 11528 Athens, Greece Phone: +30.210.725.05.44 Fax: +30.210.722.64.31 cgslelabath@hotmail.gr</p> <p>WFSBP Executive Committee WFSBP President Constantin R. Soldatos, Greece</p> <p>Vice President Tudor Ustricioiu, Romania</p> <p>Past President Florence Thibaut, France</p> <p>President Elect Masatoshi Takeda, Japan</p> <p>Secretary Lakshmi Yatham, Canada</p> <p>Vice Secretary Ladislav Hosak, Czech Republic</p> <p>Treasurer Martin Hatzinger, Switzerland</p> <p>Vice Treasurer Victoria Valdez, Ecuador</p> <p>Co-Chairs, International Scientific Programme Committee (ISPC) Florence Thibaut, France Peter Falkai, Germany Shigenobu Kanba, Japan Lakshmi Yatham, Canada</p> <p>Co-Chairs of the Local Organising Committee (LOC) Constantin R. Soldatos, Greece Nikos C. Stefanis, Greece</p>	<p style="text-align: center;">Certificate of Presentation</p> <p style="text-align: center;">We hereby confirm the following poster presentation at the:</p> <p style="text-align: center;">12th World Congress of Biological Psychiatry 14 - 18 June 2015, Athens, Greece</p> <p style="text-align: center;">Author: Tamires Alves Sarno Sao Paulo, Brazil</p> <p style="text-align: center;">Co-Authors: H. Passarelli Giroud Joaquim, L. Leme Talib, S. R. Hototian, W. Farid Gattaz, O. Vicente Forlenza</p> <p style="text-align: center;">Poster Presentation P-10-002: Donepezil decreases β-secretase BACE1 expression in platelets of Alzheimer disease patients</p> <p style="text-align: center;">Athens, 06/18/2015</p> <p style="text-align: center;">On behalf of the Organiser CPO HANSER SERVICE</p> <p>Organiser: World Federation of Societies of Biological Psychiatry c/o Wartmann + Merker Fraumünsterstraße 29 8022 Zürich Switzerland</p>
<p>Congress and Exhibition Office CPO HANSER SERVICE CPO HANSER SERVICE Zum Ehrenrain 34 22885 Barsbüttel, Germany Phone: +49-40-670.882.0 Fax: +49-40-670.32.83 Email: wfsbp2013@cpo-hanser.de</p> <p>Organiser World Federation of Societies of Biological Psychiatry</p> <p>www.wfsbp.org</p>	

Certificado de palestra ministrada no X Congresso de Biomedicina da Baixada Santista 2015 - CBBS. "Busca por biomarcadores na doença de Alzheimer."

Modelo do termo de consentimento livre e esclarecido:

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-
HCFMUSP

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL **LEGAL**
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº
APTO: CIDADE:
BAIRRO:
CEP: TELEFONE: DDD
(.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: EFEITO DE INIBIDOR DA
ACETILCOLINESTERASE NO METABOLISMO DA PROTEÍNA PRECURSORA DO
AMILOIDE EM PLAQUETAS.

2. PESQUISADOR: Orestes Vicente Forlenza

CARGO/FUNÇÃO: Professor Associado do Departamento de Psiquiatria/ Psiquiatra

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 65.590

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto de Psiquiatria

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO (X)	RISCO MÉDIO ()
RISCO BAIXO ()	RISCO MAIOR ()

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Justificativa e objetivos da pesquisa – A busca de biomarcadores capazes de auxiliar no diagnóstico diferencial e na avaliação do prognóstico dos transtornos demenciais, sobretudo nas fases iniciais, é objetivo perseguido por inúmeros centros de pesquisa nos últimos anos. O presente estudo volta-se para o estudo destes biomarcadores e suas alterações em indivíduos portadores de doença de Alzheimer. O objetivo principal do projeto é comprovar alterações destes biomarcadores, nestes pacientes antes e após o início do tratamento com inibidores da colinesterase.

2 – Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais – Se você decidir participar, deverá ser preenchida uma ficha de histórico e avaliação clínica (psiquiátrica e cognitiva) e será feita uma coleta de 10-40 mL (equivalente a 3 colheres de sopa) de sangue por punção periférica da veia do antebraço. As amostras serão utilizadas para as determinações bioquímicas. Todo material será codificado de modo que a identidade dos participantes não seja revelada.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço.

4 – Desconfortos e riscos esperados – Os desconfortos e riscos esperados são mínimos e são decorrentes apenas do processo da coleta de sangue. Você poderá apresentar dor, desconforto ou hematoma quando o sangue for retirado.

5 – Benefícios que poderão ser obtidos – Não há benefício direto para o participante; trata-se de estudo experimental testando a existência de variantes bioquímicas associadas à depressão. É possível, mas não garantido, que os pacientes com este transtorno possam ser beneficiados pelos resultados deste estudo no futuro, bem como seus familiares. O estudo visa maior esclarecimento dos mecanismos biológicos responsáveis pelo aparecimento da depressão. De posse destes conhecimentos, espera-se conseguir, no futuro, melhores estratégias para o tratamento do referido transtorno.

6 – Garantia de acesso - em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr Orestes Vicente Forlenza que pode ser encontrado no endereço Rua Ovídio Pires de Campos, 785, São Paulo – SP. Telefone 3069-8010. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: capepesq@hc.fm.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

9 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **EFEITO DE INIBIDOR DA**

**ACETILCOLINESTERASE NO METABOLISMO DA PROTEÍNA PRECURSORA DO
AMILOIDE EM PLAQUETAS**

Eu discuti com o Dr. Orestes Vicente Forlenza sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

Aprovação do projeto de pesquisa frente ao Comitê de Ética

<p align="center">Hospital das Clínicas da FMUSP Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq</p>
<p align="center">PROJETO DE PESQUISA</p>	
<p>Título: EFEITO DE INIBIDOR DA COLINESTERASE NO METABOLISMO DA APP EM PLAQUETAS Pesquisador Responsável: Orestes Vicente Forlenza Pesquisador Executante: Tamires Alves Bizarra da Silva Finalidade Acadêmica: Mestrado Instituição: HCFMUSP Departamento: PSIQUIATRIA</p>	<p>Versão: 1 CAAE: 91198213.6.0000.0068</p>
<p align="center">PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</p>	
<p>Registro on-line: 11418 Número do Parecer: 679.408 Data da Relatoria: 04/06/2014 Apresentação do Projeto: Trata-se de projeto de mestrado intitulado "Efeito de Inibidor da colinesterase no metabolismo da APP em plaquetas" Objetivo da Pesquisa: A) Quantificar a expressão protéica dos fragmentos de 110 e 130 kDa da proteína precursora do amiloide (APP) e as suas secretases () em plaquetas de pacientes com doença de Alzheimer (DA) antes e após o tratamento com inibidor da colinesterase e compará-los com controles saudáveis; b) Verificar a atividade enzimática das APP-secretases () em plaquetas de pacientes com doença de Alzheimer (DA) antes e após o tratamento com inibidor da colinesterase e compará-los com controles saudáveis. Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os desconfortos e riscos esperados são mínimos e são decorrentes apenas do processo da coleta de sangue. Poderá apresentar dor, desconforto ou hematoma quando o sangue for retirado. Benefícios: É possível que os pacientes com este transtorno possam ser beneficiados pelos resultados deste estudo no futuro, bem como seus familiares. Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Trata-se de estudo prospectivo relacionado a mestrado. O estudo proposto apresenta introdução e objetivos claros e metodologia descrita satisfatoriamente. Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Adequados. Recomendações: Não há. Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não há. Situação do Parecer: Aprovado Necessita Apreciação da CONEP: Não Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.</p>	
<p align="right">São Paulo, 09 de Junho de 2014 Prof. Dr. Alfredo José Mansur Coordenador Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq</p>	
<p align="center">Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar CEP 05403-010 - São Paulo - SP. 55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 marcia.gayatho@hc.fm.usp.br</p>	