

Terapia génica na doença de Alzheimer: uma nova abordagem terapêutica *Gene therapy in Alzheimer's disease: a new therapeutic approach*

Carmona S.¹, Silva S.^{2,3}, Cruz M.T.^{2,4}

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é o distúrbio neurodegenerativo mais prevalente no mundo afetando cerca de 47 milhões de pessoas. É uma condição clínica caracterizada por perda de memória persistente e progressiva, défice cognitivo e mudança de personalidade. Na génese da doença existem, essencialmente, dois fatores responsáveis pelo aparecimento desta sintomatologia, as placas β -amilóides e os emaranhados neurofibrilares constituídos pela proteína tau. Todavia, estudos recentes demonstram que, para além destes dois *hallmarks* neuropatológicos, outras características patológicas poderão ser identificadas no cérebro dos doentes, tais como neuroinflamação, excitotoxicidade, stresse oxidativo e défice de alguns neurotransmissores. Estes processos, isoladamente ou em conjunto, conduzem a uma neurodegeneração grave observada na DA.

Apesar dos fortes investimentos em programas de desenvolvimento de medicamentos, a terapêutica disponível para o tratamento da DA permite apenas a melhoria dos sintomas não contribuindo para modificar o curso da doença. Por conseguinte, esta condição clínica continua a ser um enfoque científico mundial, dado que é imperativo a identificação de estratégias terapêuticas novas e eficazes. Devido à contínua investigação nesta área e aprofundamento do conhecimento referente aos mecanismos moleculares e celulares responsáveis pelo desenvolvimento da DA, a terapia génica tem sido investigada como uma potencial estratégia terapêutica.

A análise dos resultados de ensaios pré-clínicos e clínicos revela que a DA poderá ser uma das patologias a ter disponível na prática clínica um tratamento baseado em terapia génica. Desta forma, prevê-se uma alteração do paradigma terapêutico desta patologia e consequente melhoria da condição clínica e qualidade de vida dos doentes.

Palavras-chave: doença de Alzheimer, fisiopatologia, terapia génica, alvos moleculares.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent neurodegenerative disorder in the world affecting about 47 million people. It is a clinical condition characterized by persistent and progressive memory loss, cognitive impairment and personality change. In the genesis of the disease there are essentially two factors responsible for the appearance of this symptomatology, the β -amyloid plaques and the neurofibrillary tangles made up of the tau protein. However, recent studies show that in addition to these two neuropathological hallmarks, other pathological characteristics can be identified in the brains of patients, such as neuroinflammation, excitotoxicity, oxidative stress and a deficit of some neurotransmitters. These processes, alone or together, lead to the severe neurodegeneration seen in AD.

Despite heavy investments in drug development programs, the available therapies for the treatment of AD allow only the improvement of symptoms and do not contribute to modify the course of the disease. Therefore, this clinical condition remains a worldwide scientific focus as it is imperative to identify new and effective therapeutic strategies. Due to the continued research in this area and the deepening of knowledge regarding the molecular and cellular mechanisms responsible for the development of AD, gene therapy has been investigated as a potential therapeutic strategy.

Analysis of the results of pre-clinical and clinical trials reveals that AD may be one of the diseases for which gene therapy-based treatment will be available in clinical practice. Thus, a change in the therapeutic paradigm of this pathology is expected, with a consequent improvement in the clinical condition and quality of life of patients.

Keywords: Alzheimer's disease, pathophysiology, gene therapy, potential molecular targets.

¹ Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

² Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra (iCBR), Faculdade de Medicina de Coimbra, Coimbra, Portugal.

³ Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental & iCBR, Centro de Inovação em Biotecnologia e Biomedicina da Universidade de Coimbra, Portugal.

⁴ Centro de Neurociências e Biologia Celular, Centro de Inovação em Biotecnologia e Biomedicina da Universidade de Coimbra, Portugal.

Autora para correspondência: Maria Teresa Cruz; trosete@ff.uc.pt; +351 938 204 793. Faculdade de Farmácia – Universidade de Coimbra – Polo das Ciências da Saúde – 3000-548 Coimbra.

Submetido/Submitted: 23 agosto 2021 | Aceite/Accepted: 20 setembro 2021

INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência, a qual se caracteriza por perda de memória persistente e progressiva, défice cognitivo e mudança de humor¹. A demência é considerada uma grande ameaça às sociedades modernas em virtude do aumento da prevalência da doença e dos enormes custos associados aos cuidados de prestação de saúde². Além disso, os familiares assistem a uma decadência lenta dos seus entes queridos até estes serem incapazes de os reconhecer mais³. Embora, a causa da doença seja multifatorial, é fundamental destacar as duas principais marcas histopatológicas que caracterizam a doença de Alzheimer: a existência de placas β -amilóide no espaço extracelular e os emaranhados neurofibrilares, acumulados intracelularmente, constituídos pela proteína tau hiperfosforilada³. No entanto, outros sinais celulares e moleculares podem ser igualmente identificados no cérebro dos doentes, dando-se ênfase à neuroinflamação, excitotoxicidade, stresse oxidativo e défice de alguns neurotransmissores, nomeadamente a acetilcolina⁴. Estes processos, separadamente ou em conjunto, conduzem a uma neurodegeneração grave que origina os sintomas clínicos³.

Apesar de décadas de estudo a investigar os mecanismos moleculares e celulares da DA e do empenho considerável por parte da indústria farmacêutica, não existe, até hoje, nenhuma terapia eficaz para curar a DA ou para inibir significativamente a progressão dos seus sintomas¹. De facto, os medicamentos aprovados para o tratamento desta doença são limitados e, apenas incluem os inibidores da

acetilcolinoesterase (donepezilo, rivastigmina, galantamina) e os antagonistas dos recetores N-metil-d-Aspartato (NMDA) (memantina). Os fármacos anteriormente citados somente melhoram o comportamento, o estado cognitivo e o estado clínico geral dos doentes⁵. Todavia, a eficácia destes é bastante limitada e, por essa razão, é mandatório desenvolver estratégias terapêuticas mais eficazes que permitam um incremento da qualidade de vida e melhoria da condição clínica dos doentes que sofram desta patologia tão devastadora.

Assim, o objetivo principal desta dissertação é apresentar as potenciais abordagens, avaliadas em estudos pré-clínicos e clínicos, que possibilitaram a alteração dos níveis das proteínas responsáveis pela sobrevivência dos neurónios, inflamação, proteína β -amilóide, metabolismo da tau e metabolismo do colesterol através da terapia génica.

DOENÇA DE ALZHEIMER

Epidemiologia

À medida que a população envelhece, a incidência e a prevalência das doenças relacionadas com a idade aumentam, como é o caso da demência⁶. A doença de Alzheimer é a demência mais prevalente na sociedade, sendo responsável por 50 a 70% dos casos⁷. Sabe-se que a incidência da demência e a sua prevalência aumentam quase exponencialmente com a idade, duplicando a cada 5 anos após a sexta década de vida⁸. É de salientar que, uma em cada três pessoas com mais de 85 anos, padece desta patologia⁹.

Mundialmente, estima-se que 24 milhões de pessoas sofram de demência¹⁰. Como resultado do envelhecimento

da população e do aumento da esperança média de vida, é expectável que os números de casos tripliquem¹¹, prevendo-se que em 2050 se atinja o impressionante número de 130 milhões de pessoas com demência, dos quais 115 milhões com DA^{12,13}.

Relativamente a Portugal, prevê-se que a prevalência da doença na população portuguesa com idade igual ou superior a 60 anos seja de 5,91% com um número presumível de afetados superior a 160000 indivíduos⁸.

De facto, a doença de Alzheimer tem um impacto deletério nas capacidades dos doentes, dado que estes perdem a sua autonomia e se tornam dependentes de terceiros, particularmente numa fase mais avançada da doença. Por outro lado, provoca uma elevada carga pessoal, social e económica e, como tal deve ser encarada como um problema de saúde pública¹⁰.

Etiologia

A doença de Alzheimer é o tipo mais comum de demência⁶ e pode subdividir-se em dois grandes grupos: a familiar (FAD) e a esporádica (SAD)¹⁴.

A FAD é fruto de um gene dominante, possui um início precoce (<65 anos) e afeta 1-5% dos casos¹⁵. Tem sido mencionado que este tipo de DA está principalmente correlacionado com fatores genéticos que afetam o metabolismo da proteína β -amilóide. Atualmente, considera-se que poderão estar envolvidos três genes diferentes em pelo menos 50% dos casos de FAD, nomeadamente, o gene APP, o gene presenilina-1 (PSEN1) e presenilina-2 (PSEN2)¹⁴.

Por outro lado, a forma esporádica veri-

fica-se em 90-95% dos eventos e exhibe um início tardio (>65 anos)¹⁵. Contudo, neste caso, as causas subjacentes não são tão bem compreendidas¹⁶. É referido que 70% se deve a fatores genéticos e 30% a outros fatores de risco. Este inclui variantes não modificáveis como o envelhecimento, género, hormonas e variantes modificáveis como atividade física, padrões sociais, educação, saúde cardiovascular, obesidade, stresse entre outros^{17,18,19,20,21}. Além disso, a apolipoproteína E (ApoE) está fortemente associada à SAD¹⁶. A ApoE é uma proteína expressa no Homem que desempenha um papel vital na neuroinflamação e neuroplasticidade¹⁶. Esta proteína apresenta três alelos comuns, nomeadamente, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ ¹⁶. Contudo, pessoas que apresentam o alelo $\epsilon 4$ no locus da APOE têm um maior risco de vir a desenvolver esta patologia¹⁶. Importa reforçar que indivíduos com esta variante não terão necessariamente a doença, mas apenas um maior risco²². De salientar que os portadores heterozigotos da APOE $\epsilon 4$ são duas a três vezes mais predispostos a desenvolver a doença, ao passo que, os homozigotos têm um risco 10-15 vezes maior¹⁶.

Na realidade, foram já identificados mais de 20 genes responsáveis pelo desenvolvimento da DA em pessoas com mais de 65 anos²³. A maioria desses genes podem-se agrupar em vias específicas, tais como o processamento da proteína precursora amilóide (APP), a patologia da TAU, a resposta imunológica, a migração celular, a endocitose e o transporte lipídico. Todas estas vias desempenham um papel importante na etiologia da doença de Alzheimer com início tardio^{14,24}.

Fisiopatologia

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa altamente complexa, multifatorial e progressiva²⁴.

Como citado anteriormente, as principais marcas histopatológicas que caracterizam a patogénese da doença são a presença de placas senis extracelulares constituídas por agregados filamentosos da proteína β -amilóide ($A\beta$) e massas neurofibrilares intracelulares, compostas essencialmente pela proteína tau hiperfosforilada. Essas placas e massas presentes no cérebro dos doentes estão localizadas, sobretudo, no hipocampo, nas amígdalas cerebelosas e no córtex entorrinal do lóbulus temporal, enquanto as porções frontais e parietais do córtex associativo são menos afetadas²⁵. A figura 1 mostra as regiões do cérebro mais afetadas na DA.

Porém, outras características patológicas são igualmente observadas na DA. Como tal, podemos evidenciar o stresse oxidativo, a neuroinflamação, a neurotoxicidade, a deficiência e distribuição alterada das mitocôndrias e a neurodegeneração¹⁵.

Produção das placas β -amilóide

A APP é amplamente expressa nos mamíferos e apresenta-se como uma proteína transmembranar do tipo I²⁷. É constituída por um domínio N-terminal extracelular glicosilado, um domínio transmembranar e um pequeno domínio C-terminal intracelular²⁷. Embora, as funções fisiológicas que desempenha ainda não estejam totalmente esclarecidas, existe evidência de que auxilia a formação das sinapses, o crescimento dendrítico e axonal e, ainda a sobrevivência

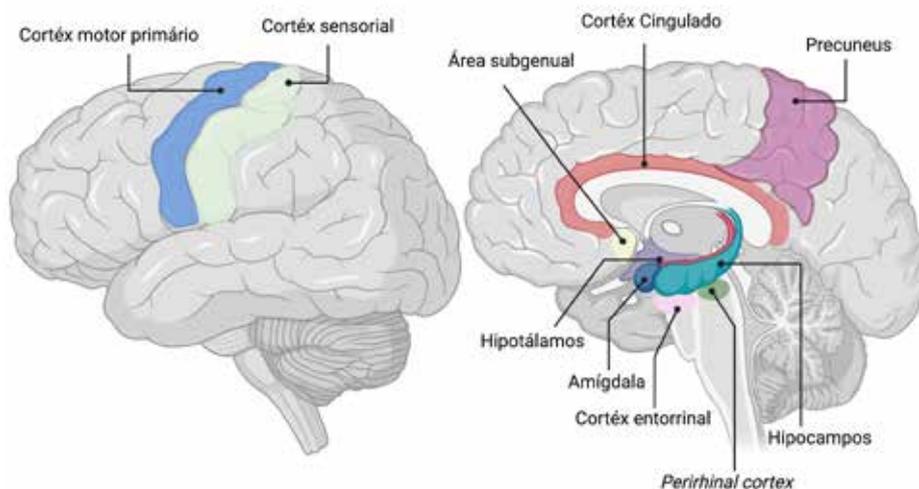


Figura 1: Principais regiões do cérebro afetadas na doença de Alzheimer. Re-impresso com algumas modificações de²⁶. [criado com www.BioRender.com]

neuronal²⁸.

Por ação de diferentes proteases¹⁶- a alfa (α), beta (β) e gama (γ) - a APP sofre processamento proteolítico. Como resultado são formados vários peptídeos que exibem diferentes potenciais de agregação e, conseqüentemente, diferentes níveis de toxicidade³⁰. De facto, a APP pode ser clivada mediante duas vias: via amiloidogénica e a via não-amiloidogénica (evidenciado na figura 2). Ambas competem para o processamento da APP³¹. A via não amiloidogénica é considerada a via secretora mais relevante para a maioria das células dado que, em condições fisiológicas, é responsável por 90-95% do processamento proteolítico da APP³¹. Contudo, no cérebro dos doentes com DA, pensa-se que poderá existir um desequilíbrio entre estas duas vias, sendo favorecida a produção dos peptídeos A β ³¹. Importa referir que em concentrações fisiológicas, os peptídeos A β apresentam um papel relevante na plasticidade sináptica a nível do hipocampo, na formação de sinapses, sendo a sua presença crucial para a formação e consolidação da memória³². Desta forma, os peptídeos A β podem exercer efeitos neurotóxicos ou neurotróficos em função da sua concentração³².

Via não amiloidogénica

Por esta via, a APP sofre uma clivagem constitutiva e regulada²⁸. Por ação de duas secretases, a α -secretase e a γ -secretase, a APP é clivada originando um pequeno fragmento hidrofóbico, p3, que é solúvel. Embora, as funções fisiológicas deste fragmento ainda não se encontrem verdadeiramente elucidadas, considera-se que assume um papel crucial na sinalização sináptica. Por outro

lado, o domínio intracelular da APP que resulta da atividade das duas enzimas supracitadas é libertado e translocado para o núcleo, sendo responsável por regular a expressão génica e facilitar a sinalização intracelular^{28,33}.

Em contrapartida, a APP pode apenas sofrer ação da α -secretase e, nesse caso, há a produção de um outro precursor solúvel e não patogénico que é o s-APP- α . Este fragmento desempenha diversas funções cruciais, tais como a sinalização e plasticidade sináptica normal, aprendizagem, memória, comportamento emocional e sobrevivência neuronal^{28,33}.

Via amiloidogénica

Por esta via, a APP é segmentada de forma diferente culminando com a formação do peptídeo A β , composto por 39-42 aminoácidos¹⁵. Neste caso, por ação da β -secretase há a formação do fragmento C99 que, por sua vez é clivado pela γ -secretase, nas posições 40 e 42, para produzir os monómeros A β 1-40 e A β 1-42¹⁶. Embora, o primeiro fragmento seja o mais comum, atualmente considera-se que o segundo, mais hidrofóbico, apresenta um maior potencial amiloidogénico. Porém, ambos são capazes de se agregar originando oligómeros e, subseqüentemente as placas β -amilóide insolúveis implicadas na degeneração neuronal e declínio cognitivo. É por isso imperativo a rápida remoção deste peptídeo A β ¹⁵.

De facto, à medida que os peptídeos A β são formados, estes são removidos continuamente para a periferia, de forma a manter um equilíbrio entre os diferentes compartimentos celulares. A eliminação do A β no cérebro depende de vários pro-

cessos que ocorrem em simultâneo: a sua degradação proteolítica por diversas proteases tais como a neprilisina³⁴, as enzimas conversoras da endotelina do tipo 1 e 2³⁵, a enzima que degrada a insulina³⁶ a enzima conversora da angiotensina³⁷ as metaloproteínases da matriz do tipo 2 e 9 e a catepsina B³⁸ a sua depuração passiva mediada por células; e o seu transporte ativo através da barreira hematoencefálica³⁹.

Formação dos emaranhados neurofibrilares

A formação destes emaranhados é explicada pela hiperfosforilação da proteína tau⁴⁰ tal como é ilustrado na figura 3. A tau é uma proteína essencial à formação e estabilização dos microtúbulos do citoesqueleto dos neurónios¹⁶.

Quando a proteína tau entra em contacto com as cinases é fosforilada. Como resultado desta hiperfosforilação, a proteína tau dissocia-se dos microtúbu-

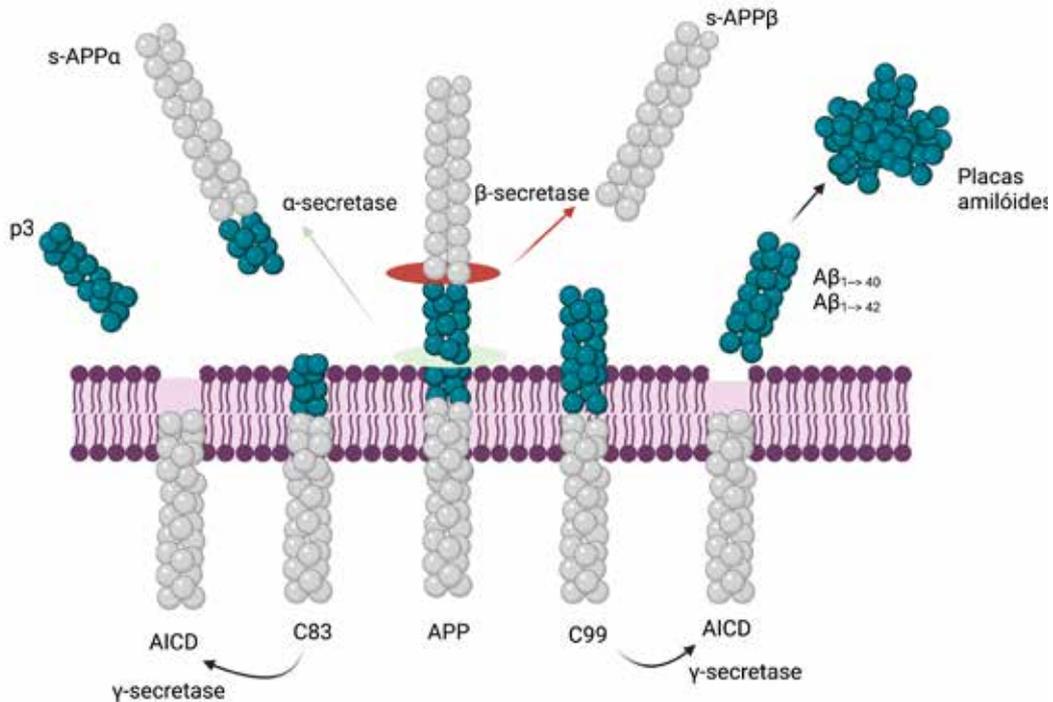


Figura 2: A acumulação do peptídeo β-amilóide na doença de Alzheimer. Reimpresso com pequenas modificações de¹⁶. [Criado com www.BioRender.com]

los e agrega-se, no interior do neurónio, sob a forma de filamentos helicoidais insolúveis. Por conseguinte, há a formação de enormes massas de emaranhados neurofibrilares (NFTs) no interior do neurónio e, em última instância, morte neuronal devido à perda da comunicação entre neurónios e processamento de sinais^{28,41}.

Embora, os eventos moleculares que levam à formação dos NFTs ainda não estejam bem documentados, considera-se que seja a acumulação da proteína β -amilóide o gatilho necessário para a ativação das cinases. Diversas cinases regulam a fosforilação da tau, tais como a cinase glicogénio sintetase 3 (GSK3 β) e a cinase 5 dependente de ciclina (CDK5). Apesar de GSK3 β e CDK5 serem as principais responsáveis pela hiperfosforilação da tau, outras cinases como a Proteína Cinase C, Proteína Cinase A, ERK2, uma serina/treonina cinase, caspase 3, e caspase 9 também têm papéis proeminentes, que podem ser ativados pela A β ^{28,42}.

Bases genéticas

Tal como referido previamente, pensa-se que poderão estar envolvidos três genes diferentes na DA, nomeadamente o gene APP, o PSEN1 e PSEN2. As mutações encontradas nestes genes conduzem, principalmente, a uma produção, agregação ou depuração anormal da proteína β -amilóide¹⁶.

Relativamente ao gene APP, a maioria das mutações ocorrem nas proximidades dos locais de clivagem da α -, β - ou γ -secretase, o que fundamenta a correlação entre as mutações e a alteração do metabolismo de A β . De uma forma geral, uma maior produção dos fragmentos A β ⁴², pode iniciar um conjunto de reações inflamatórias que conduzem a uma deterioração agravada das funções cognitivas⁴³. Por outro lado, no caso da trissomia 21, o cromossoma extra expressa o gene APP e, consequentemente, pessoas com esta patologia terão um gene APP adicional que culminará numa sobre-expressão da proteína APP⁴⁴.

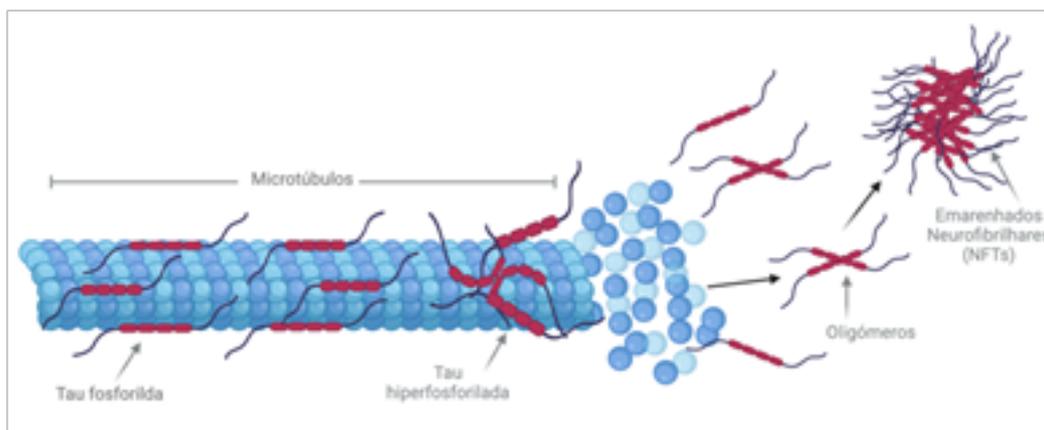


Figura 3: Formação dos emaranhados neurofibrilares na doença de Alzheimer. Reimpresso com pequenas modificações de¹⁶. [Criado com www.BioRender.com]

Já no que se refere às mutações no gene PSEN1 e PSEN2, estas têm tido um impacto funcional que se traduz num aumento da atividade da γ -secretase bem como um incremento da formação da A β ⁴², deslocando a razão A β 42/A β 40 e alterando, em última análise, o processamento da APP pela γ -secretase⁴³.

Quanto ao comprometimento da depuração de A β , na DA, esta pode ser justificada pela presença de uma mutação no *Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 2* (TREM2)²⁸. TREM2 é um receptor altamente expresso nas células da microglia que estão envolvidas na depuração fagocitária de detritos neuronais. Deste modo, estas mutações resultam numa incapacidade destes receptores eliminarem a A β do sistema nervoso central (SNC) e, por consequência, a acumulação de A β e maior intensificação da patogénese nestes doentes⁴⁵.

Neuroinflamação

Nas últimas décadas, tem-se assistido a uma contínua investigação nesta área com o intuito de identificar tanto as vias da neuroinflamação como os tipos de células envolvidas na patologia⁴⁶. Com esse propósito, é fundamental entender a dinâmica do sistema imunitário para compreender o seu contributo para a perda neuronal na doença.

O sistema imunitário é responsável pela defesa do organismo contra agentes agressores, através da imunidade inata e adaptativa. No SNC residem células da imunidade inata que expressam receptores de reconhecimento de padrões aptos a reconhecer moléculas associadas a patógenos e substâncias endógenas libertadas ou produzidas por meio de lesão tecidual. É o caso da microglia e

astrócitos^{48,49}.

A microglia, fagócitos residentes do SNC, exercem um papel vital na manutenção da plasticidade neuronal e na remodelação da sinapse⁵⁰. Estas células mieloides possuem a capacidade de remover o peptídeo A β que é produzido no cérebro por intermédio da sua exportação para o líquido cefalorraquidiano, para os vasos sanguíneos ou mediante degradação local. Esta degradação local pode ser realizada por absorção e degradação (fagocitose) ou por degradação extracelular graças à neprilisina^{51,52,53}. Além disso, estas células expressam um conjunto de receptores capazes de reconhecer o peptídeo A β dos quais se destacam os receptores necrófagos (SCARA-1, MARCO, SCARB-1, CD36 e RAGE), receptores do tipo toll-like (TLR2, TLR4, TLR6 e TLR9), integrina α 6 β 1, CD47. Após reconhecimento, a microglia induz a libertação de mediadores pró-inflamatórios como citocinas, das quais se destacam as interleucinas e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), radicais livres, neurotoxinas que medeiam a neuroinflamação e neurotoxicidade^{46,54}. Todavia, na doença de Alzheimer, há um contacto constante com o peptídeo A β e, consequentemente, estas células mieloides são persistentemente ativadas. Como resultado, verifica-se um aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios e de espécies reativas de oxigénio (EROs) que diminuem a capacidade fagocítica da microglia e provocam uma neuroinflamação crónica^{55,56}. Por outro lado, as citocinas supracitadas podem ser produzidas quer por ativação da microglia quer por ativação dos astrócitos no SNC contribuindo diretamente para o processo de neuroin-

flamação. Entre as principais moléculas inflamatórias associadas à DA salientam-se as citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Em particular, a IL-1 β é uma das principais, contribuindo para a evolução da patologia dado que estimula a produção do peptídeo β -amilóide neurotóxico, hiperfosforilação da tau, a ativação da microglia e astrócitos, libertando uma maior quantidade de citocinas e de óxido nítrico⁵⁶.

Para além de todos estes fatores, acrescenta-se o stresse oxidativo resultante da produção de intermediários reativos de oxigénio e espécies reativas de nitrogénio que desempenham, igualmente, um papel fundamental na neuroinflamação. A produção abundante de radicais livres origina danos nas membranas neuronais com consequente peroxidação dos lípidos e oxidação das proteínas membranares, culminando na neurodegeneração^{57,58}.

Deste modo, podemos concluir que os astrócitos e a microglia são as principais células envolvidas no processo de neuroinflamação. A libertação de mediadores inflamatórios gera um processo cíclico de estímulo à neuroinflamação, culminando em níveis progressivamente maiores de lesão, degeneração e apoptose neuronal⁵⁶.

Disfunção colinérgica

As sinapses colinérgicas são ubíquas no sistema nervoso central⁶³. A sua alta densidade no tálamo, estriado, sistema límbico e neocórtex sugerem que a transmissão colinérgica é extremamente importante nos processos de aprendizagem, memória, atenção e outras funções cerebrais superiores⁶³.

A hipótese colinérgica foi a primei-

ra hipótese evidenciada há mais de 35 anos, por Bartus e seus colaboradores, para explicar a etiologia desta doença. Esta hipótese defendia que o declínio cognitivo associado à DA era consequência primária da depleção da acetilcolina no cérebro destes doentes⁶⁴. Esta hipótese é fortemente sustentada por estudos que demonstram que a perda de atividade colinérgica é um evento comum no cérebro dos doentes com DA⁶⁵ constatando-se uma acentuada redução de neurónios nos núcleos basais de *Meynert* e da atividade da enzima *Colina Acetil Transferase* (ChAT), responsável pela síntese da acetilcolina (ACh)⁶⁶. Além disso, sabe-se que a degeneração neurofibrilar no encéfalo frontal é a principal causa da disfunção e morte dos neurónios colinérgicos do encéfalo frontal dando origem a uma denervação colinérgica pré-sináptica generalizada⁶³. Esta notável perda de neurónios colinérgicos está relacionada com o défice da atividade colinérgica, que afeta tanto os seus recetores⁶⁷ como as enzimas envolvidas na síntese e hidrólise da ACh⁶⁸. Como resultado desta hipótese, vários compostos estimuladores do sistema colinérgico foram submetidos a estudos pré-clínicos e clínicos⁵⁹. Apesar de limitados, os melhores resultados foram exibidos pelos inibidores das colinesterases, atualmente utilizados como terapêutica sintomática desta doença⁵⁹. Todavia, o falhanço da abordagem colinomimética com o propósito de modificar o curso da doença, evidenciou que o défice colinérgico não é a única causa para a DA, como inicialmente proposto por esta hipótese. Contudo, nos últimos anos, esta teoria tem ressurgido alicerçada no pressuposto de que a DA

é uma doença multifatorial cujo defeito colinérgico representa uma vertente da sua patogénese, contribuindo para a sua progressão⁵⁹.

Disfunção glutamatérgica

O principal neurotransmissor excitatório do SNC é o glutamato⁷³. Este assume um papel crucial na maioria das funções cerebrais tais como memória, aprendizagem, cognição, entre outras⁷³.

Em condições fisiológicas e mediante despolarização pré-sináptica, as vesículas contendo o glutamato fundem com a membrana do neurónio pré-sináptico possibilitando a libertação do glutamato⁷³. O glutamato vai ligar-se aos recetores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) e aos recetores metabotrópicos (mGluR) promovendo a sua ativação. Posteriormente ativa os recetores NMDA estimulando a despolarização pós-sináptica através do influxo de cátiões⁷³. Para evitar a sobre-estimulação, o glutamato é removido pelos astrócitos e convertido em L-glutamina por ação da glutamina-sintetase^{73,78}. A glutamina é encontrada, essencialmente, no fluído extracelular e, ao contrário do glutamato, é uma molécula não tóxica desprovida da capacidade de ativar os recetores do glutamato^{73,78}. A glutamina é depois transferida de volta para o neurónio e é reciclada pela glutaminase ativada pelo fosfato e forma o L-glutamato^{73,78}. O L-glutamato é captado por transportadores vesiculares em vesículas sinápticas^{73,78}. Este tráfico de glutamato e glutamina entre astrócitos e neurónios é a via primária através da qual o glutama-

to pode ser reciclado^{73,78,79}. É graças aos transportadores de alta afinidade que é possível remover este neurotransmissor da fenda sináptica assegurando, desta forma, concentrações baixas e não tóxicas^{73,79}. Existem dois sistemas de transporte: os GluTs Vesiculares (VGLUT) e os Transportadores de Aminoácidos Excitatórios (EAAT). Os primeiros são importantes para o que o glutamato seja armazenado em vesículas sinápticas. Ao passo que, os segundos são responsáveis pelo transporte do glutamato em excesso para dentro dos astrócitos⁷³.

Nesta patologia, a disfunção glutamatérgica é resultado da acumulação do glutamato na fenda sináptica (ou por diminuição da sua recaptação ou por anormalidades no seu transportador devido à presença dos peptídeos A β) e também pela ativação exagerada dos recetores do NMDA pelos peptídeos A β ⁷³. Esta ativação persistente leva a um influxo crónico de cálcio que induz um estado de hiperpolarização e, conseqüentemente, inicia o processo de morte neuronal⁷⁶ que se correlaciona com a perda da função de memória e da capacidade de aprendizagem em pacientes com DA^{73,81}. Assim, é crucial manter níveis extracelulares de glutamato adequados⁷³. A despolarização crónica em neurónios vulneráveis é acompanhada por outras perturbações, tais como stresse oxidativo neuronal, danos mitocondriais e inflamação, presença de β -amilóide e, possivelmente da tau hiperfosforilada, o que pode eventualmente aumentar a sensibilidade do sistema glutamatérgico e resultar em disfunção neuronal e morte celular^{73,81,82}.

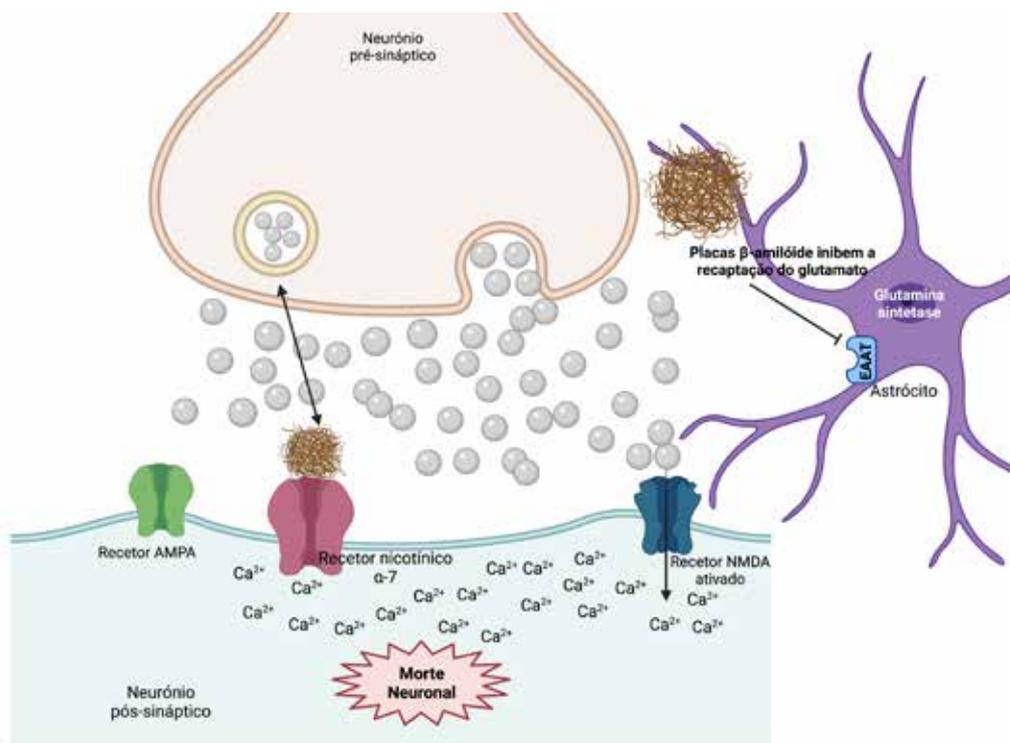


Figura 4: A Disfunção Glutamatérgica na doença de Alzheimer. VGlut (transportador vesicular de glutamato); EAAT (transportador de aminoácidos excitatórios); NMDA (N-metil-d-Aspartato); AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolepropiónico). Reimpresso com pequenas modificações de⁷³. [Criado com www.BioRender.com]

Tratamento farmacológico da doença de alzheimer

Apesar de décadas de estudo sobre a biologia básica da DA e da forte dedicação por parte da indústria farmacêutica, não existe ainda uma terapêutica que modifique o curso da doença ou que, idealmente, atue de forma preventiva¹⁰. Na realidade, somente quatro fármacos estão aprovados e disponíveis para utilização na prática clínica. Porém, não há evidências claras de que algum destes medicamentos modifique os processos patológicos primários inerentes à doença. Ainda assim, parecem proporcionar um alívio sintomático e, normalmente, são administrados como terapêutica paliativa com o propósito de abrandar o declínio da qualidade de

vida¹⁰.

Atualmente, a farmacoterapia disponível atua na neurotransmissão colinérgica (os inibidores da acetilcolinesterase) ou glutamatérgica (antagonistas dos receptores NMDA), possibilitando uma melhoria dos sintomas cognitivos. Por outro lado, antidepressivos, neurolépticos, ansiolíticos e antiepiléticos são também utilizados, visando melhorar os sintomas comportamentais e psiquiátricos⁸³. Relativamente, aos inibidores da acetilcolinesterase, estes retardam a degradação metabólica da acetilcolina, otimizando a concentração deste neurotransmissor para a intercomunicação. Estes fármacos atrasam a progressão da disfunção cognitiva e poderão ser eficazes para alguns doentes nos estágios ini-

cial e intermediário da patologia. Nesta classe, existem três medicamentos, aprovados pela Administração Federal de Alimentos e Medicamentos americana (FDA - do inglês, *Food and Drug Administration*): donepezilo, rivastigmina e galantamina¹⁰.

No que concerne aos antagonistas dos recetores NMDA, o primeiro fármaco aprovado pela FDA para melhorar os sintomas da doença moderada a severa e, por enquanto, o único exemplar desta classe é a memantina. Este fármaco regula a atividade do neurotransmissor glutamato que é libertado pelas células danificadas em grandes quantidades²⁸. Quando o glutamato atinge os recetores do tipo NMDA, na superfície das células, o cálcio flui livremente para o interior da célula e, conseqüentemente, desencadeia neurodegeneração. Este fármaco é dotado da capacidade de impossibilitar esta sequência destrutiva^{10,15}.

Neste sentido, é necessário desenvolver estratégias terapêuticas mais eficazes que permitam um incremento da qualidade de vida e melhoria da condição clínica dos doentes que sofrem com esta condição clínica. E, de facto, o aprofundamento do conhecimento a respeito da fisiopatologia da doença permitiu visionar novas terapêuticas, das quais se destaca a terapia génica.

TERAPIA GÉNICA

No que concerne às doenças do SNC, a terapêutica farmacológica disponível em contexto clínico, não proporciona um tratamento eficaz em virtude do diagnóstico tardio, da complexidade do sistema nervoso e das barreiras físicas que comprometem a distribuição dos fármacos para o cérebro⁸⁴.

Assim, a terapia génica revela-se como uma poderosa estratégia para colmatar as necessidades médicas não preenchidas com a terapêutica tradicional. Esta nova abordagem apresenta a capacidade de corrigir direta e permanentemente defeitos genéticos evitando desta forma tratamentos repetidos⁸⁴. De salientar que, tem havido um esforço e dedicação por parte dos clínicos e investigadores com o propósito de alcançar uma terapia génica eficaz orientada para o SNC.

A terapia génica engloba um conjunto de técnicas que possibilita a introdução de sequências de DNA ou RNA no interior de células-alvo com vista a modular os níveis de expressão das proteínas não funcionais⁸⁵. De uma maneira geral, para se proceder à manipulação genética, várias estratégias poderão ser utilizadas, tais como: i) introduzir uma cópia funcional de um gene defeituoso; ii) silenciar um alelo mutante através de sistemas de interferência de RNA (iRNA); iii) introduzir um gene modificador da doença; ou iv) recorrer a métodos de edição genética⁸⁴.

Previamente à implementação da abordagem, vários fatores deverão ser cuidadosamente discutidos. Nesse sentido, destaca-se a seleção do gene terapêutico, a escolha do vetor mais apropriado, barreiras físicas a considerar, o protocolo de terapia génica a seguir e qual a via de administração mais adequada.

Complexidade do SNC

Apesar da terapia génica ser particularmente atrativa para as perturbações neurológicas, algumas limitações e obstáculos têm de ser enfrentados e encarados como desafios para uma terapia génica

eficaz direcionada para o SNC⁸⁴. De facto, o acesso ao cérebro é limitado e protegido por barreiras físicas tais como a barreira-hematoencefálica (BHE) que dificulta não só o fornecimento de fármacos ao SNC como também impede a utilização de tratamentos sistémicos⁸⁷. Por outro lado, no cérebro existem células de natureza pós-mitótica (neurónios) e outros tipos de células, bem como circuitos neuronais específicos, que desempenham funções críticas⁸⁵. De salientar que o cérebro se apresenta como um órgão sensível a alterações volumétricas⁸⁵.

Todas estas características aliadas à complexidade da fisiopatologia das doenças neurodegenerativas justificam o porquê da grande maioria dos medicamentos e procedimentos cirúrgicos apresentarem-se como ineficazes no tratamento de doenças associadas ao SNC⁸⁸.

Escolha do gene terapêutico

No que se refere à DA, os seus potenciais alvos serão posteriormente abordados com maior detalhe. Da mesma forma, alguns ensaios pré-clínicos e clínicos serão discutidos visando elucidar a evolução desta estratégia tão promissora.

Seleção do vetor

De forma a providenciar uma terapia génica de sucesso é fundamental garantir uma transferência segura e eficiente do material genético para as células-alvo⁸⁴.

Um vetor ideal é dotado da capacidade de transportar transgenes de peso molecular diverso e apresentar baixo grau de imunogenicidade e citotoxicidade^{84,85,90}. Para além disto, deverá permitir uma

expressão estável e com duração adequada do transgene, garantindo ao mesmo tempo uma transdução eficaz e sem efeitos *off-target*^{84,85,90}. Da mesma forma, a sua produção deverá ser simples, eficiente e possibilitar uma produção em larga escala^{84,85,90}. Até aos dias de hoje, não existe um vetor que obedeça a todas estas características ideais e, como tal, as vantagens e limitações de cada vetor deverão ser tidas em consideração com vista a escolher aquele que se enquadra melhor a cada condição clínica⁸⁵.

Na realidade, podemos distinguir dois tipos de vetores que são utilizados neste contexto de terapia génica: os vetores virais e os vetores não-virais. Todavia, são os vetores virais os mais frequentemente utilizados graças ao elevado grau de eficiência de transdução que proporcionam⁸⁵.

Vetores virais

Este tipo de sistema de entrega apresenta a capacidade intrínseca de infetar células⁸⁴. No entanto, os genes responsáveis pela replicação viral são substituídos pelos genes terapêuticos e são adicionados os promotores que regulam a expressão do transgene⁸⁵. Dos vários vetores virais disponíveis para utilização destacam-se os adenovírus (Ad), lentivírus (LV), vírus herpes simplex (HSV) e os vírus adeno-associados (AAV)^{84,85}.

Vetores virais de Adenovírus (Ad)

São vírus icosaédricos, sem envelope e de dupla cadeia de DNA. Apresentam uma enorme capacidade transgénica e de infetar vários tipos de células⁹³. Quando infetam a célula-hospedeira introduzem o seu material genético, mas sem que este incorpore o genoma da célula-al-

vo⁹³. Logo, possibilitam uma expressão transgênica transitória. Embora exibam um ótimo perfil de segurança, a presença das proteínas virais pode ocasionar uma resposta imunológica. Por conseguinte, as suas principais aplicações no contexto do SNC suportam-se no seu elevado grau de antigenicidade, sendo frequentemente utilizados com a finalidade de tratar tumores cerebrais^{85,94}.

Vetores virais do Herpes Simplex (HSV)

Estes são vírus envelopados de dupla cadeia de DNA com capacidade de transportar transgenes com um elevado peso molecular^{85,94}. O seu genoma é depositado na forma episomal e, portanto, há um baixo risco de mutagénese insercional^{85,94}. Tratam-se de vírus neurotrópicos e, portanto, conseguem infectar eficazmente os neurónios e outras células do SNC tal como a glia⁸⁵. Todavia, a sua utilização é restrita, devido a problemas associados à expressão latente e imunogenicidade^{85,94}.

Vetores virais de Retrovírus

São vírus envelopados de cadeia simples de RNA e, curiosamente, foram os primeiros a serem usados em terapia génica^{85,94,95}. Quando infectam uma célula-alvo, introduzem não só o seu material genético como também outras enzimas⁹⁶. Desta forma, conseguem produzir uma molécula de dupla cadeia de DNA complementar à molécula de RNA graças à transcriptase reversa⁹⁶. Esta molécula de dupla cadeia de DNA é, então, integrada de forma aleatória no genoma da célula-alvo^{85,94}. No entanto, são vetores cuja aplicação está limitada, dado que apenas possuem a capacidade de transferir genes para células que se

encontram em divisão^{85,94}. Por outro lado, como ocorre uma integração do genoma na célula-alvo há um risco aumentado de mutagénese por inserção e genotoxicidade^{85,94}. Como tal, são vetores inadequados para a modificação genética de células diferenciadas e indivisíveis como é o caso dos neurónios^{85,94}.

Vetores Lentivirais (LV)

Tal como os retrovírus, são vírus que infetam as células mediante um processo de integração do genoma na célula-alvo⁹⁶. Contudo, ao contrário do retrovírus, a integração do seu material genético ocorre em células quiescentes⁹⁶. Apresentam uma expressão estável do transgene por longos períodos de tempo. Apesar de desempenharem um papel cada vez mais iminente na terapia génica orientada para o SNC, há risco de mutagénese insercional uma vez que integram o genoma da célula-alvo⁹¹. Contudo, é graças a essa capacidade que são adequados para a terapia génica *ex vivo*⁸⁷.

Vetores de Vírus Adeno-Associados (AAV)

Estes vetores são vírus não patogénicos de cadeia simples de DNA não envelopados e derivados do parvovírus^{87,94}. Dentro dos vetores virais, são atualmente os mais utilizados em ensaios clínicos aplicados ao SNC^{87,94}. Efetivamente, são vetores seguros, não patogénicos e com capacidade de infetar eficazmente neurónios *in vivo*⁸⁷. Apresentam tropismo serotipo-dependente, conforme a interação com recetores específicos em células-alvo^{87,94}. Na verdade, os serotipos mais estudados num contexto do SNC são os serotipos^{1,2,5,8,9} e rhesus (rh)¹⁰ sendo que, o vetor AAV⁹ apresenta a capacidade de atravessar a BHE^{87,94}. Apesar de existir

a possibilidade de desencadear uma resposta imunológica, tem sido observado pouca toxicidade associada ao seu uso⁹⁴. Não obstante nenhum dos vetores disponíveis seja o ideal, os AAV surgem como os vetores de eleição para a terapia génica direcionada para o SNC e, em particular para as doenças neurodegenerativas^{84,87,94}. De facto, apresentam vantagens significativas relativamente às outras alternativas, como uma expressão estável e duradoura e ainda ausência de toxicidade^{84,97}. Contudo, a capacidade de empacotamento é restrita comparativamente aos Ad ou aos HSV⁸⁵.

Vetores não-virais

Estes vetores de transferência génica são encarados como uma alternativa promissora graças aos seus métodos de produção simples, associados a baixos

custos e elevado perfil de segurança⁸⁴. Contudo, apresentam uma eficiência relativamente baixa e medeiam um efeito transitório, exigindo administrações repetidas com conseqüente risco de desencadear uma resposta imunitária⁸⁴. Assim, o uso destes vetores é geralmente insuficiente no tratamento de doenças neurodegenerativas crónicas^{84,97}. Podemos distinguir dois tipos de métodos de transferência génica não virais: métodos físicos e métodos químicos⁸⁴.

Protocolo de aplicação

A escolha da via de administração é um aspeto fundamental a ter em consideração aquando da manipulação genética. Disparamos de duas abordagens diferentes: a terapia génica *in vivo* e a terapia génica *ex vivo* como evidenciado na figura 5.

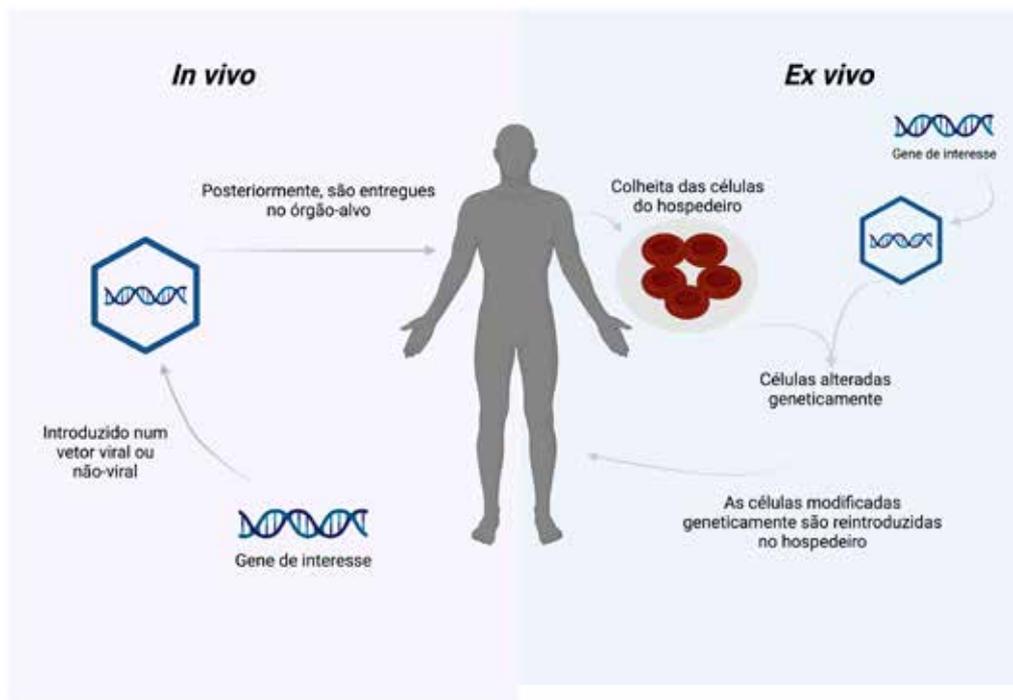


Figura 5: Abordagens disponíveis para a realização da terapia génica. Reimpresso com modificações de⁹⁸. [Criado com www.BioRender.com]

Terapia génica *in vivo*

Genericamente, a terapia génica *in vivo* implica a introdução direta do gene terapêutico na região-alvo recorrendo, para esse efeito, à utilização de vetores virais. Recentemente, este método foi expandido para incluir a edição direta de genes de células *in vivo* recorrendo a uma tecnologia de repetições palíndromas regularmente espaçadas (CRISPR)⁹⁹.

Embora seja uma técnica relativamente simples, várias complicações podem surgir como consequência do uso de vetores virais *in vivo*, tais como, baixo grau de especificidade e de controlo da transferência genética, silenciamento genético, mutagénese de inserção no interior das células hospedeiras e, ainda respostas imunológicas direcionadas para o vetor^{100,101}. Além disso, a sua aplicação num contexto de doenças neurológicas exige frequentemente que as células do SNC em degeneração se mantenham ativas ao longo do tempo com vista a produzirem as moléculas terapêuticas pretendidas. Contudo, este acréscimo de atividade celular pode resultar num stresse indesejável¹⁰¹.

Para a aplicação deste método, existe um leque variado de possibilidades para administração do vetor. Contudo, a escolha da forma de administração dever-se-á adequar à região que se pretende tratar, no caso da DA, o SNC. Nessa perspectiva, e de forma resumida, existem disponíveis as seguintes opções: injeção intraparenquimatosa direta no parênquima cerebral afetado, injeção intracerebroventricular, intra-cisterna magna e a injeção intravascular⁸⁴.

Terapia génica *ex vivo*

De um modo geral, para a realização desta abordagem, as células necessitam de ser modificadas geneticamente antes de serem introduzidas no paciente, a fim de poderem expressar o gene terapêutico¹⁰³. As fontes celulares podem ser isoladas dos pacientes e reintroduzidas após manipulação genética por transplante autólogo⁸⁷. Há, igualmente a possibilidade de se gerarem linhas celulares alogénicas modificadas que serão armazenadas para posteriormente se proceder a um transplante¹⁰⁴.

No contexto das perturbações neurológicas, é comum isolarem-se as células estaminais hematopoiéticas (HSCs), a partir do sangue ou da medula óssea do paciente e, após purificação, proceder-se à modificação genética⁸⁷. Esta modificação pressupõe a utilização de vetores lentivirais para a realização da transdução *in vitro* e, posteriormente, procede-se ao transplante autólogo das células modificadas⁸⁷. Estas células, ao serem reintroduzidas no paciente, irão integrar o compartimento das células estaminais da medula óssea⁸⁷. Uma parte dessas células terá a capacidade de migrar em direção ao SNC e atravessar a BHE¹⁰¹. Localmente, podem diferenciar-se em células de suporte essenciais do ponto de vista terapêutico, tais como microglia, astrócitos ou oligodendrócitos, ou podem fornecer uma proteína benéfica ou em falta¹⁰⁵. A título de exemplo, destaca-se a possibilidade da microglia poder ser geneticamente modificada com vista a restaurar a função normal proporcionando efeitos benéfi-

cos aos neurónios, graças à produção de proteínas terapêuticas, fatores tróficos ou quimiocinas¹⁰¹. Este tipo de abordagem permite, por um lado, a caracterização do produto celular geneticamente modificado antes da reintrodução no paciente e, por outro, possibilita a não exposição direta do paciente ao vetor

utilizado na transferência genética¹⁰⁶. Todavia, este é um método que exhibe uma baixa disponibilidade de células viáveis para transplante, reduzida taxa de sobrevivência das células transduzidas, possibilidade de terapêutica imunossupressora e o processo de preparação das células é altamente complexo e ex-

Tabela 1- Potenciais Alvos da Terapia Génica

| ALVOS TERAPÊUTICOS | ESTUDO | REFERÊNCIA |
|--------------------|------------------------------|---------------------------------|
| APP | Pré-clínico | 108,111 |
| BACE-1 | Pré-clínico | 112, 185 |
| Neprilisina | Pré-clínico | 108,115,116 |
| ECE | Pré-clínico | 118 |
| ApoE | Pré-clínico | 186 |
| Clusterina/ApoJ | Pré-clínico | Não existem estudos científicos |
| SOAT1 | Pré-clínico | 187 |
| CYP46A1 | Pré-clínico | 188,189 |
| Beclin-1 | Pré-clínico | 180 |
| NGF | Ensaio clínico (fase I e II) | 190,191,192 |
| BDNF | Pré-clínico | 148, 192,193 |
| TREM-2 | Pré-clínico | 155,194 |
| IL-2 | Pré-clínico | 195 |
| Il-4 | Pré-clínico | 160,196,197 |
| IL-10 | Pré-clínico | 151,166 |
| TNF- | Pré-clínico | 169, 170 |
| PGRN | Pré-clínico | 176,198 |
| Tau | Pré-clínico | 138 |

tremamente moroso¹⁰⁶.

Metabolismo de A β

Tal como anteriormente referido, o excesso de A β no cérebro é um dos fatores desencadeantes da doença de Alzheimer. Desta forma, uma intervenção direcionada para reduzir os níveis deste peptídeo tem surgido como uma abordagem clínica bastante atrativa.

APP

Considera-se que o peptídeo A β que resulta da clivagem da APP tenha a capacidade de formar oligómeros e, posteriormente, as placas β -amilóide insolúveis implicadas na neurodegeneração e declínio cognitivo. Nesse sentido, uma *downregulation* da expressão do gene APP representa uma possível estratégia terapêutica para a DA³.

A recente tecnologia baseada em pequenos RNA de interferência (siRNA) apresenta-se como uma estratégia viável para proceder à *downregulation* da síntese de APP³. Nesse sentido, destaca-se um estudo que demonstrou que a utilização deste procedimento em murgos que sobre-expressam a APP reduz a patologia A β ^{3,108}. Todavia, a APP apresenta uma diversidade de funções biológicas e, como tal, a sua completa eliminação provoca disfunções locomotoras e cognitivas em murgos¹⁰⁹. Por conseguinte, a completa eliminação não é exequível^{3,110}.

sAPP α

O APP ao ser clivado pela α -secretase produz um precursor solúvel e não patológico que é o sAPP α ^{28,33}. Este fragmento desempenha diversas funções cruciais tais como a sinalização e plas-

ticidade sináptica normal, aprendizagem, memória, comportamento emocional e sobrevivência neuronal^{28,33}. Dado que os pacientes com DA apresentam baixos níveis deste produto no líquido cefalorraquidiano, uma abordagem terapêutica direcionada para este fragmento assume-se como promissora⁵. Todavia, uma *upregulation* da produção do sAPP α mediante indução da α -secretase poderá constituir um problema por afetar substratos implicados na tumorigénese¹¹¹. Neste sentido, a terapia génica assume-se como uma potencial abordagem para melhorar, ou restaurar, os níveis deste fragmento¹¹¹. Para avaliar o efeito da sobre-expressão do sAPP α pelo AAV procedeu-se a um estudo com modelos de murgos transgênicos APP/PS1E9 com doença bem estabelecida. Desta abordagem foi possível observar uma melhoria da plasticidade sináptica, aumento da densidade das espinhas dendríticas e, ainda, uma melhoria da memória espacial de referência¹¹¹. Paralelamente, este estudo concluiu que a expressão AAV-sAPP α resulta em níveis moderadamente reduzidos de A β e uma significativa melhoria da patologia¹¹¹. Estas observações foram associadas à ativação da microglia e fagocitose das placas amilóides como consequência do aumento da enzima metabolizadora da insulina (*Insulin-Degrading Enzyme, IDE*) e TREM2¹¹¹. Coletivamente, os resultados deste estudo sugerem que, mesmo em fases com deposição avançada das placas, o sAPP α pode atenuar os efeitos sinaptotóxicos induzidos pelo A β e melhorar a função cognitiva¹¹¹.

BACE1

A β -secretase (*Beta-site APP Cleaving*

Enzyme 1, BACE1) assume um papel central na produção do peptídeo A β e, como tal, torna-se um alvo terapêutico bastante atrativo⁵. Contudo, o local ativo desta enzima apresenta algumas especificidades que dificultam o desenvolvimento de pequenas moléculas pela química medicinal tradicional¹¹². Assim, a terapia génica apresenta-se como uma alternativa bastante promissora a fim de suprimir a BACE1¹¹².

Um dos estudos efetuados recorreu à utilização de vetores lentivíricos que expressavam siRNAs com vista a silenciar eficazmente a expressão da BACE1 nos neurónios de murganhos com DA⁵. Com este estudo foi possível alcançar uma redução dos níveis de BACE1 e, consequentemente, uma diminuição quer da produção do peptídeo A β quer dos défices neurodegenerativos e comportamentais⁵. Num outro estudo a diminuição dos níveis de BACE1 foi alcançada graças a uma estratégia que envolveu a utilização de exossomas auto-fabricados a partir de células dendríticas para entrega de siRNA no cérebro de modelos animais³.

No entanto, como resultado da eliminação da BACE1, surgem efeitos indesejáveis, quer a nível cognitivo, quer a nível sináptico. Efetivamente, para além dos efeitos neurotóxicos do peptídeo A β , existem evidências de que, a níveis fisiológicos, este é detentor de propriedades neuroprotetoras; consequentemente, a redução da BACE1 pode diminuir a produção endógena de A β , comprometendo as suas propriedades neurotrópicas e sinaptotróficas⁵.

Enzimas proteolíticas

Como referido anteriormente, o peptídeo

A β sofre constantemente metabolização no líquido cefalorraquidiano e o seu conteúdo depende do equilíbrio entre a sua produção e respetiva depuração. Constatou-se que os doentes com DA esporádica apresentam uma depuração deficiente do peptídeo A β . Neste contexto, o aumento dos níveis deste peptídeo pode ser consequência da elevada produção ou baixa degradação¹.

De facto, diversas enzimas residentes no cérebro são dotadas da capacidade de degradar o peptídeo A β , tal como a neprilisina^{3,113,114}. Estudos recentes demonstram que a remoção desta enzima em modelos de murganhos está associada a um risco aumentando de desenvolvimento da patologia A β nestes animais^{3,113}. Neste sentido, uma *upregulation* por manipulação genética apresenta-se como uma forte estratégia para reduzir os níveis deste peptídeo na DA³. De salientar que a validação pré-clínica *in vivo* demonstrou que a expressão da neprilisina por AAV¹¹⁵, lentivírus¹¹⁶ ou HSV¹⁰⁸ em modelos de murganho com sobre-expressão de APP, desencadeou uma diminuição dos níveis de A β e uma melhoria da patologia A β ³. Por essa razão, a transferência do gene da neprilisina apresenta o potencial de reduzir a patologia A β na DA³.

Para além da neprilisina, a enzima convertora da endotelina (ECE) pode igualmente degradar o peptídeo A β no cérebro³. Na realidade, a transferência do gene da ECE para um modelo de murganho com DA reduziu a patologia A β ^{3,118}.

Metabolismo do colesterol

ApoE

O gene que codifica a ApoE apresenta-se como o fator genético de risco mais co-

mum para o desenvolvimento da DA de início tardio¹¹⁹. O gene que codifica esta apolipoproteína compreende três alelos principais: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ ¹²⁰. A existência do $\epsilon 4$ conduzirá à expressão da isoforma proteica ApoE4 que contribuirá para acelerar o processo de acumulação do peptídeo A β de uma forma dose-dependente, enquanto o $\epsilon 2$ terá uma ação contrária¹¹⁹. Para além da ApoE4 desempenhar um papel crucial na deposição do peptídeo A β , dados recentes sugerem que também assume um papel importante na patologia de tau e na neurodegeneração mediada pela tau¹¹⁹. Neste sentido, a redução dos níveis da ApoE4¹¹⁹ ou o aumento da expressão da ApoE2¹²⁰ apresentam-se como duas potenciais abordagens para o tratamento da DA.

De facto, um dos estudos realizados envolveu a administração de oligonucleotidos anti-sense (ASOs) em modelos de murganhos P301S/ApoE4 a fim de avaliar os efeitos da redução dos níveis da ApoE4¹¹⁹. Deste estudo concluiu-se que através desta estratégia é possível reduzir os seus níveis em cerca de 50%, o que proporciona uma significativa proteção contra a patologia tau e neurodegeneração associada, uma diminuição da neuroinflamação, sendo preservada a densidade sináptica¹¹⁹. Também foi possível constatar que esta redução pode assumir efeitos neuroprotetores mesmo após o início da patologia tau¹¹⁹. Assim, a redução dos níveis da ApoE4 deverá ser explorada como uma possível abordagem terapêutica em portadores da ApoE4 com taupatia, inclusive numa fase avançada da doença¹¹⁹.

Relativamente ao efeito da ApoE2, foi realizado um estudo que envolveu a

administração intracerebral de AAV-ApoE4 seguida de administração de AAV-ApoE2 em modelos animais e concluiu-se que houve uma redução da deposição de A β . Estes resultados sugerem que o aumento da expressão da ApoE2 poderá ser eficiente na redução da patologia A β ¹²⁰. Em virtude dos vários estudos realizados com base neste pressuposto foi possível agendar, para breve, um ensaio com a finalidade de testar a segurança da expressão AAV-ApoE2 em portadores da ApoE4 (data prevista de conclusão: dezembro de 2021)¹²⁰.

Clusterina/ApoJ

Atualmente a clusterina (CLU), também conhecida como ApoJ, é o terceiro fator genético de risco mais significativo para o desenvolvimento da DA tardia¹²¹. O gene que codifica a estrutura primária da CLU contém polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs) associados ao risco de DA tardia¹²². Todavia, permanece uma grande lacuna na literatura sobre os papéis fisiológicos da CLU no cérebro normal e sobre os mecanismos patológicos conferidos por esses polimorfismos no início da SAD¹²¹. Mais recentemente, tem sido sugerido que alguns dos SNPs conferem uma proteção contra a DA tardia, mas permanece por esclarecer o quão significativa é essa neuroproteção e quais os mecanismos subjacentes¹²². De facto, constatou-se que a infusão de CLU no cérebro de murganhos sujeitos a traumatismo cerebral melhorou os parâmetros comportamentais e neuronais^{3,123}. No entanto, a utilização do oligonucleótido anti-sense OGX-011 como ferramenta genética tem sido empregue em alguns tratamentos para o cancro e tem como pressuposto silenciar a CLU. Esta

tecnologia comprovou ser bem-sucedida nos vários ensaios de fase II^{3,124}. Contudo, não conseguiu traduzir-se na fase III, uma vez que a CLU tanto funciona como um supressor de tumores como um promotor³. Portanto, o efeito tumorigênico da CLU pode ser uma grande preocupação no caso particular da DA³.

CYP46A1

Nas últimas décadas, a forte investigação em torno da fisiopatologia da DA, permitiu sugerir que o metabolismo do colesterol está intimamente relacionado com a progressão desta doença⁵. De facto, através de ensaios envolvendo modelos animais concluiu-se que a alteração do metabolismo deste lípido assume um papel fulcral no desenvolvimento das placas amilóides e na patologia de tau⁵. No cérebro, o colesterol é sintetizado *in situ*, essencialmente pelos astrócitos, sendo posteriormente transportado pelas lipoproteínas de alta densidade (HDL)⁵. Estas partículas ao serem internalizadas pelos neurónios fornecem-lhes o colesterol necessário. Dado que é fundamental manter níveis estáveis desta molécula, a biossíntese do colesterol é equilibrada pela sua eliminação¹²⁵. Nesse sentido, o principal mecanismo de eliminação do excesso do colesterol é a conversão desta molécula no colesterol 24-hidroxicolesterol (24S-OHC) pela enzima neuronal colesterol 24-hidroxilase (CYP46A1)¹²⁵. Este metabolito tem a capacidade de atravessar a BHE, ao contrário do colesterol, podendo rapidamente difundir-se para a circulação sistémica ou para o LCR e, subsequentemente, sofrer degradação no fígado¹²⁵. Atendendo a que na DA ocorre uma redução dos níveis da CYP46A1¹²⁵, a so-

bre-expressão desta enzima através da administração cerebral de vetores portadores do gene que a codifica parece ser uma estratégia eficaz⁵. Com o propósito de avaliar o resultado desta possível estratégia, surgiu a primeira manipulação genética realizada em mamíferos¹²⁵. Este estudo traduziu-se na administração de injeções corticais e hipocámpais de AAVs portadores do DNA complementar (cDNA)⁵ da CYP46A1 em modelos de murganhos APP23 aos 3 meses de idade, antes do início dos depósitos amilóides¹²⁶. Constatou-se que foi possível reduzir acentuadamente os níveis dos peptídeos A β e o número de depósitos amilóides aos 12 meses de idade¹²⁶. Estes animais mostraram uma melhoria prévia da memória espacial aos 6 meses, antes do início do depósito de amilóides¹²⁶. A sobre-expressão do CYP46A1 por injeção do mesmo vetor AAV no córtex e hipocampo dos murganhos APP/PS1, após o início dos depósitos amilóides, reduziu o número de placas amilóides 3 meses após a intervenção⁵. Assim, a sobre-expressão neuronal do CYP46A1, antes ou depois do aparecimento das placas amilóides, permitiu reduzir a patologia A β em dois modelos diferentes de animais com a patologia DA⁵.

Este trabalho forneceu a primeira evidência experimental de que o CYP46A1 poderá ser um alvo terapêutico para a doença de Alzheimer, abrindo assim novas vias de tratamento¹²⁵.

ACAT1

O colesterol apresenta-se como uma molécula lipídica essencial, presente nas membranas celulares dos mamíferos¹²⁷. Todavia, o colesterol em níveis anor-

malmente elevados, especialmente o colesterol livre, é prejudicial para as células^{127,128}. Por essa razão, no interior de cada célula, a homeostase do colesterol celular é altamente regulada por vários mecanismos^{127,129}. Um desses controlos é assegurado pela enzima acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT), também conhecida como esterol O-aciltransferase (SOAT)¹²⁷. Esta enzima é responsável por converter o colesterol livre em ésteres prevenindo, assim, a sua acumulação nas membranas celulares. A ACAT é expressa por dois genes diferentes, ACAT1 e ACAT2, com diferentes padrões de expressão nos tecidos¹²⁷. No ser humano, a expressão da ACAT1 predomina sobre a ACAT2, exceto no intestino delgado^{127,130}.

Bryleva *et al.* desenvolveram uma abordagem genética removendo o gene ACAT1 ou o gene ACAT2 num modelo triplo-transgénico de murganho portador da patologia DA (3XTg-AD)^{127,131}. Este modelo de murganho expressa, simultaneamente, as formas mutantes de APP humano, PS1 e tau, exibindo um fenótipo semelhante à DA humana¹²⁷. Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que a ablação do gene ACAT1, mas não a do ACAT2, permitiu reduzir os níveis do peptídeo A β bem como a carga da placa amilóide, contribuindo para melhorar a função cognitiva dos murganhos aos 12 meses¹³². Estes resultados demonstram que a inativação do gene ACAT1 é suficiente para melhorar a patologia amilóide neste modelo animal¹²⁷.

Um outro estudo avaliou se a inibição da ACAT1 poderia desencadear efeitos benéficos nos murganhos 3XTg-AD numa fase pós-sintomática^{127,133}. Com os

dados desse estudo foi possível constatar que houve uma redução dos níveis da proteína APP e do peptídeo A β no cérebro destes animais^{127,132}. Verificou-se ainda que, após o início da DA, a inativação parcial da ACAT1 (40%) no cérebro foi suficiente para causar uma diminuição dos níveis de A β nestes modelos animais¹²⁷. Assim, estes estudos demonstraram que o bloqueio da ACAT1 proporciona múltiplos efeitos benéficos na DA. Nessa perspetiva, esta molécula constitui um novo alvo terapêutico para o tratamento da DA¹²⁷.

TAU

Como explanado previamente, uma das marcas histopatológicas desta doença neurodegenerativa é a presença de emaranhados neurofibrilares intracelulares constituídos pela proteína tau hiperfosforilada¹³⁴. A hiperfosforilação anormal da tau no cérebro destes doentes pode ser consequência do aumento da fosforilação por parte das cinases e/ou diminuição da desfosforilação por fosfatases¹³⁴.

Uma vez que a proteína tau desempenha um papel crítico na neurodegeneração, uma abordagem direcionada para a inibição da sua expressão constitui uma estratégia promissora para o tratamento desta doença¹³⁴. Perspetivando reduzir a expressão da tau, poderão ser utilizados tanto os ASOs como os siRNA podem ser utilizados¹³⁵. Contudo, até à data, os siRNAs ainda não foram investigados em ensaios clínicos para o tratamento da DA^{134,136}. Recentemente, os ASOs reemergiram como um valioso instrumento terapêutico nas doenças neurodegenerativas, das quais se inclui a DA³. Para estudar os efeitos terapêuti-

cos de uma redução total da tau, Ionis e colegas desenvolveram o BIIB0^{80,137} um ASO entregue por via intratecal que reduz a expressão total do gene da TAU¹³⁷. Em murganhos transgênicos P301S que expressam a tau humana, a redução em 50% dos níveis do mRNA da TAU pelo BIIB080 inverteu a agregação da tau, com uma diminuição concomitante da taxa de atrofia hipocampal, perda neuronal e défices comportamentais^{137,138}. Estes resultados pré-clínicos encorajadores levaram à realização de ensaios clínicos de fase 1/2 em 46 pacientes com DA leve, tratados com BIIB080 durante 36 semanas (NCT03186989)¹³⁷. Logo, uma terapia baseada nesta estratégia poderá ser benéfica para pacientes diagnosticados com DA.

Neurotrofinas

As neurotrofinas são uma família de peptídeos estruturalmente relacionados que regulam o crescimento, a diferenciação e a sobrevivência dos neurónios³. No contexto da DA, os estudos realizados focaram-se, essencialmente, em duas neurotrofinas: o fator neurotrófico neuronal (NGF) e o fator neurotrófico de crescimento derivado do cérebro (BDNF)^{3,139}.

NGF

O NGF apresenta particular importância no tratamento da DA dado que é capaz de inverter a atrofia, prevenir a degeneração e estimular a função dos neurónios colinérgicos do encéfalo frontal^{140,141}. De enfatizar que a degeneração dos neurónios colinérgicos é um contribuinte precoce e proeminente do declínio cognitivo presente na DA⁵. Mediante condições fisiológicas nor-

mais, os neurónios colinérgicos do encéfalo frontal desempenham um papel crucial na cognição ao inervarem a região do córtex e do hipocampo com acetilcolina¹⁴². Os neurónios pós-sinápticos residentes nessas regiões libertam o precursor do NGF, o proNGF, que sofre processamento por uma protease, a plasmina, o que resulta num NGF maturado, o mNGF¹⁴². Como os neurónios colinérgicos necessitam de NGF para estimular o crescimento e a plasticidade, expressam à superfície recetores para esta neurotrofina, o recetor tropomiosina cinase A (TrKA) e o p75¹⁴². O efeito neurotrófico induzido pelo NGF é conseguido após interação com o TrKA (mNGF mais potente que o proNGF)¹⁴². O NGF ao ser transportado retrogradamente dentro dos neurónios colinérgicos inicia várias cascatas de sinalização que incluem a sobrevivência celular, crescimento e libertação da acetilcolina através das projeções cortico-hipocampais¹⁴². De notar que o proNGF é capaz, por si só, de induzir sinalização apoptótica ao interagir com o p75¹⁴². No contexto da DA, o sistema colinérgico é fortemente afetado devido a um conjunto de processos que incluem a alteração da maturação do NGF, alteração do rácio TrKa/p75, transporte e sinalização axonal ineficiente, resposta inflamatória induzida pela libertação dificultada de acetilcolina e citotoxicidade mediada pelo peptídeo Aβ¹⁴³. O declínio da inervação colinérgica ao córtex e ao hipocampo é consequência de uma maturação ineficiente do NGF¹⁴³. Isto tanto é atribuído à produção reduzida e à elevada depuração do mNGF como à redução dos níveis de recetores de TrkA, afetando o transporte axonal retrógra-

do do NGF¹⁴³. Assim, níveis elevados de proNGF induzem não só uma sinalização pró-apoptótica como também afetam a ligação do mNGF ao recetor e o seu transporte axonal, conduzindo a uma atrofia dos neurónios colinérgicos do encéfalo frontal. Por outro lado, a presença do peptídeo A β impede a maturação do NGF e o NGF pode reduzir a formação de A β ¹⁴³. Os estudos científicos sugerem que, durante o envelhecimento, a alteração das vias de maturação e sinalização do NGF pode levar a um aumento da formação de A β e a uma redução do espaço livre¹⁴³. Além de induzir a morte neuronal, o aumento dos níveis de A β pode conduzir a um aumento da inflamação e a deficiências na sinalização¹⁴³. O A β pode também diminuir a recaptção de colina da fenda sináptica, afetando a produção de acetilcolina em neurónios pré-sinápticos, e alterar a libertação deste neurotransmissor, levando a défices cognitivos¹⁴³. Dado que a acetilcolina modula as vias anti-inflamatórias colinérgicas na população glial, uma libertação de acetilcolina dificultada resulta no início da inflamação¹⁴³. Todas estas alterações comprometem a disponibilidade do mNGF para os neurónios colinérgicos, o que por sua vez culmina com a inervação colinérgica obstruída ao córtex e às regiões hipocampais do cérebro¹⁴³.

Neste sentido, o NGF tem sido proposto como um possível alvo terapêutico modificador da doença nos últimos anos³. O primeiro estudo baseado na terapia génica em pacientes com DA foi publicado em 2005¹⁴³. Neste estudo, o gene do NGF foi entregue em indivíduos diagnosticados com DA ligeira. A transferência do gene foi realizada através de

fibroblastos autólogos geneticamente modificados que, posteriormente, foram implantados no cérebro basal. Os dados deste estudo mostraram um aumento significativo do metabolismo cerebral e os testes cognitivos sugeriram um potencial abrandamento do declínio cognitivo¹⁴³.

Recentemente foi publicado um ensaio clínico de fase I e II que recorreu à utilização de vetores AAV e incluiu 49 pacientes com DA, aleatoriamente selecionados para receberem as injeções intracerebrais de AAV-NGF. Do ensaio clínico de fase I, concluiu-se que a administração de AAV-NGF é segura e bem tolerada até 2 anos após a injeção, mantendo a bioatividade nas células transduzidas. Os resultados do ensaio clínico de fase II validaram que a administração de AAV-NGF é segura e bem tolerada, porém, sem diferença significativa no declínio cognitivo¹⁴³.

BDNF

O BDNF é uma neurotrofina dotada da capacidade de regular os processos de aprendizagem e memória³. O BDNF é expresso e amplamente distribuído por todo o cérebro, especialmente nas regiões do córtex e hipocampo^{3,144}. É fundamental para a função e sobrevivência tanto dos neurónios dopaminérgicos como colinérgicos^{3,145}. O BDNF maduro regula a diferenciação e a plasticidade destes neurónios mediante ativação do seu recetor de alta afinidade TrkB e do seu recetor de baixa afinidade p75NTR^{3,145}. O papel do BDNF na potenciação a longo termo (LTP) foi estabelecido em experiências com animais^{3,146}. Estes estudos demonstraram que a LTP em neurónios hipocampais é reforçada

pela sobre-expressão do TrkB enquanto a redução da sinalização de BDNF-TrkB leva a uma diminuição da memória³. Na DA, para além da diminuição dos níveis corticais de BDNF, a sinalização do proBDNF através da ligação ao p75NTR promove uma depressão neuronal a longo prazo^{3,146}. Sabe-se que o BDNF pode ter um efeito protetor contra a toxicidade induzida pelo peptídeo A β , tanto *in vivo* como *in vitro*, e prevenir a deficiência de LTP induzida pelo A β nas regiões do córtex e hipocampo^{3,147}.

À semelhança do que acontece com o NGF, as propriedades farmacocinéticas do BDNF não são adequadas para administração periférica, devido à fraca penetração na BHE e ao seu curto tempo de meia vida no plasma³. Desta forma, as abordagens de terapia genética apresentam-se como uma potencial alternativa terapêutica³. Foram observados resultados promissores da entrega do gene BDNF a murganhos transgênicos APP, mostrando uma redução da perda neuronal, melhoria da memória e diminuição da degeneração sináptica^{3,148}. É importante notar que a terapia genética recorrendo ao lentivírus para entrega do gene do BDNF em primatas demonstrou exercer o seu efeito terapêutico, invertendo atrofia neuronal e melhorando a cognição³, mas, curiosamente, o seu efeito benéfico não foi acompanhado por uma diminuição das placas amilóides⁵. Estes estudos levaram ao início dos ensaios clínicos de fase I com BDNF³.

GDNF

Atualmente, o fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF) está a emergir como um poderoso fator neurotrófico, apresentando um potencial

terapêutico contra uma diversidade de condições neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer^{5,149}. Foram utilizados vetores lentivirais para sobre-expressar o gene GDNF em astrócitos do hipocampo de murganhos 3xTg-AD *in vivo*^{5,13}. Após 6 meses de tratamento, os murganhos 3xTg-AD de 10 meses exibiram aprendizagem e memória preservadas. A terapia de GDNF não reduziu significativamente a patologia amilóide e patologia tau, mas antecipou a expressão de BDNF e a neuroproteção induzida^{1,5}.

IGF1 e IGF2

O fator de crescimento 2 semelhante à insulina (IGF2) desempenha um papel crítico na consolidação da memória em murganhos e ratos. Nos doentes com DA, a expressão de IGF2 diminui no hipocampo. A administração de AAV-IGF2 no hipocampo de ratos Wildtype envelhecidos melhora a memória e promove a formação de espinhas dendríticas^{5,150}.

A injeção de AAV-IGF2 ou AAV-IGF1 no hipocampo de murganhos APP Tg2576 mitiga défices comportamentais, promove a formação de espinhas dendríticas e restabelece a transmissão sináptica. A injeção de IGF2, mas não de IGF1, proporciona uma redução significativa dos níveis da proteína amilóide^{5, 150}.

Inflamação

A microglia desempenha um papel crucial na homeostasia cerebral e na plasticidade neuronal. Além disso, proporciona uma neuroproteção para uma recuperação funcional de lesões traumáticas^{151,152}. Contudo, no processo patológico da DA, o peptídeo A β provo-

ca a ativação da microglia com consequente libertação de um grande número de mediadores citotóxicos inflamatórios, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a IL-1 β , a IL-6 e mediadores relacionados com o stresse oxidativo, nomeadamente EROs, espécies de nitrogénio e óxido nítrico (NO)¹⁵¹. Por consequência, esta neuroinflamação crónica pode desencadear a perda de sinapses e neurogênese, a disfunção cognitiva/motora e, eventualmente, neurodegeneração^{151,153}. Deste modo, estratégias para prevenir a neuroinflamação apresentam-se como um alvo terapêutico alternativo para as doenças neurológicas, tais como a DA¹⁵¹.

TREM2

O *Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 2* (TREM2) foi recentemente identificado como um fator de risco para o desenvolvimento de DA^{3,154}. Como o próprio nome indica, trata-se de um recetor expresso por uma variedade de células mieloides incluindo a microglia, macrófagos, monócitos, osteoclastos, células detriticas e neutrófilos¹⁵⁵. No cérebro, o TREM2 é expresso, preferencialmente, pela microglia - a principal célula imunitária do SNC¹⁵⁶.

O TREM2 medeia a fagocitose de A β pela microglia e regula a inflamação no SNC¹⁵⁶. Porém, os mecanismos exatos destes eventos biológicos ainda não estão completamente clarificados. Uma das hipóteses sugere que a deposição anormal de A β ativa o recetor TREM2¹⁵⁶, o qual, ao interagir com a sua proteína adaptadora, DAP¹², promove a fagocitose pela microglia¹⁵⁷. Uma vez ativada, a microglia participa na fagocitose de A β evitando a sua deposição e consequente

formação das placas amilóides¹⁵⁶. Além disso, como resultado da ativação do TREM2, há uma sobre-regulação da expressão de IL-4, IL-10 e de outros mediadores anti-inflamatórios que reduzem a resposta inflamatória¹⁵⁶. Todavia, como consequência de uma estimulação a longo prazo, a microglia adquire um fenótipo neurotóxico que se caracteriza pela sobreprodução de citocinas pró-inflamatórias, conduzindo, subseqüentemente, a danos neuronais e sinápticos¹⁵⁶. Novas evidências sugerem que as mutações homozigóticas no gene do TREM2 resultam em formas letais de demência progressivas, tais como a doença Nasu-Hakola e a demência fronto-temporal¹⁵⁷. Do mesmo modo, uma rara mutação missense (substituição de R47H) está associada a um aumento substancial do risco de desenvolvimento de SAD¹⁵⁷. Por conseguinte, sugere-se que a microglia necessita do TREM2 para responder à deposição de A β e limitar a neurodegeneração¹⁵⁷. Assim, estes estudos evidenciam que o TREM2 pode desempenhar um papel protetor contra a neuroinflamação¹⁵⁶.

Para clarificar o interesse do TREM2 como um potencial alvo na DA, recorreu-se ao uso de lentivírus como vetores para sobre-expressar o TREM2 no cérebro de murganhos APP^{swe}/PS1dE9 de meia idade³. Os dados desta abordagem permitiram concluir que houve uma significativa melhoria na neuropatologia relacionada com a DA³, incluindo a deposição de A β , neuroinflamação e neurodegeneração, a qual foi acompanhada por uma melhoria da função cognitiva espacial^{156,158}. No entanto, a sobre-expressão de TREM2 em murganhos APP^{swe}/PS1dE9, numa fase

avançada da doença, não melhorou a neuropatologia amilóide nem diminuiu a neurodegeneração^{3,159}. Além disso, a sobre-expressão do TREM2 não mitigou a deficiência cognitiva espacial nestes murganhos idosos com patologia similar à DA humana³. Por consequência, a proteção mediada pelo TREM2 depende parcialmente da fase da patologia, salientando assim a importância de uma intervenção precoce na doença de Alzheimer³.

ILs

As citocinas anti-inflamatórias representativas, tais como a IL-2, IL-4 e IL-10, são neuroprotetoras e, portanto, apresentam-se como um potencial alvo terapêutico no tratamento da DA e de outras doenças neurodegenerativas¹⁵¹. Os estudos científicos sugerem que estas citocinas aumentam a degradação do peptídeo A β e, conseqüentemente, possibilitam a supressão da resposta pró-inflamatória¹⁶⁰. Por conseguinte, a sinalização anti-inflamatória tem sido explorada em vários estudos com o propósito de avaliar os efeitos resultantes da terapia com ILs.

Um dos estudos realizados teve por base a administração no cérebro de murganhos APP/PS1dE9 de um vetor AAV que expressa o gene da IL-2, o qual aumentou a plasticidade sináptica³, restaurou a densidade das espinhas dendríticas e aumentou a memória^{3,161}. Além disso, os resultados indicam que a administração de baixas doses de IL-2 é segura. Assim, destaca-se o seu potencial no tratamento da DA³.

Quanto aos tratamentos com IL-4 e IL-10 os resultados foram controversos. A introdução do gene IL-4 no hipocampo

através do vetor AAV em murganhos APP/PS1 suprimiu parcialmente a acumulação glial, a patologia A β e melhorou a neurogênese^{3,162}. Adicionalmente, as injeções intracranianas de um vetor AAV expressando a IL-4 no córtex frontal e hipocampo de murganhos transgênicos APP/PS1 com três meses de idade reduziu o A β solúvel e insolúvel após três meses de tratamento^{3,163}. Estes estudos sugerem uma nova abordagem para o tratamento da DA através da modulação das cascatas de sinalização anti-inflamatórias³. Contudo, um estudo anterior utilizou um vetor AAV semelhante para expressar a IL-4 no hipocampo de murganhos transgênicos APP TgCRND8¹⁶⁴, tendo sido verificado uma exacerbação da deposição amiloide, seis semanas após a injeção^{3,164}.

A expressão neuronal mediada por AAV do gene murino da IL-10 no hipocampo dos murganhos APP/PS1 demonstrou eficácia na supressão da astrogliose e na melhoria da disfunção cognitiva e da neurogênese^{3,165}. Em contraste, resultados recentes mostraram que a utilização de um sistema de entrega AAV2/1 diferente para a IL-10 obteve resultados opostos, reportando um aumento da carga da placa amiloide, exacerbação do comprometimento da memória e redução das proteínas sinápticas em dois modelos transgênicos de APP, murganhos TgCRND8 e murganhos Tg2576^{3,166}. Os resultados divergentes poder-se-ão dever ao facto de os estudos terem recorrido a diferentes modelos animais ou a diferentes regimes posológicos³.

No conjunto, estes resultados sugerem que a IL-4 e a IL-10 podem representar possíveis alvos para o tratamento da DA. Todavia, são necessários mais estu-

dos pré-clínicos para elucidar o tipo de intervenção, o seu tempo e qual o sistema de entrega³.

TNF- α

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória¹⁶⁷ produzida por diferentes tipos de células, tais como macrófagos, células linfóides, células endoteliais, neurónios e glia³. Esta citocina desempenha um papel fisiopatológico no desenvolvimento da DA³. De realçar que os doentes com DA apresentam níveis mais elevados de TNF- α e dos respetivos recetores, o recetor do fator de necrose tumoral 1 (TNF-RI) e o recetor do fator de necrose tumoral 2 (TNF-RII)³.

O TNF- α aumenta a produção de outras citocinas inflamatórias que podem contribuir para o desenvolvimento do estado de inflamação crónica¹⁶⁷. Além disso, foi demonstrado que em culturas primárias de astrócitos de rato o TNF- α estimula tanto a expressão da BACE1 como a atividade da γ -secretase, o que, conseqüentemente, provoca uma libertação de grandes quantidades do peptídeo A β ¹⁶⁷.

Em estudos pré-clínicos, concluiu-se que a ablação do gene do Tnf- α em murghanos APP23 e 3xTgAD resultou tanto numa diminuição da inflamação cerebral e da carga amiloide, como numa redução da patologia de tau^{3,168}. Portanto, esta estratégia permite inibir a amiloidogénese e reduzir a microgliose (no córtex e no hipocampo) prevenindo défices de aprendizagem e de memória¹⁶⁸. Desta forma, o TNF-RI é um potencial novo alvo terapêutico para o tratamento da DA³. Por outro lado, a administração intraventricular de anticorpos monoclonais anti-TNF- α em murghanos APP/

PS1 envelhecidos demonstrou uma redução da deposição da placa amilóide³. Estes resultados sugerem que o TNF- α representa um alvo apropriado para promover a depuração amiloide e modular a microgliose³. Além disso, a administração hipocampal de AAV expressando Tnf- α em murghanos 3XTgAD com 2 meses de idade melhorou a ativação local da microglia, aumentou os níveis intracelulares da patologia A β e da patologia tau e, subseqüentemente, a morte de células neuronais^{3,169}. Pelo contrário, a expressão de TNF- α mediada pelo vetor AAV em murghanos TgCRND8 (quatro meses de idade) resultou numa atenuação da amiloidose^{3,170}. Estes resultados controversos podem ser devidos a diversos graus de ativação da resposta imunitária em diferentes modelos animais transgênicos¹⁷¹. Portanto, são necessários estudos adicionais para clarificar o estado de inflamação e ativação em diferentes modelos animais e, conseqüentemente, o tempo de tratamento³.

PGRN

A progranulina (PGRN) é uma proteína multifuncional¹⁷² envolvida na embriogénese, crescimento celular, sobrevivência neuronal e inflamação^{3,173}. No cérebro, a PGRN é expressa principalmente pela microglia e pelos neurónios^{172,174}. Recentemente, diversos estudos científicos têm investigado a PGRN, devido à associação de mutações no gene que codifica esta proteína com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas¹⁷². Curiosamente, a primeira ligação entre a PGRN e a neurodegeneração¹⁷² ocorreu quando se demonstrou que as mutações heterozigóticas e homozigóticas no gene que codifica a PGRN (GRN)

estão causalmente ligadas a formas familiares de demência frontotemporal (FTD) e à doença de armazenamento lisossomal (LSD)³. Desde então, foram identificadas mais de 113 mutações no GR¹⁷². O fenótipo clínico associado a estas mutações é muito variado e inclui características que se assemelham a outras doenças neurodegenerativas, incluindo a DA^{172,174,175}. Por conseguinte, a mutação no GRN é hoje considerada como um fator de risco para a DA¹⁷². Coletivamente, estes estudos sugerem que a PGRN pode influenciar vários eventos da patologia da DA, incluindo a acumulação de A β , neuroinflamação e toxicidade^{172,176}. Assim, as estratégias para melhorar a expressão da PGRN no SNC apresentam-se como uma abordagem promissora para o tratamento da DA¹⁷². Nesse sentido, um estudo demonstrou que a expressão da PGRN mediada pelo lentivírus no murganho Tg2576 reduziu, significativamente, a deposição de placa amiloide, a inflamação no hipocampo e a perda da densidade sináptica³. Um outro estudo demonstrou que a sobre-expressão da PGRN mediada por lentivírus num modelo de murganho (5xFAD) não só reduziu a carga amiloide, como também preveniu a perda neuronal e défices de memória³.

Deste modo, estes resultados sugerem que a manipulação genética da PGRN pode levar a abordagens terapêuticas inovadoras para doenças neurodegenerativas, incluindo a DA³.

Homeostase proteica-autofagia

A autofagia representa uma via catabólica essencial e altamente conservada, que promove a degradação dos organelos

danificados e agregados proteicos potencialmente tóxicos³. O processo é iniciado com a formação de uma membrana lipídica em torno dos componentes citosólicos, denominada de fagóforo¹⁷⁷. Esta membrana pode ser originada a partir da membrana citoplasmática, do retículo endoplasmático ou da membrana externa da mitocôndria¹⁷⁷. A estrutura fechada com membrana dupla-autofagossoma é formada em consequência da fusão que ocorre entre as extremidades do fagóforo¹⁷⁷. Posteriormente, a membrana exterior do autofagossoma funde-se com um lisossoma, resultando no fagolisossoma. O conteúdo é, subsequentemente, degradado por enzimas lisossomais¹⁷⁷.

A autofagia representa um mecanismo de sobrevivência visando conservar o metabolismo celular. Contudo, nos últimos anos, tem sido implicada em várias doenças neurodegenerativas incluindo a doença de Alzheimer. Um conjunto crescente de estudos suportam a existência de uma disfunção autofágica no processo neurodegenerativo da DA¹⁷⁸. Na realidade, esta disfunção influencia a secreção de A β e pode afetar diretamente a sua acumulação intracelular e a formação de placas extracelulares de A β ¹⁷⁸. De realçar que novas evidências sugerem que o aumento dos níveis de proteínas relacionadas com a autofagia pode ter um potencial interesse terapêutico⁵. Todavia, a indução autofágica após a formação das placas e dos emaranhados não tem qualquer efeito benéfico na DA. Apenas é capaz de reduzir os níveis de A β solúvel se a indução for realizada antes do desenvolvimento da patologia¹⁷⁸.

Beclina-1

A beclina-1 desempenha um papel crucial no processo de autofagia, atuando como uma proteína chave na etapa inicial da formação do autofagossoma^{3,179}. Nos doentes com DA, os níveis da proteína beclina-1 encontram-se diminuídos nas regiões cerebrais afetadas pela doença¹⁸⁰. Para corroborar esta observação procedeu-se à redução genética da beclina-1 (BECN1) em murganhos transgênicos APP. Constatou-se que a autofagia neuronal diminuiu, provocando uma acumulação intracelular e extracelular de A β e, por último, a neurodegeneração¹⁸⁰. Estas evidências científicas sugerem que o restauro da beclina-1 e da autofagia constituem uma nova abordagem para tratar a DA⁵. Em concordância com este racional, um estudo recente demonstrou que a sobre-expressão da beclina-1, através de um vetor lentiviral, reduziu a patologia amiloide intracelular e extracelular em murganhos transgênicos APP^{3,180}. A ativação autofágica através da sobre-expressão da proteína evitou a morte das células neuronais e melhorou a eliminação dos agregados proteicos potencialmente tóxicos¹⁷⁸. Esta constatação sugere que a ativação da autofagia, mediada pela beclina-1, pode melhorar a patologia A β na DA e ser um potencial alvo molecular para o tratamento da doença^{3,180}.

P62/SQSTM1

A p62/SQSTM1, codificada pelo gene SQSTM1¹⁸¹ apresenta-se como um receptor de carga ou adaptador que atua também como uma proteína seletora de substratos¹⁸². A p62/SQSTM1 regula a entrega de organelos disfuncionais, proteínas agregadas ou mal enro-

ladas e proteínas ubiquitinadas para a degradação através da autofagia ou do proteossoma¹⁸². Nos últimos anos tem surgido como um potencial alvo para o tratamento de várias doenças, incluindo doenças neurodegenerativas como a DA¹⁸¹.

No contexto da DA, concluiu-se que os níveis de expressão da p62/SQSTM1 estão diminuídos^{3,183}. Para avaliar os efeitos da p62/SQSTM1 na DA, procedeu-se a um estudo com ratos knockout em p62/SQSTM1^{3,184}. Os resultados demonstraram uma acumulação progressiva da tau hiperfosforilada, NFT e neurodegeneração, evidenciando o papel crucial do p62/SQSTM1 na agregação proteica e sua degradação na DA^{3,184}.

Numa abordagem de terapia génica, a sobre-expressão de p62/SQSTM1 mediante injeções bilaterais de AAV nos ventrículos laterais em murganhos APP/PS1 permitiu diminuir os défices cognitivos³, os níveis de A β e a formação de placas, salientando, assim, a primeira evidência *in vivo* do turnover de A β por p62/SQSTM1³. No entanto, a janela temporal para a sobre-expressão de p62/SQSTM1 necessita de ser cuidadosamente considerada³, uma vez que o aumento da indução da autofagia após a manifestação dos défices de depuração autofágica pode exacerbar a acumulação patológica de vesículas autofágicas com os consequentes efeitos tóxicos³.

CONCLUSÃO

Atualmente, a terapia genética é utilizada na clínica para tratar a Distrofia Muscular de *Duchenne*, a Atrofia Muscular Espinal e a *Leber's Congenital Amaurosis*, uma doença ocular rara causada por uma mutação no gene RPE65³. Adicional-

mente, estão em curso ensaios clínicos promissores visando o tratamento da adrenoleucodistrofia cerebral e da amiloidose hereditária ATTR (hATTR) com polineuropatia, o que demonstra, claramente, o potencial da terapia genética para modificar o curso de doenças neurológicas³.

No que concerne à DA e atendendo ao impacto deletério desta doença, é crucial a existência de uma terapêutica que possibilite modificar o curso da doença ou, idealmente, que atue de forma preventiva. Todavia, a possibilidade de transformar uma doença fatal numa doença tratável e curável constitui ainda um grande desafio. No entanto, a melhoria do conhecimento acerca da fisiopatologia da DA tem permitido identificar novos alvos terapêuticos e alavancar novas estratégias terapêuticas. Nesse sentido, a terapia génica tem sido explorada na investigação pré-clínica e clínica perspetivando reverter os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à DA. Esta terapia apresenta um elevado potencial para mitigar, de uma forma focada e personalizada, um ou vários hallmarks da DA e, assim, prevenir, ou até mesmo curar, esta doença tão debilitante. Tendo em conta os ensaios pré-clínicos e clínicos expostos nesta dissertação, a terapia genica apresenta um elevado potencial de originar um tratamento modificador da Doença de Alzheimer num futuro próximo.

Por último, é da responsabilidade da comunidade científica, perante os milhões de doentes que sofrem ou sofrerão desta doença devastadora, ser suficientemente corajosa para aprofundar outras linhas de investigação fora das atuais hipóteses conhecidas da doença e mergulhar

em novas perspetivas promissoras capazes de tratar esta doença, atualmente incurável.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do Programa Operacional Regional Centro 2020 no âmbito do projeto CENTRO-01-0145-FEDER-000012 (HealthyAging2020) e através do COMPETE 2020 - Programa Operacional para a Competitividade e Internacionalização e pela FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia, no âmbito do projeto POCI-01-0145-FEDER-029369.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Graham, W. V., Bonito-Oliva, A. & Sakmar, T. P. Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annu. Rev. Med.* 68, 413–430 (2017).
2. Winblad, B. *et al.* Defeating Alzheimer's disease and other dementias: A priority for European science and society. *Lancet Neurol.* 15, 455–532 (2016).
3. Loera-Valencia, R. *et al.* Targeting Alzheimer's disease with gene and cell therapies. *J. Intern. Med.* 284, 2–36 (2018).
4. Harris, M. E., Hensley, K., Butterfield, D. A., Leedle, R. A. & Carney, J. M. Direct evidence of oxidative injury produced by the Alzheimer's β -Amyloid peptide (1-40) in cultured hippocampal neurons. *Exp. Neurol.* 131, 193–202 (1995).
5. Alves, S., Fol, R. & Cartier, N. Gene Therapy Strategies for Alzheimer's Disease: An Overview. *Hum. Gene Ther.* 27, 100–107 (2016).
6. Shao, W., Peng, D. & Wang, X. Genetics of Alzheimer's disease: From pathogenesis to clinical usage. *J. Clin. Neurosci.* 45, 1–8 (2017).

7. Hofman, A. *et al.* The prevalence of dementia in Europe: A collaborative study of 1980-1990 findings. *Int. J. Epidemiol.* 20, 736–748 (1991).
8. Santana, I., Farinha, F., Freitas, S., Rodrigues, V. & Carvalho, Á. Epidemiologia da Demência e da Doença de Alzheimer em Portugal: Estimativas da Prevalência e dos Encargos Financeiros com a Medicação. *Acta Med. Port.* 28, 182 (2015).
9. Anderson, W. F. Gene therapy. *Sci. Am.* 273, 124–128 (1995).
10. Ferreira, S. & Massano, J. Terapêutica farmacológica na doença de Alzheimer: Progressos e esperanças futuras. *Arq. Med.* 27, 65–86 (2013).
11. Bolognesi, M. L., Matera, R., Minarini, A., Rosini, M. & Melchiorre, C. Alzheimer's disease: new approaches to drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 303–308 (2009).
12. Kumar, S. & Reddy, P. H. Are circulating microRNAs peripheral biomarkers for Alzheimer's disease? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1862, 1617–1627 (2016).
13. Alberdi, A., Aztiria, A. & Basarab, A. On the early diagnosis of Alzheimer's Disease from multimodal signals: A survey. *Artif. Intell. Med.* 71, 1–29 (2016).
14. Karch, C. M. & Goate, A. M. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol. Psychiatry* 77, 43–51 (2015).
15. De Falco, A., Cukierman, D. S., Hauser-Davis, R. A. & Rey, N. A. Doença de Alzheimer: Hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. *Quim. Nova* 39, 63–80 (2016).
16. Hanafy, A. S., Schoch, S. & Lamprecht, A. CRISPR/CAS9 delivery potentials in alzheimer's disease management: A mini review. *Pharmaceutics* 12, 1–14 (2020).
17. McCartney, D. L. *et al.* Investigating the relationship between DNA methylation age acceleration and risk factors for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement. Diagnosis, Assess. Dis. Monit.* 10, 429–437 (2018).
18. Tozzo, P., Zullo, S. & Caenazzo, L. Science runs and the debate brakes: Somatic gene-editing as a new tool for gender-specific medicine in alzheimer's disease. *Brain Sci.* 10, 1–11 (2020).
19. Hasanpour, M. *et al.* The Dynamics of Neurosteroids and Sex-Related Hormones in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *NeuroMolecular Med.* 20, 215–224 (2018).
20. Caruso, A. *et al.* Stress as risk factor for Alzheimer's disease. *Pharmacol. Res.* 132, 130–134 (2018).
21. Medina, M., Khachaturian, Z. S., Rossor, M., Avila, J. & Cedazo-Minguez, A. Toward common mechanisms for risk factors in Alzheimer's syndrome. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* 3, 571–578 (2017).
22. Yamazaki, Y., Painter, M. M., Bu, G. & Kanekiyo, T. Apolipoprotein E as a Therapeutic Target in Alzheimer's Disease: A Review of Basic Research and Clinical Evidence. *CNS Drugs* 30, 773–789 (2016).
23. Lambert, J. C. *et al.* Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 45, 1452–1458 (2013).
24. Van Cauwenberghe, C., Van Broeckhoven, C. & Sleegers, K. The genetic landscape of Alzheimer disease: Clinical implications and perspectives. *Genet.*

Med. 18, 421–430 (2016).

25. Querfurth, H. W. & Laferla, F. M. Alzheimer's Disease. 329–344 (2018).

26. Oostveen, W. & Lange, E. Imaging Techniques in Alzheimer's Disease: A Review of Applications in Early Diagnosis and Longitudinal Monitoring. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2110 (2021).

27. O'Brien, R. J. & Wong, P. C. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 185–204 (2011).

28. Tiwari, S., Venkata, A., Kaushik, A., Adriana, Y. & Nair, M. Alzheimer's Disease Diagnostics And Therapeutics Market. *Int J Nanomedicine* . Jul 2019, 5541–5554 (2019).

29. Capell, A. *et al.* Maturation and pro-peptide cleavage of β -secretase. *J. Biol. Chem.* 275, 30849–30854 (2000).

30. LaFerla, F. M., Green, K. N. & Oddo, S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 499–509 (2007).

31. Zhang, H., Ma, Q., Zhang, Y. W. & Xu, H. Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* 120, 9–21 (2012).

32. Puzzo, D. *et al.* Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann. Neurol.* 69, 819–830 (2011).

33. Kimberly, W. T., Zheng, J. B., Guénette, S. Y. & Selkoe, D. J. The Intracellular Domain of the β -Amyloid Precursor Protein Is Stabilized by Fe65 and Translocates to the Nucleus in a Notch-like Manner. *J. Biol. Chem.* 276, 40288–40292 (2001).

34. Iwata, N. *et al.* Identification of the major A β 1-42-degrading catabolic path-

way in brain parenchyma: Suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat. Med.* 6, 143–150 (2000).

35. KELL, and PEX. *FASEB J.* 11, 355–364 (2017).

36. Kurochkin, I. V. & Goto, S. Alzheimer's β -amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett.* 345, 33–37 (1994).

37. Hu, J., Igarashi, A., Kamata, M. & Nakagawa, H. Angiotensin-converting Enzyme Degrades Alzheimer Amyloid β -Peptide (A β); Retards A β Aggregation, Deposition, Fibril Formation; and Inhibits Cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 276, 47863–47868 (2001).

38. Nalivaeva, N. N., Beckett, C., Belyaev, N. D. & Turner, A. J. Are amyloid-degrading enzymes viable therapeutic targets in Alzheimer's disease? *J. Neurochem.* 120, 167–185 (2012).

39. Deane, R. & Zlokovic, B. Role of the Blood-Brain Barrier in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res.* 4, 191–197 (2007).

40. Eftekharzadeh, B. *et al.* Tau Protein Disrupts Nucleocytoplasmic Transport in Alzheimer's Disease. *Neuron* 99, 925-940.e7 (2018).

41. Council, M. R., Road, H. & Kingdom, U. Eurodegenerative auopathies. *Genetics* 1121–1161 (2001).

42. De Strooper, B. & Woodgett, J. Alzheimer's disease: Mental plaque removal. *Nature* 423, 392–393 (2003).

43. Galimberti, D. & Scarpini, E. Neurodegenerative diseases: Clinical aspects, molecular genetics and biomarkers. *Neurodegener. Dis. Clin. Asp. Mol. Genet.*

Biomarkers 1–407 (2018).

44. Suzhen, D., Yale, D., Feng, G., Yinghe, H. & Zheng, Z. Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a re-evaluation of amyloid cascade hypothesis. *Transl. Neurodegener.* 1, 18 (2012).

45. Wang, Y. *et al.* TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell* 160, 1061–1071 (2015).

46. Webers, A., Heneka, M. T. & Gleeson, P. A. The role of innate immune responses and neuroinflammation in amyloid accumulation and progression of Alzheimer's disease. *Immunol. Cell Biol.* 98, 28–41 (2020).

47. Ransohoff, R. M. & Brown, M. A. Innate immunity in the central nervous system Find the latest version : Review series Innate immunity in the central nervous system. *J. Clin. Invest.* 122, 1164–1171 (2012).

48. Heneka, M. T., Kummer, M. P. & Latz, E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 463–477 (2014).

49. Frenkel, D., Trudler, D. & Farfara, D. Toll-like receptors expression and signaling in glia cells in neuro-amyloidogenic diseases: Towards future therapeutic application. *Mediators Inflamm.* 2010, (2010).

50. Ji, K., Akgul, G., Wollmuth, L. P. & Tsirka, S. E. Microglia Actively Regulate the Number of Functional Synapses. *PLoS One* 8, (2013).

51. Tarasoff-Conway, J. M. *et al.* Clearance systems in the brain - Implications for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 457–470 (2015).

52. Scheuner, D. *et al.* Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2, 864–870 (1996).

53. Lee, C. Y. D. & Landreth, G. E. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J. Neural Transm.* 117, 949–960 (2010).

54. Heneka, M. T. *et al.* Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 14, 388–405 (2015).

55. Hickman, S. E., Allison, E. K. & El Khoury, J. Microglial dysfunction and defective β -amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J. Neurosci.* 28, 8354–8360 (2008).

56. Machado, A. P. R., Carvalho, I. O. & Rocha Sobrinho, H. M. da. Neuroinflamação Na Doença De Alzheimer. *Rev. Bras. Mil. Ciências* 6, (2020).

57. Gadoth N, G. H. Oxidative Stress and Free Radical Damage in Neurology. Humana Press (2011).

58. Couturier, J. *et al.* Inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase strongly decreases cytokine production and release in peripheral blood mononuclear cells from patients with Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 21, 1217–1231 (2010).

59. Gabriel, S. Avaliação do sistema colinérgico na doença de Alzheimer. (2019).

60. Gabuzda, D., Busciglio, J., Chen, L. B., Matsudaira, P. & Yankner, B. A. Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic

- derivative. *J. Biol. Chem.* 269, 13623–13628 (1994).
61. Markesbery, W. R. The role of oxidative stress in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 56, 1449–1452 (1999).
62. Ichimura, H., Parthasarathi, K., Quadri, S., Issekutz, A. C. & Bhattacharya, J. Mechano-oxidative coupling by mitochondria induces proinflammatory responses in lung venular capillaries. *J. Clin. Invest.* 111, 691–699 (2003).
63. Hampel, H. *et al.* The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* 141, 1917–1933 (2018).
64. Bartus RT, 3rd, D. R., B, B. & AS., L. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* vol. 217 408–417 (1982).
65. Davies, P. and A. J. M. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2, 1403 (1976).
66. Whitehouse, P. J., Price, D. L., Clark, A. W., Coyle, J. T. & DeLong, M. R. Alzheimer disease: Evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann. Neurol.* 10, 122–126 (1981).
67. Nordberg, A., Alafuzoff, I. & Winblad, B. Nicotinic and muscarinic subtypes in the human brain: Changes with aging and dementia. *J. Neurosci. Res.* 31, 103–111 (1992).
68. Mesulam, M. The Cholinergic Lesion of Alzheimer's Disease: Pivotal Factor or Side Show? *Learn. Mem.* 11, 43–49 (2004).
69. Haugaard, N., Levin, R. M. & Surname, F. Regulation of the activity of choline acetyl transferase by lipoic acid. *Mol. Cell. Biochem.* 213, 61–63 (2000).
70. Abreu-Villaça, Y., Filgueiras, C. C. & Manhães, A. C. Developmental aspects of the cholinergic system. *Behav. Brain Res.* 221, 367–378 (2011).
71. Wevers, A. Localisation of pre-and postsynaptic cholinergic markers in the human brain. *Behav. Brain Res.* 221, 341–355 (2011).
72. H. Ferreira-Vieira, T., M. Guimaraes, I., R. Silva, F. & M. Ribeiro, F. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr. Neuropharmacol.* 14, 101–115 (2016).
73. Campos-Pea, V. & Antonio, M. Alzheimer Disease: The Role of A β in the Glutamatergic System. *Neurochemistry* (2014).
74. Frisardi, V., Panza, F. & Farooqui, A. A. Late-life depression and Alzheimer's disease: The glutamatergic system inside of this mirror relationship. *Brain Res. Rev.* 67, 344–355 (2011).
75. Revett, T. J., Baker, G. B., Jhamandas, J. & Kar, S. Glutamate system, amyloid β peptides and tau protein: Functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *J. Psychiatry Neurosci.* 38, 6–23 (2013).
76. Morrison, A. S. & Lyketsos, C. R. Eview the Pathophysiology of Alzheimer ' S Disease. *Adv. Stud. Nurs.* 3, 256–270 (2005).
77. Esposito, Z. *et al.* Amyloid β , glutamate, excitotoxicity in alzheimer's disease: Are we on the right track? *CNS Neurosci. Ther.* 19, 549–555 (2013).
78. Walton, H. S. & Dodd, P. R. Glutamate-glutamine cycling in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 50, 1052–1066 (2007).
79. Dabnolt, N. . Glutamate uptake.

- Prog Neurobiol 65, 1–105 (2011).
80. Gasparini, C. F. & Griffiths, L. R. The biology of the glutamatergic system and potential role in migraine. *Int. J. Biomed. Sci.* 9, 1–8 (2013).
81. Wenk, G. L., Parsons, C. G. & Danysz, W. Potential role of N-methyl-D-aspartate receptors as executors of neurodegeneration resulting from diverse insults: Focus on memantine. *Behav. Pharmacol.* 17, 411–424 (2006).
82. Danysz, W. & Parsons, C. G. Alzheimer's disease, β -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine - Searching for the connections. *Br. J. Pharmacol.* 167, 324–352 (2012).
83. Anand, P. & Singh, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Arch. Pharm. Res.* 36, 375–399 (2013).
84. Saraiva, J., Nobre, R. J. & Pereira de Almeida, L. Gene therapy for the CNS using AAVs: The impact of systemic delivery by AAV9. *J. Control. Release* 241, 94–109 (2016).
85. Costantini, L. C., Bakowska, J. C., Breakefield, X. O. & Isacson, O. Gene therapy in the CNS. *Gene Ther.* 7, 93–109 (2000).
86. Assembleia da República. Lei No 12/2005. Informação genética pessoal e informação de saúde. (2005).
87. Piguet, F., Alves, S. & Cartier, N. Clinical Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases: Past, Present, and Future. *Hum. Gene Ther.* 28, 988–1003 (2017).
88. Gardlík, R. *et al.* Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med. Sci. Monit.* 11, 110–121 (2005).
89. Chen, W., Hu, Y. & Ju, D. Gene therapy for neurodegenerative disorders: advances, insights and prospects. *Acta Pharm. Sin. B* 10, 1347–1359 (2020).
90. Nardi, N. B., Teixeira, L. A. K., Ávila da Silva, E. F. Gene Therapy. *Cien. Saude Colet.* 7, 109–116 (2002).
91. Xuenong Bo, J. V. Gene Delivery and Therapy for Neurological Disorders. *Neuromethods* (2015).
92. Mohammadinejad, R. *et al.* In vivo gene delivery mediated by non-viral vectors for cancer therapy. *J. Control. Release* 325, 249–275 (2020).
93. Vetrini, F. & Ng, P. Gene therapy with helper-dependent adenoviral vectors: Current advances and future perspectives. *Viruses* 2, 1886–1917 (2010).
94. Choudhury, S. R. *et al.* Viral vectors for therapy of neurologic diseases. *Neuropharmacology* 120, 63–80 (2017).
95. Escors, D., Breckpot, K., Aarce, F., Kochan, G., Stephenson, H. Lentiviral Vectors and Gene Therapy. (2012).
96. Bonci, D. *et al.* 'Advanced' generation lentiviruses as efficient vectors for cardiomyocyte gene transduction in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 10, 630–636 (2003).
97. O'Connor, D. M. & Boulis, N. M. Gene therapy for neurodegenerative diseases. *Trends Mol. Med.* 21, 504–512 (2015).
98. Tomatsu, S., Sawamoto, K., Chen, H.-H. & Mason, R. Gene therapy for mucopolysaccharidoses. *Mol. Genet. Metab.* 123, S140 (2018).
99. Savić, N. & Schwank, G. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Transl. Res.* 168, 15–21 (2016).
100. Mingozzi, F. & High, K. A. Thera-

peutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: Progress and challenges. *Nat. Rev. Genet.* 12, 341–355 (2011).

101. Gowing, G., Svendsen, S. & Svendsen, C. N. Ex vivo gene therapy for the treatment of neurological disorders. *Prog. Brain Res.* 230, 99–132 (2017).

102. Maguire, C. A. *et al.* Microvesicle-associated AAV vector as a novel gene delivery system. *Mol. Ther.* 20, 960–971 (2012).

103. Choong, C. J., Baba, K. & Mochizuki, H. Gene therapy for neurological disorders. *Expert Opin. Biol. Ther.* 16, 143–159 (2016).

104. Barrett, R., Ornelas, L., Yeager, N., Mandefro, B., Sahabian, A., Lenaeus, L., Targan, S.R., Svendsen, C.N., Sareen, D. Reliable generation of induced pluripotent stem cell from human lymphoblastoid cell lines. (2014).

105. Liu, Y. & Wang, D. A. Viral vector-mediated transgenic cell therapy in regenerative medicine: Safety of the process. *Expert Opin. Biol. Ther.* 15, 559–567 (2015).

106. Kawaja, M. D., Rosenberg, M. B., Yoshida, K. & Gage, F. H. Somatic gene transfer of nerve growth factor promotes the survival of axotomized septal neurons and the regeneration of their axons in adult rats. *J. Neurosci.* 12, 2849–2864 (1992).

107. Rosenberg, M. B. *et al.* Grafting genetically modified cells to the damaged brain: restorative effects of ngf expression. *Science* (80-.). 242, 1575–1578 (1988).

108. Hong, C. S., Goins, W. F., Goss, J. R., Burton, E. A. & Glorioso, J. C. Herpes simplex virus RNAi and neprilysin

gene transfer vectors reduce accumulation of Alzheimer's disease-related amyloid- β peptide in vivo. *Gene Ther.* 13, 1068–1079 (2006).

109. Zheng, H. *et al.* B-Amyloid Precursor Protein-Deficient Mice Show Reactive Gliosis and Decreased Locomotor Activity. *Cell* 81, 525–531 (1995).

110. Senechal, Y., Kelly, P. H., Cryan, J. F., Natt, F. & Dev, K. K. Amyloid precursor protein knockdown by siRNA impairs spontaneous alternation in adult mice. *J. Neurochem.* 102, 1928–1940 (2007).

111. Fol, R. *et al.* Viral gene transfer of APP_s rescues synaptic failure in an Alzheimer's disease mouse model. *Acta Neuropathol.* 131, 247–266 (2016).

112. Singer, O. *et al.* Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat. Neurosci.* 8, 1343–1349 (2005).

113. Iwata, N. *et al.* Metabolic regulation of brain A β by neprilysin. *Science* (80-.). 292, 1550–1552 (2001).

114. Takaki, Y. *et al.* Biochemical identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid β peptide in the brain. *J. Biochem.* 128, 897–902 (2000).

115. Iwata, N. *et al.* Presynaptic Localization of Neprilysin Contributes to Efficient Clearance of Amyloid- β Peptide in Mouse Brain. *J. Neurosci.* 24, 991–998 (2004).

116. Marr, R. A. *et al.* Neprilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice. *J. Neurosci.* 23, 1992–1996 (2003).

117. Rose, J. B. *et al.* Neuropeptide Y fragments derived from neprilysin processing are neuroprotective in a trans-

- genic model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 29, 1115–1125 (2009).
118. Carty, N. C. *et al.* Adeno-associated viral (AAV) serotype 5 vector mediated gene delivery of endothelin-converting enzyme reduces A β deposits in APP + PS1 transgenic mice. *Mol. Ther.* 16, 1580–1586 (2008).
119. Litvinchuk, A. *et al.* Apolipoprotein E4 Reduction with Antisense Oligonucleotides Decreases Neurodegeneration in a Tauopathy Model. *Ann. Neurol.* 89, 952–966 (2021).
120. Husain, M. A., Laurent, B. & Plourde, M. APOE and Alzheimer's Disease: From Lipid Transport to Pathopathology and Therapeutics. *Front. Neurosci.* 15, 1–15 (2021).
121. Woody, S. K. & Zhao, L. Clusterin (APOJ) in Alzheimer's Disease: An Old Molecule with a New Role. *Updat. Dement.* (2016).
122. Balcar, V. J. *et al.* Single Nucleotide Polymorphism rs11136000 of CLU Gene (Clusterin, ApoJ) and the Risk of Late-Onset Alzheimer's Disease in a Central European Population. *Neurochem. Res.* 46, 411–422 (2021).
123. Huang, Z. *et al.* Intraventricular apolipoprotein ApoJ infusion acts protectively in Traumatic Brain Injury. *J. Neurochem.* 136, 1017–1025 (2016).
124. Wilson, M. R. & Zoubeidi, A. Clusterin as a therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets* 21, 201–213 (2017).
125. Petrov, A. M. & Pikuleva, I. A. Cholesterol 24-Hydroxylation by CYP46A1: Benefits of Modulation for Brain Diseases. *Neurotherapeutics* 16, 635–648 (2019).
126. Sodero, A. O. 24S-hydroxycholesterol: Cellular effects and variations in brain diseases. *J. Neurochem.* 0–1 (2020).
127. Shibuya, Y., Chang, C. C. Y. & Chang, T. Y. ACAT1/SOAT1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Future Med. Chem.* 7, 2451–2467 (2015).
128. Tabas, I. Consequences of cellular cholesterol accumulation. *J. Clin. Invest.* 110, 905–911 (2002).
129. Chang, T. Y., Chang, C. C. Y., Ohgami, N. & Yamauchi, Y. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 129–157 (2006).
130. Chang, T. Y., Li, B. L., Chang, C. C. Y. & Urano, Y. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 297, 1–9 (2009).
131. Oddo, S. *et al.* Triple-transgenic model of Alzheimer's Disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421 (2003).
132. Bryleva, E. Y. *et al.* ACAT1 gene ablation increases 24(S)-hydroxycholesterol content in the brain and ameliorates amyloid pathology in mice with AD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 3081–3086 (2010).
133. Zhang, Y. *et al.* Cholesterol is superior to 7-ketocholesterol or 7 α -hydroxycholesterol as an allosteric activator for acyl-coenzyme A:Cholesterol acyltransferase 1. *J. Biol. Chem.* 278, 11642–11647 (2003).
134. Gu, J. Ian & Liu, F. Tau in Alzheimer's Disease: Pathological Alterations and an Attractive Therapeutic Target. *Curr. Med. Sci.* 40, 1009–1021 (2020).

135. Guo, T., Noble, W. & Hanger, D. P. Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol.* 133, 665–704 (2017).
136. Zuckerman, J. E. & Davis, M. E. Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 843–856 (2015).
137. VandeVrede, L., Boxer, A. L. & Polydoro, M. Targeting tau: Clinical trials and novel therapeutic approaches. *Neurosci. Lett.* 731, 134919 (2020).
138. DeVos, S. L. *et al.* Tau reduction prevents neuronal loss and reverses pathological tau deposition and seeding in mice with tauopathy. *Sci. Transl. Med.* 9, (2017).
139. Allen SJ, Watson JJ, D. D. The neurotrophins and their role in Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol* 9, 559–73 (2011).
140. Rodrigues, B. D. S., Kanekiyo, T. & Singh, J. Nerve Growth Factor Gene Delivery across the Blood-Brain Barrier to Reduce Beta Amyloid Accumulation in AD Mice. *Mol. Pharm.* 17, 2054–2063 (2020).
141. Aloe, L., Rocco, M. L., Bianchi, P. & Manni, L. Nerve growth factor: From the early discoveries to the potential clinical use. *J. Transl. Med.* 10, 1–15 (2012).
142. Mitra, S., Behbahani, H. & Eriksson, M. Innovative therapy for Alzheimer's disease-with focus on biodelivery of NGF. *Front. Neurosci.* 13, 1–21 (2019).
143. Castle, M. J. *et al.* Postmortem analysis in a clinical trial of AAV2-NGF gene therapy for alzheimer's disease identifies a need for improved vector delivery. *Hum. Gene Ther.* 31, 415–422 (2020).
144. Phillips, H. S., Hains, J. M., Laramee, G. R., Rosenthal, A. & Winslow, J. W. Widespread expression of BDNF but not NT3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons. *Science* (80-). 250, 290–294 (1990).
145. Ghosh, A., Carnahan, J. & Greenberg, M. E. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* (80-). 263, 1618–1623 (1994).
146. Koponen, E. *et al.* Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor *trkB* exhibit increased activation of the *trkB*-PLC γ pathway, reduced anxiety, and facilitated learning. *Mol. Cell. Neurosci.* 26, 166–181 (2004).
147. Kitiyanant, N., Kitiyanant, Y., Svendsen, C. N. & Thangnipon, W. BDNF-, IGF-1- and GDNF-secreting human neural progenitor cells rescue amyloid β -induced toxicity in cultured rat septal neurons. *Neurochem. Res.* 37, 143–152 (2012).
148. Nagahara, A. H. *et al.* Early BDNF treatment ameliorates cell loss in the entorhinal cortex of APP transgenic mice. *J. Neurosci.* 33, 15596–15602 (2013).
149. Revilla, S. *et al.* Lenti-GDNF Gene Therapy Protects Against Alzheimer's Disease-Like Neuropathology in 3xTg-AD Mice and MC65 Cells. *CNS Neurosci. Ther.* 20, 961–972 (2014).
150. Pascual-Lucas, M. *et al.* Insulin-like growth factor 2 reverses memory and synaptic deficits in APP transgenic mice. *EMBO Mol. Med.* 6, 1246–1262 (2014).
151. Kiyota, T. *et al.* AAV serotype 2/1-mediated gene delivery of anti-inflammatory interleukin-10 enhances neurogenesis and cognitive function in

- APPPS1 mice. *Gene Ther.* 19, 724–733 (2012).
152. Streit, W. J. Microglial Response to Brain Injury: A Brief Synopsis. *Toxicol. Pathol.* 28, 28–30 (2000).
153. Monje, M. L., Mizumatsu, S., Fike, J. R. & Palmer, T. D. Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nat. Med.* 8, 955–962 (2002).
154. Rraklli, V., Södersten, E., Nyman, U., Hagey, D. W. & Holmberg, J. Elevated levels of ZAC1 disrupt neurogenesis and promote rapid in vivo reprogramming. *Stem Cell Res.* 16, 1–9 (2016).
155. Jiang, T. *et al.* Upregulation of TREM2 ameliorates neuropathology and rescues spatial cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *Neuropsychopharmacology* 39, 2949–2962 (2014).
156. Zheng, H. *et al.* TREM2 in Alzheimer’s Disease: Microglial Survival and Energy Metabolism. *Front. Aging Neurosci.* 10, 1–10 (2018).
157. Karanfilian, L., Tosto, M. G. & Malki, K. The role of TREM2 in Alzheimer’s disease; evidence from transgenic mouse models. *Neurobiol. Aging* 86, 39–53 (2020).
158. Buckley, C. D., Gilroy, D. W., Serhan, C. N., Stockinger, B. & Tak, P. P. The resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 59–66 (2013).
159. Arnardottir, H. H., Dalli, J., Colas, R. A., Shinohara, M. & Serhan, C. N. Aging Delays Resolution of Acute Inflammation in Mice: Reprogramming the Host Response with Novel Nano-Proresolving Medicines. *J. Immunol.* 193, 4235–4244 (2014).
160. Chakrabarty, P. *et al.* Hippocampal expression of murine IL-4 results in exacerbation of amyloid deposition. *Mol. Neurodegener.* 7, 1–12 (2012).
161. Wang, X. *et al.* Resolution of inflammation is altered in Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s Dement.* 11, 40–50.e2 (2015).
162. Sirkis, D. W. *et al.* Rare TREM2 variants associated with Alzheimer’s disease display reduced cell surface expression. *Acta Neuropathol. Commun.* 4, 98 (2016).
163. Paloneva, J. *et al.* Mutations in two genes encoding different subunits of a receptor signaling complex result in an identical disease phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 656–662 (2002).
164. Guerreiro, R. J. *et al.* Using exome sequencing to reveal mutations in TREM2 presenting as a frontotemporal dementia-like syndrome without bone involvement. *Arch. Neurol.* 70, 78–84 (2013).
165. Wang, X., Puerta, E., Cedazo-Minguez, A., Hjorth, E. & Schultzberg, M. Insufficient Resolution Response in the Hippocampus of a Senescence-Accelerated Mouse Model — SAMP8. *J. Mol. Neurosci.* 55, 396–405 (2015).
166. Chakrabarty, P. *et al.* IL-10 Alters Immunoproteostasis in APP Mice, Increasing Plaque Burden and Worsening Cognitive Behavior. *Neuron* 85, 519–533 (2015).
167. Decourt, B., Lahiri, D. K. & Sabagh, M. N. Targeting Tumor Necrosis Factor Alpha for Alzheimer’s Disease. *Curr. Alzheimer Res.* 14, 412–425 (2016).
168. Janelins, M. C. *et al.* Early correlation of microglial activation with enhanced tumor necrosis factor-alpha and monocyte chemoattractant protein-1

expression specifically within the entorhinal cortex of triple transgenic Alzheimer's disease mice. *J. Neuroinflammation* 2, 1–12 (2005).

169. Janelins, M. C. *et al.* Chronic neuron-specific tumor necrosis factor- α expression enhances the local inflammatory environment ultimately leading to neuronal death in 3xTg-AD mice. *Am. J. Pathol.* 173, 1768–1782 (2008).

170. Chakrabarty, P., Herring, A., Ceballos-Diaz, C., Das, P. & Golde, T. E. Hippocampal expression of murine TNF results in attenuation of amyloid deposition in vivo. *Mol. Neurodegener.* 6, 1–10 (2011).

171. Schwab, C., Klegeris, A. & McGeer, P. L. Inflammation in transgenic mouse models of neurodegenerative disorders. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1802, 889–902 (2010).

172. Van Kampen, J. M. & Kay, D. G. Progranulin gene delivery reduces plaque burden and synaptic atrophy in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 12, 1–22 (2017).

173. Jian, J., Konopka, J. & Liu, C. Insights into the role of progranulin in immunity, infection, and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 93, 199–208 (2013).

174. Baker, M. *et al.* Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 442, 916–919 (2006).

175. Kelley, B. J. *et al.* Alzheimer disease-like phenotype associated with the c.154delA mutation in progranulin. *Arch. Neurol.* 67, 171–177 (2010).

176. Minami, S. S. *et al.* Progranulin protects against amyloid β 2 deposition and toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Nat. Med.* 20, 1157–1164

(2014).

177. Van Limbergen, J., Stevens, C., Nimmo, E. R., Wilson, D. C. & Satsangi, J. Autophagy: From basic science to clinical application. *Mucosal Immunol.* 2, 315–330 (2009).

178. Esteves, A. R., Filipe, F., Magalhães, J. D., Silva, D. F. & Cardoso, S. M. The Role of Beclin-1 Acetylation on Autophagic Flux in Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* 56, 5654–5670 (2019).

179. Xie, Z. & Klionsky, D. J. Autophagosome formation: Core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* 9, 1102–1109 (2007).

180. Pickford, F. *et al.* The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid β accumulation in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 2190–2199 (2008).

181. Chen, Y. *et al.* p62/SQSTM1, a Central but Unexploited Target: Advances in Its Physiological/Pathogenic Functions and Small Molecular Modulators. *J. Med. Chem.* 63, 10135–10157 (2020).

182. Itakura, E. & Mizushima, N. p62 targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *J. Cell Biol.* 192, 17–27 (2011).

183. Manuscript, A. Implications for Alzheimer's Disease. *Power* 46, 492–501 (2009).

184. Babu, J. R., Geetha, T. & Wooten, M. W. Sequestosome 1/p62 shuttles polyubiquitinated tau for proteasomal degradation. *J. Neurochem.* 94, 192–203 (2005).

185. Alvarez-Erviti, L. *et al.* Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Bio-*

- technol. 29, 341–345 (2011).
186. Hudry, E. *et al.* Gene transfer of human ApoE isoforms results in differential modulation of amyloid deposition and neurotoxicity in mouse brain. *Sci. Transl. Med.* 5, (2013).
187. Murphy, S. R. *et al.* Acat1 knock-down gene therapy decreases amyloid- β in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Ther.* 21, 1497–1506 (2013).
188. Burlot, M. A. *et al.* Cholesterol 24-hydroxylase defect is implicated in memory impairments associated with alzheimer-like Tau pathology. *Hum. Mol. Genet.* 24, 5965–5976 (2015).
189. Hudry, E. *et al.* Adeno-associated virus gene therapy with cholesterol 24-hydroxylase reduces the amyloid pathology before or after the onset of amyloid plaques in mouse models of alzheimer's disease. *Mol. Ther.* 18, 44–53 (2010).
190. Eriksson-Jönhagen, M. *et al.* Encapsulated cell biodelivery of nerve growth factor to the basal forebrain in patients with Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 33, 18–28 (2012).
191. NCT00017940. Gene Therapy for Alzheimer's Disease Clinical Trial. <https://clinicaltrials.gov/show/NCT00017940> (2001).
192. Nagahara, A. H. *et al.* Long-term reversal of cholinergic neuronal decline in aged non-human primates by lentiviral NGF gene delivery. *Exp. Neurol.* 215, 153–159 (2009).
193. Nagahara, A. H. *et al.* Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 15, 331–337 (2009).
194. Jiang, T. *et al.* TREM2 Overexpression has No Improvement on Neuropathology and Cognitive Impairment in Aging APP^{swe}/PS1^{dE9} Mice. *Mol. Neurobiol.* 54, 855–865 (2017).
195. Alves, S. *et al.* Interleukin-2 improves amyloid pathology, synaptic failure and memory in Alzheimer's disease mice. *Brain* 140, 826–842 (2017).
196. Latta, C. H. *et al.* Determining the role of IL-4 induced neuroinflammation in microglial activity and amyloid- β using BV2 microglial cells and APP/PS1 transgenic mice. *J. Neuroinflammation* 12, 1–13 (2015).
197. Kiyota, T. *et al.* CNS expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 attenuates Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP+PS1 bigenic mice. *FASEB J.* 24, 3093–3102 (2010).
198. Arrant, A. E., Onyilo, V. C., Unger, D. E. & Roberson, E. D. Progranulin gene therapy improves lysosomal dysfunction and microglial pathology associated with frontotemporal dementia and neuronal ceroid lipofuscinosis. *J. Neurosci.* 38, 2341–2358 (2018).