



Diana Filipa da Cunha Campos

A glicoproteína-P e o polimorfismo do gene ABCB1 na Doença de Alzheimer: da fisiopatologia à inovadora utilização como biomarcador

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

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Diana Filipa da Cunha Campos

A glicoproteína-P e o polimorfismo do gene ABCB1 na Doença de Alzheimer: da fisiopatologia à inovadora utilização como biomarcador

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

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Diana Filipa da Cunha Campos, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010142188, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 3 de Setembro de 2015.

(Diana Filipa da Cunha Campos)

 A Tutora

(Professora Doutora Ana Cristina Fortuna)

A Aluna
_____
(Diana Filipa da Cunha Campos)

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, à minha orientadora da monografia Professora Doutora Ana Fortuna, por toda a disponibilidade e pelo enorme apoio para a realização desta monografia.

À minha família, por me ter possibilitado a conclusão deste curso, bem como a realização deste estágio.

À D. Graça e ao Sr. Fernando, por todo o apoio ao longo destes 5 anos.

Ao João, por me apoiar nas minhas decisões e me auxiliar nas incertezas.

Às minhas colegas de curso: à Ana Bela, à Carla, à Ana Bajouco, à Joana Salgueiro pela companhia, desabafos e amizade durante estes anos.

Um Muito Obrigado a Todos.

Resumo:

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa muito comum nos dias que correm, particularmente na população idosa, que é caracterizada por uma acumulação de placas amiloides a nível cerebral com gradual perda das capacidades cognitivas. Um dos principais problemas desta doença é o facto de os sintomas só aparecerem numa fase já muito avançada, não sendo possível, até à data, reverter a lesão cerebral já desenvolvida. Vários esforços para tentar descobrir novos marcadores que permitam uma deteção mais precoce da doença, na tentativa de evitar a sua progressão, têm sido feitos.

A glicoproteína-P, expressa não só mas também na barreira hematoencefálica, parece estar envolvida no transporte dos peptídeos amiloides para o exterior do cérebro, podendo estar subjacente à fisiopatologia da doença. Assim, várias investigações têm sido conduzidas na tentativa de avaliar a atividade desta proteína de efluxo em doentes de Alzheimer, podendo, desta forma, ser usado como biomarcador da doença e, conseqüentemente, permitir um diagnóstico mais precoce. Para além disto, o gene ABCB1 que codifica esta glicoproteína é altamente polimórfico, sendo que, estudos de polimorfismos genéticos podem ser uma mais-valia para que haja desenvolvimentos nesta área da medicina neurodegenerativa.

Abstract:

Nowadays, Alzheimer's disease is a very common neurodegenerative disorder, particularly in the elderly population, which is characterized by an accumulation of amyloid plaques in the brain with progressive memory loss. One of its main problems regards the fact that the symptoms only appear in very advanced stages, making the brain injury unable to be reverted. Several investigations have been conducted with the objective of finding new biomarkers to earlier diagnose the disease.

P-glycoprotein, expressed not only but also in the blood-brain-barrier, seems to be involved in the transport of the amyloid peptides out of the brain, and therefore it has been suggested to underlie the physiopathology of the disease. Many experiments for measuring the expression and activity of this efflux transporter in the brain have been conducted in order to use P-glycoprotein as a new biomarker of the disease and, consequently, allowing an early diagnosis. Moreover, the ABCB1 gene, that codes this glycoprotein, is highly polymorphic which means that identify the various polymorphisms of this gene can probably enlighten the neurodegenerative medicine area.

Lista de Abreviaturas

ABC – ATP-binding cassette

APOE – Apolipoproteína E

APP – Peptídeo precursor amiloide

BHE – Barreira Hematoencefálica

BP_{ND} – Potencial de ligação não deslocável

DA – Doença de Alzheimer

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

LRP-1 – *Low density lipoprotein receptor-related protein 1*

MAO-B – Monoaminoxidase-B

MMSE – *Mini-mental state examination*

NFT – *Neurofibrillary tangles*

NMDA – N-metil-D-aspartato

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PET – Tomografia de Emissão de Positrões

pg-P – Glicoproteína P

PXR – Recetor X dos pregnanos

RAGE – *Advanced glycation end products receptor*

SNP – *Single nucleotide polymorphism*

SPECT – Tomografia computadorizada por emissão de um fóton único

TLR4 – *Toll-like Receptors 4*

Índice

1. Introdução	8
2. Doença de Alzheimer	9
2.1 Fisiopatologia.....	9
2.2 Manifestações Clínicas.....	12
2.3 Prevenção e Tratamento.....	13
3. Biomarcadores da Doença de Alzheimer.....	14
4. A Glicoproteína-P.....	16
4.1 A gp-P e a Doença de Alzheimer	18
4.1.1 Evidências do papel da gp-P na Doença de Alzheimer	18
4.1.2 O polimorfismo do gene ABCB1	23
5. Conclusão	26
6. Bibliografia	27

Índice de Figuras

Figura 1 Esquema comparativo entre um cérebro de um indivíduo saudável e de um doente com DA [2].....	9
Figura 2 Esquema representativo da formação de placas amiloides extracelulares [4].....	10
Figura 3 Esquema representativo da formação de NFT's intracelulares [4]	10
Figura 4 Esquema representativo da barreira hematoencefálica.....	11
Figura 5 Modelo do transporte do peptídeo amiloide β através da BHE [7]	12
Figura 6 Estrutura da glicoproteína-P [16].....	16
Figura 7 Interação da gp-P com: a) substrato; b) modulador; c) inibidor	17
Figura 8 Estrutura do verapamil	17
Figura 9 Esquema da experiência realizada para avaliação da atividade da gp-P em murganhos <i>double knockout</i> vs murganhos "normais". O gráfico A representa a % de recuperação do peptídeo A β -40 em ambos os grupos, enquanto o gráfico B se refere ao peptídeo A β -42 [12]	19
Figura 10 Esquema representativo do transporte da gp-P através da BHE, envolvendo o recetor LRPI e a gp-P [13].....	20

Índice de Tabelas

Tabela 1 Exemplos de indutores e inibidores da gp-P	17
Tabela 2 Características dos sujeitos participantes no estudo [4].....	21
Tabela 3 BP _{ND} do verapamil em ambos os grupos em estudo [4].....	22
Tabela 4 Distribuição do peptídeo A β 40 e A β 42 e expressão da gp-P no grupo experimental e no grupo controlo em várias áreas do cérebro	22
Tabela 5 Prevalência de diferentes SNP's no grupo controlo e experimental [14]	24

I. Introdução

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa muito comum, cuja fisiopatologia ainda não está totalmente esclarecida. Caracteriza-se por ter uma evolução lenta e silenciosa ao longo dos anos que culmina com o aparecimento de sintomas maioritariamente a nível intelectual, podendo, numa fase mais final da doença, culminar em dificuldades motoras. Há uma perda de capacidade cognitiva crescente, acompanhada por confusão mental, perda de memória.

De entre as várias teorias que tentam explicar a fisiopatologia da doença, aquela que tem tido maior evidência científica baseia-se na acumulação de peptídeo amiloide β a nível cerebral devido a disfunções nos sistemas de transporte desta substância ou na sua produção. Baseado neste pressuposto, há evidências que demonstram que a glicoproteína-P (gp-P), uma bomba de efluxo de extrema importância expressa em vários locais do nosso organismo, nomeadamente na barreira hematoencefálica (BHE), esteja envolvida no transporte do peptídeo do cérebro para a corrente sanguínea e por conseguinte na fisiopatologia da doença. Para além disto, pode ter um papel muito importante como biomarcador da doença. A gp-P é codificada pelo gene ABCB1, que é altamente polimórfico, cuja expressão pode também contribuir para o desenvolvimento da patologia.

A presente monografia tem como principal objetivo demonstrar, recorrendo a vários estudos quer em animais quer em humanos, a relevância da gp-P na fisiopatologia da DA, bem como a sua importância como possível biomarcador da doença, permitindo, desta forma, um diagnóstico mais precoce da doença. Para além disto, será ainda explorado o gene ABCB1 na tentativa de demonstrar quais os polimorfismos que podem contribuir para o desenvolvimento dos sintomas da DA, de forma a melhorar quer o diagnóstico quer a terapêutica.

2. Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa crônica, sendo, atualmente, considerada a forma mais prevalente de demência na população idosa [1]. O seu nome deve-se a Alois Alzheimer, médico alemão que, em 1907, descreveu a doença pela primeira vez.

A DA caracteriza-se por um declínio cognitivo irreversível, problemas de memória e alterações comportamentais. Observando a Figura 1 verifica-se que, de forma geral, em indivíduos com DA avançada há uma perda de células a nível cerebral o que conduz à redução do córtex cerebral, principalmente na zona do hipocampo responsável pela criação de novas memórias e, simultaneamente, ao aumento da

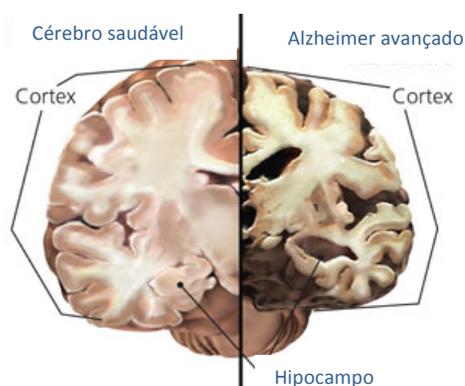


Figura 1 Esquema comparativo entre um cérebro de um indivíduo saudável e de um doente com DA [2].

dimensão dos ventrículos cerebrais que são preenchidos por líquido cefalorraquidiano (LCR) [2]. Esta deterioração mental conduz a alterações da personalidade, bem como da capacidade funcional, comprometendo a realização de tarefas diárias, havendo necessidade de um acompanhamento contínuo dos doentes de Alzheimer em estado mais avançado [1,3].

Esta doença pode ser do tipo esporádico ou familiar. O primeiro é a forma mais comum, podendo ocorrer em qualquer idade, contudo, afeta, principalmente, pessoas com idade superior a 65 anos. A DA do tipo familiar é muito menos frequente, porém a doença transmite-se de geração em geração, desenvolvendo-se normalmente entre os 40 e os 60 anos de idade [1].

A nível epidemiológico prevê-se que esta doença afete mais de 80 milhões de pessoas em 2040, sendo a prevalência maior no sexo feminino, uma vez que a sua esperança média de vida é superior [3].

2.1 Fisiopatologia

As alterações fisiopatológicas associadas à DA iniciam-se muito antes do aparecimento das manifestações clínicas da doença.

Existem várias teorias subjacentes à fisiopatologia da DA, contudo, a mais aceite relaciona-se com a acumulação de placas amiloides a nível cerebral.

A análise de cérebros *posmortem* de doentes com DA demonstra a existência, a nível cerebral, de placas amiloides extracelulares (*senile plaques*) e tranças neurofibrilares

intracelulares (*neurofibrillary tangles - NFT*), compostos por peptídeos β -amilóides e proteínas tau altamente fosforiladas [1].

A deposição de placas amilóides extracelulares parece dever-se a um desequilíbrio entre a produção e a clearance do peptídeo $A\beta$, cujo precursor é o peptídeo precursor amilóide (*APP*), levando a uma acumulação de monómeros de $A\beta$, oligómeros e finalmente, placas amilóides que se agregam no espaço entre os neurónios cerebrais (Figura 2).

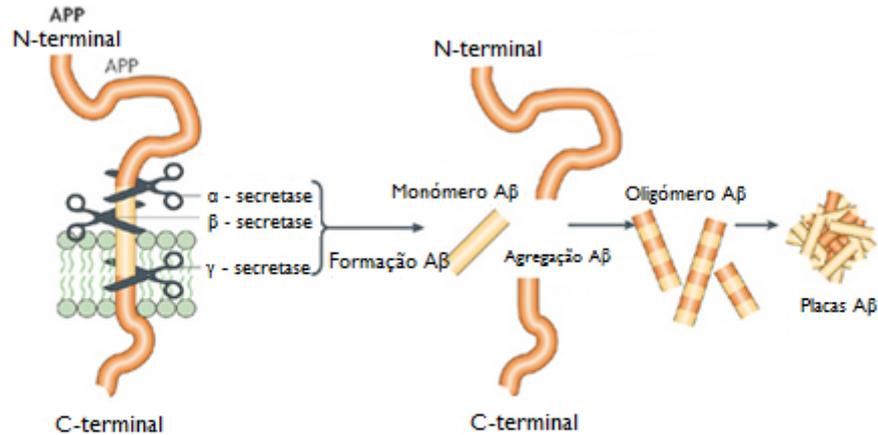


Figura 2 Esquema representativo da formação de placas amiloides extracelulares [4].

Relativamente às *NFT's*, estas resultam da hiperfosforilação da *proteína tau* (componente dos microtúbulos do citoesqueleto) que conduz à sua dissociação do citoesqueleto, assumindo uma estrutura helicoidal. Este acontecimento contribui para a formação de depósitos intracelulares, que não são mais que as designadas *NFT's* (Figura 3).

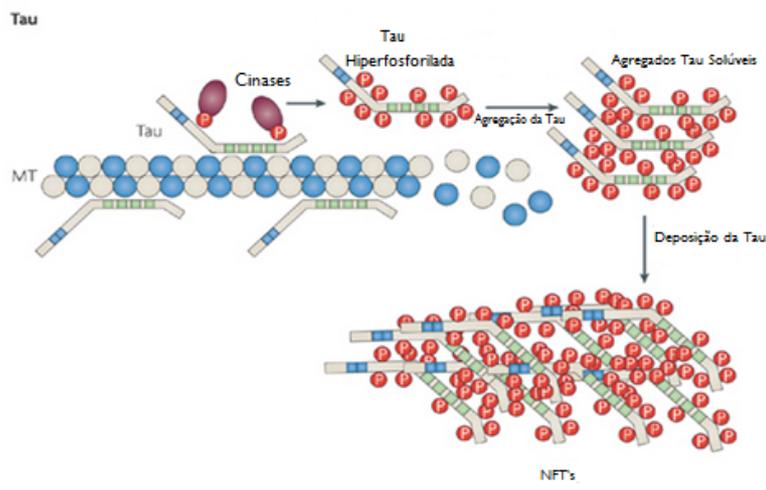


Figura 3 Esquema representativo da formação de *NFT's* intracelulares [4].

Pensa-se que uma falha na clearance do peptídeo β -amilóide do cérebro possa ter um papel importante na patogénese desta doença. Assim, caso haja um problema nos

mecanismos de eliminação deste peptídeo pode ocorrer a sua acumulação a nível cerebral com conseqüente formação das placas amiloides. Nestes mecanismos incluem-se degradação por proteases, remoção através do LCR para a corrente sanguínea, drenagem pelo sistema linfático e o transporte através da BHE [4].

A BHE é uma barreira extremamente seletiva que, tal como o nome indica, separa o

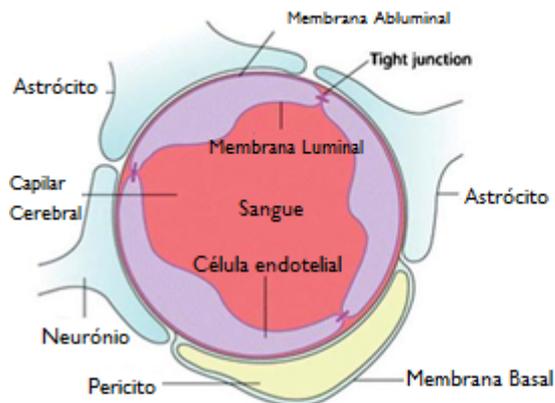


Figura 4 Esquema representativo da barreira hematoencefálica.

sistema nervoso central da corrente sistêmica. A BHE é composta por uma monocamada de células capilares endoteliais unidas através de *tight junctions* que dificultam a passagem de substâncias para o cérebro, tendo, portanto, um papel extremamente importante na proteção do cérebro de substâncias que lhe poderiam ser prejudiciais (Figura 4). Para além destas junções

entre as células endoteliais, a BHE é também constituída por astrócitos e pericitos que

comunicam com as células endoteliais, tendo um papel importante na estabilização dos vasos e comunicação entre as células [5]. Todos estes constituintes contribuem para que a BHE tenha um papel essencial na proteção do sistema nervoso central. Existem ainda mecanismos de efluxo que transportam quer substâncias endógenas quer exógenas do cérebro para a corrente sanguínea, sendo a gp-P um dos transportadores de efluxo mais expressos na BHE [4]. Sendo assim apenas a água, alguns gases, moléculas lipossolúveis que passam por difusão passiva e a glicose e aminoácidos, que atravessam por transporte seletivo mediado por determinados transportadores, conseguem ultrapassar a BHE.

Sendo assim, devido à presença das *tight junctions*, o transporte do peptídeo amiloide- β através da BHE implica o envolvimento de um transportador ou recetor específico e, desta forma, ser eliminado do SNC de modo a não se depositar, evitando a formação das placas amiloides. Enquanto o recetor de produtos finais de glicação avançados (RAGE) é o transportador responsável pela passagem do referido peptídeo da corrente sanguínea para o cérebro, o recetor de baixa densidade relacionado com a proteína I (LRP-I) faz o transporte contrário, ou seja, permite que o peptídeo amiloide β passe do cérebro para a corrente sanguínea [4].

Mais recentemente, tem sido sugerido que a gp-P também pode estar relacionada com a *clearance* do peptídeo em causa. Informação acerca da estrutura e funcionamento desta glicoproteína será dada em capítulos posteriores da presente monografia.

Existe um modelo que propõe o envolvimento da gp-P no transporte dos peptídeos amiloides, através da BHE (Figura 5).

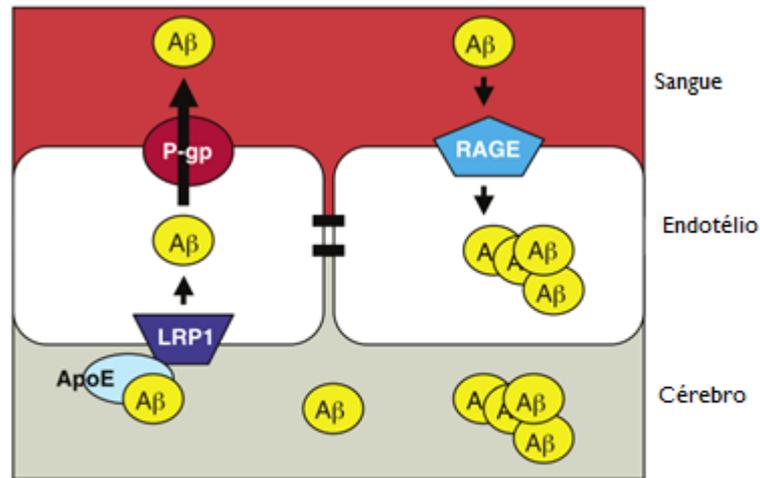


Figura 5 Modelo do transporte do peptídeo amiloide β através da BHE [7].

De acordo com esse modelo, a entrada do peptídeo no cérebro ocorre através do recetor RAGE, tal como referido anteriormente. O efluxo do peptídeo parece dever-se ao recetor LRP1 que permite a endocitose do mesmo para o interior da célula endotelial, sendo que, existem evidências de que há o envolvimento da apolipoproteína E (ApoE) para que tal ocorra. Posteriormente, o peptídeo sai da célula diretamente para a corrente sanguínea através de um transporte mediado pela gp-P que envolve gasto de energia [6].

Assim, assumindo-se esta hipótese, um decréscimo ou ausência da expressão da gp-P a nível do endotélio dos capilares cerebrais da BHE, pode promover a acumulação do peptídeo amiloide- β , havendo um risco acrescido para o desenvolvimento de DA.

2.2 Manifestações Clínicas

Os sintomas associados a esta patologia só aparecem vários anos após o início da ocorrência de alterações a nível cerebral. O ritmo ao qual a doença progride varia de indivíduo para indivíduo, não sendo previsível quando o doente irá evoluir para uma fase mais avançada da doença [7].

As manifestações clínicas desta doença, podem ser divididas em 3 fases principais. Na 1ª fase incluem-se sintomas como: perda de memória recente, problemas cognitivos ligeiros, depressão e apatia. Na 2ª fase, a perda de memória torna-se mais persistente, existindo dificuldades no reconhecimento de amigos e familiares bem como na sua própria história pessoal, podem existir distúrbios no sono, alterações de humor e de comportamento e até

mesmo dificuldades em se situar no tempo e espaço. Na 3ª fase, que corresponde a uma fase mais avançada, há perda total da capacidade de lembrar determinados acontecimentos/pessoas, perda de mobilidade, alucinações e delírios [1].

Os sintomas indicados anteriormente vão surgindo à medida que há uma maior perda de células a nível cerebral com consequente diminuição do hipocampo, o que conduz a uma deterioração da função cerebral progressiva.

2.3 Prevenção e Tratamento

Relativamente à prevenção da DA, existe falta de evidência que permita concluir que determinados fatores de risco conduzam ao desenvolvimento desta doença. Contudo, vários estudos sugerem que a toma de suplementos alimentares, dieta adequada, fatores socioeconómicos bem como a exposição ambiental podem ser fatores que afetem a incidência da DA. Para além destas, o tratamento da hipertensão arterial, ingestão de ácidos gordos ómega-3, atividade física e manutenção de atividade cognitiva têm demonstrado resultados promissores [8].

No que respeita ao tratamento farmacológico existem dois grupos farmacológicos principais: os *inibidores da acetilcolinesterase* e os *antagonistas dos recetores N-metil-D aspartato (NMDA) do glutamato*. O uso do primeiro grupo nesta patologia está associado a uma diminuição da concentração de acetilcolina nos doentes e, inibindo a enzima que a metaboliza, os inibidores da acetilcolinesterase aumentarão os níveis do neurotransmissor na fenda sináptica. Nesta classe inclui-se o donepezilo, a galantamina e a rivastigmina. Os efeitos secundários mais comuns deste tratamento são náuseas, vômitos e diarreia. O antagonista do recetor do glutamato usado é a memantina que previne uma excessiva atividade glutamatérgica sem interferir nas funções fisiológicas do glutamato, que é o principal neurotransmissor excitatório fundamental no processo de aprendizagem e memória. A memantina é usualmente associada a inibidores da acetilcolinesterase, em estadios mais avançadas da doença [8].

Para além dos grupos de fármacos referidos, outros têm sido sugeridos para serem usados no tratamento da DA. Neste grupo inclui-se a selegelina, um inibidor da monoaminoxidase do tipo B (MAO-B) com ligeiros efeitos anticolinérgicos, contudo não existe ainda evidência suficiente para o seu uso nesta patologia [8]. Os antipsicóticos, embora não estejam aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da DA, são, muitas vezes, usados como coadjuvante no tratamento dos sintomas comportamentais, tais como agressão e psicose associado a estes doentes. Os fármacos mais

usados são a olanzapina e a risperidona, mas o seu uso deve ser evitado devido à ocorrência de efeitos secundários associados aos mesmos, nomeadamente os efeitos extrapiramidais [8].

Novas terapias encontram-se sob investigação, algumas das quais serão exploradas neste trabalho. Nestas incluem-se intervenções que permitam reduzir as placas amiloides, bem como a sua formação, agentes que possam intervir diretamente com a proteína tau, o resveratrol, composto existente na casca das uvas vermelhas que tem efeitos no envelhecimento, a latrepirdina que se encontra em estudos clínicos de fase 3, pertencendo ao grupo dos antagonistas do recetor NMDA do glutamato e, ainda, agentes que possam intervir com o RAGE, com consequente redução da inflamação e da formação de placas amilóides [8].

É importante salientar que quando um doente é diagnosticado com DA deve haver uma sensibilização quer do doente quer da própria família para a doença e avaliar o estadiamento em que se encontra para se encontrar a melhor terapêutica para aquele doente e ir fazendo a reavaliação da terapêutica para verificar se está a ser eficaz.

3. Biomarcadores da Doença de Alzheimer

Apesar dos recentes estudos demonstrarem que as alterações a nível cerebral se iniciam cerca de 10 anos antes do diagnóstico de DA, este, atualmente, só é conseguido numa fase avançada da doença [1]. Por esta razão, tem-se vindo a tentar descobrir marcadores específicos da doença que permitam que o seu diagnóstico seja mais precoce e, desta forma, seja possível uma intervenção mais a montante com o objetivo de evitar o desenvolvimento da doença.

Um biomarcador ideal pode ser definido como: ser capaz de detetar uma característica específica da doença, ter uma sensibilidade e especificidade superior a 80% de forma a conseguir discriminar a DA de outras doenças, ser não invasivo, fácil de detetar e financeiramente acessível [1].

Distinguem-se biomarcadores de dois grupos principais: os genéticos e os não genéticos. Os biomarcadores genéticos, incluem mutações em 5 genes principais: gene APP, PSEN1, PSEN2, APOE e TOMM40 (*Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 40*). Mutações no gene APP, PSEN1 e PSEN2 podem conduzir a alterações no local de reconhecimento das secretases responsáveis pela clivagem do peptídeo APP, com consequente aumento do peptídeo A β ou da sua capacidade de agregação. Estas são responsáveis pelo

desenvolvimento mais precoce da doença. Mutações no gene APOE no alelo $\epsilon 4$ levam a diminuição da entrega de colesterol, resultando numa alteração da homeostasia dos lípidos, conduzindo a um aumento da deposição de $A\beta$ a nível cerebral. Esta mutação está associada à forma mais tardia da doença. Relativamente ao gene TOMM40, tem-se demonstrado que este é muito promissor para uma deteção mais precoce da DA, uma vez que disfunções mitocondriais têm vindo a ser associadas à sua fisiopatologia. Na DA, as mitocôndrias parecem permitir o influxo do peptídeo $A\beta$ para a célula cerebral através do recetor TOMM40. Este influxo tem como consequência o aumento de espécies reativas de oxigénio na célula, resultando em apoptose celular [1].

Se considerarmos que a glicoproteína-P tem um papel fundamental na *clearance* do peptídeo $A\beta$, polimorfismos no gene ABCB1 que codifica a gp-P podem, igualmente, estar associados a maior risco do desenvolvimento da DA.

Já os biomarcadores não genéticos, incluem a determinação do peptídeo $A\beta_{42}$, da proteína tau total e da proteína tau fosforilada. Estes são marcadores confiáveis da doença, contudo, não permitem a sua deteção precoce, pois apenas podem ser detetados quando já existem danos irreversíveis a nível cerebral.

Recentemente, surgiram novos biomarcadores que são capazes de permitir o diagnóstico mais precoce desta doença, tais como o cobre sérico, os microRNAs e os TLR4. Relativamente aos microRNAs, há evidência que um aumento da expressão de um gene inflamatório devido à ação de um microRNA induz o desenvolvimento e progressão da doença [1]. Está também demonstrado que os doentes com Alzheimer têm uma alteração no metabolismo normal do cobre livre no plasma que é capaz de atravessar a BHE e, por esta razão, há um excesso de cobre no LCR nos indivíduos com DA. Quanto aos recetores do tipo *Toll*, existem alguns dados que permitem inferir que o peptídeo $A\beta$ ativa as células da microglia através destes recetores, daí que seja possível a sua utilização como biomarcador.

A gp-P e a sua utilização como biomarcador da DA, como é alvo de estudo nesta monografia, será pormenorizada nos capítulos seguintes.

4. A Glicoproteína-P

A gp-P é uma glicoproteína transmembranar (Figura 6) que é codificada pelo gene de multirresistência a fármacos – o gene ABCB1. A gp-P pertence à superfamília dos transportadores *ATP-binding cassette* (ABC).

Trata-se de uma bomba de efluxo cuja atividade depende de energia na forma de ATP, desempenhando um papel importante como protetora de tecidos com funções de barreira ou secretórias, tal como o intestino delgado, o fígado e os rins. Contudo, como já salientado anteriormente, ela é também expressa na

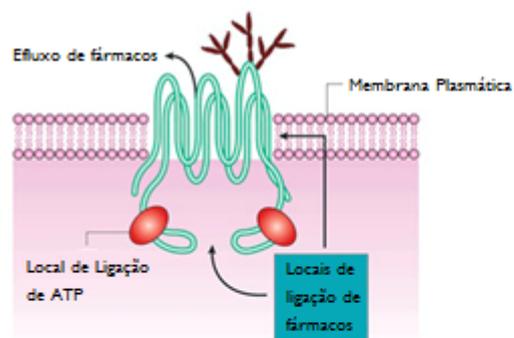


Figura 6 Estrutura da gp-P [16].

membrana luminal dos capilares cerebrais formadores da BHE, onde transporta vários compostos novamente para a corrente sanguínea, nomeadamente determinados fármacos, tais como antibióticos, esteroides, agentes de quimioterapia e muitos outros. Esta glicoproteína é, portanto, de extrema importância quer na proteção do SNC de xenobióticos, quer na desintoxicação cerebral [6,9].

Tal como foi referido na secção “Fisiopatologia da doença de Alzheimer” da presente monografia, a gp-P parece ter um papel importante no efluxo do peptídeo β -amiloide do cérebro para a corrente sanguínea. Assim, com o objetivo de detetar uma diminuição da atividade e/ou expressão da gp-P, vários substratos deste transportador têm sido propostos na tentativa de diagnosticar a doença numa fase mais precoce.

A gp-P apresenta quatro locais diferentes para interação com várias substâncias, em que 3 (I-III) são responsáveis pelo transporte de substratos e moduladores (paclitaxel, rofamina, vinblastina) e o 4º (IV) local funciona como um regulador onde se ligam vários moduladores como o XR9576 e o XR9051. Estes locais comunicam entre si, de forma que, quando um substrato se liga a um determinado local, haja uma alteração na configuração da proteína com consequente diminuição da capacidade de ligação nos outros locais [1].

Os ligandos podem ser classificados em 3 categorias principais: **substratos**, que são transportados ativamente pela bomba, sendo que a sua concentração no exterior é maior em comparação ao citoplasma; **moduladores**, que têm capacidade de alterar a afinidade dos substratos para a gp-P interagindo, para isso, num local diferente da ligação do substrato (modulação não competitiva); **inibidores**, que bloqueiam o transporte dos substratos pela

bomba [1] (Figura 7). A Tabela I evidencia alguns exemplos de inibidores e indutores da gp-P.

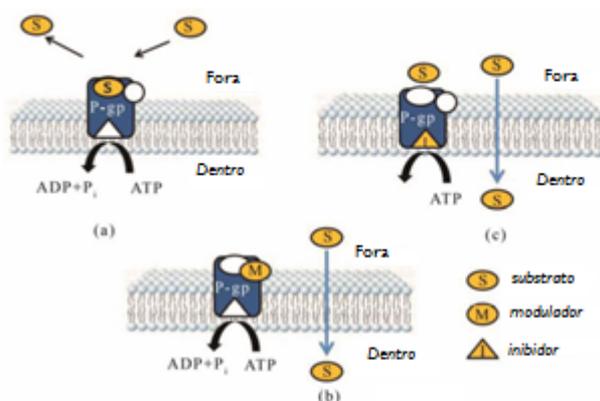


Figura 7 Interação da gp-P com: a) substrato; b) modulador; c) inibidor.

Tabela I Exemplos de indutores e inibidores da gp-P.

Inibidores	Indutores
Verapamil	Dexametasona
Ciclosporina A	Morfina
Eritromicina	Rifampicina
Estatinas	Quercetina
Progesterona	Erva de S. João

Assim, estes compostos podem ser utilizados como ferramentas na tentativa de avaliar a expressão e funcionamento da gp-P, ou seja, os substratos são muito úteis na avaliação da atividade da gp-P, enquanto os inibidores são importantes para a medir a expressão da mesma. Quanto aos moduladores, são usados para determinar a especificidade de uma determinada sonda para o seu alvo [1].

Várias sondas de tomografia de emissão de positrões (PET) têm vindo a ser desenvolvidas neste contexto, entre as quais se incluem o [11C]-verapamil e o [11C]N-desmetiloperamida como substratos e o [11C]-taraquidar e [11C]-laniquidar como inibidores. Das sondas referidas a mais utilizada em estudos experimentais é o verapamil, razão pela qual é, de uma forma muito breve, descrito seguidamente.

O verapamil (Figura 8) é um bloqueador da entrada de Ca²⁺ que é usado no tratamento da hipertensão, arritmias, angina, etc. Para além do seu uso como fármaco, tem vindo a ser desenvolvido como sonda para PET, quando marcado radioactivamente, para avaliação da atividade da gp-P. Esta molécula entra no cérebro por difusão passiva e, nas concentrações utilizadas nesta técnica, funciona como substrato da gp-P. Assim, um aumento substancial do verapamil a nível cerebral ocorre quando a atividade da bomba se encontra comprometida [4]. Embora tanto o isómero R como o S sejam substratos da gp-P, a forma R é a preferida [1], pois é menos metabolizada no organismo humano e a sua retenção no cérebro está inversamente relacionada com a atividade da gp-P. A forma mais usada para avaliar a atividade desta glicoproteína, recorrendo ao verapamil, é através da medição do

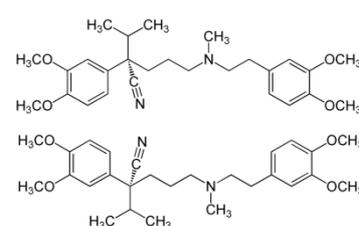


Figura 8 Estrutura do verapamil.

potencial de ligação não deslocável (BP_{ND}) do mesmo e que é inversamente proporcional à atividade da bomba de efluxo.

4.1 A gp-P e a Doença de Alzheimer

Tal como referido em capítulos anteriores, existe evidência que a gp-P possa estar envolvida na fisiopatologia da DA, uma vez que, parece auxiliar o processo de transporte de um dos principais marcadores da doença: o peptídeo $A\beta$. A evidência científica pode resumir-se, de uma forma muito simplificada, nos pontos seguintes [6]:

- i. Evidência proveniente de estudos *in vitro*: vários estudos em linhagens celulares diferentes demonstram a capacidade da gp-P transportar os peptídeos amiloides, embora estes substratos apresentem tamanhos moleculares mais elevados que os substratos típicos desta glicoproteína [10].
- ii. Evidência por observação de doentes: estudos demonstram que uma perda de gp-P ao nível da BHE conduz a um aumento da acumulação de peptídeo $A\beta$ em pessoas sem qualquer tipo de demência [7].
- iii. Evidência proveniente de estudos em animais: foi demonstrado que uma injeção de um inibidor de gp-P em ratos transgênicos, conduziu a um aumento dos níveis de peptídeo amiloide a nível cerebral [6]. Em ratos com a função da gp-P comprometida, foi demonstrado que uma intervenção farmacológica para a restaurar, conduz a um efluxo do peptídeo amiloide com redução da sua acumulação no tecido cerebral [11].
- iv. Correlação inversa entre a deposição de peptídeo amiloide e a expressão da gp-P no tecido cerebral.

4.1.1 Evidências do papel da gp-P na Doença de Alzheimer

Vários estudos quer em animais quer em humanos têm vindo a ser feitos na tentativa de avaliar e provar o papel da glicoproteína-P na fisiopatologia da doença de Alzheimer, uma vez que se pode tornar um novo biomarcador, tornando possível um diagnóstico mais precoce da doença e, desta forma, permitir que haja uma intervenção numa fase preliminar da doença, na tentativa de evitar a sua progressão. Assim, neste subcapítulo

serão abordados alguns estudos que têm vindo a ser desenvolvidos para tentar demonstrar esta teoria.

4.1.1.1 Ensaio em modelos animais

Em murganhos, a gp-P é codificada por 2 genes (*mdr1a* e *mdr1b*) que diferem 80% em relação ao gene humano correspondente (ABCB1). Assim, um duplo *knockout* dos genes destes animais conduz a uma eliminação completa da atividade da gp-P, incluindo a existente ao nível da BHE [12]. Baseados nestes pressupostos, um grupo de investigadores fez uma experiência que consistia em avaliar, em murganhos *knockout* para os genes referidos, a acumulação dos peptídeos amilóides quando estes são microinjetados diretamente no cérebro. Os resultados obtidos foram comparados com murganhos que expressam a gp-P de forma normal. Cerca de 30 minutos após a microinjeção dos respetivos peptídeos no cérebro dos animais, estes foram sacrificados e, seguidamente prosseguia-se à quantificação dos peptídeos a nível cerebral (Figura 9).

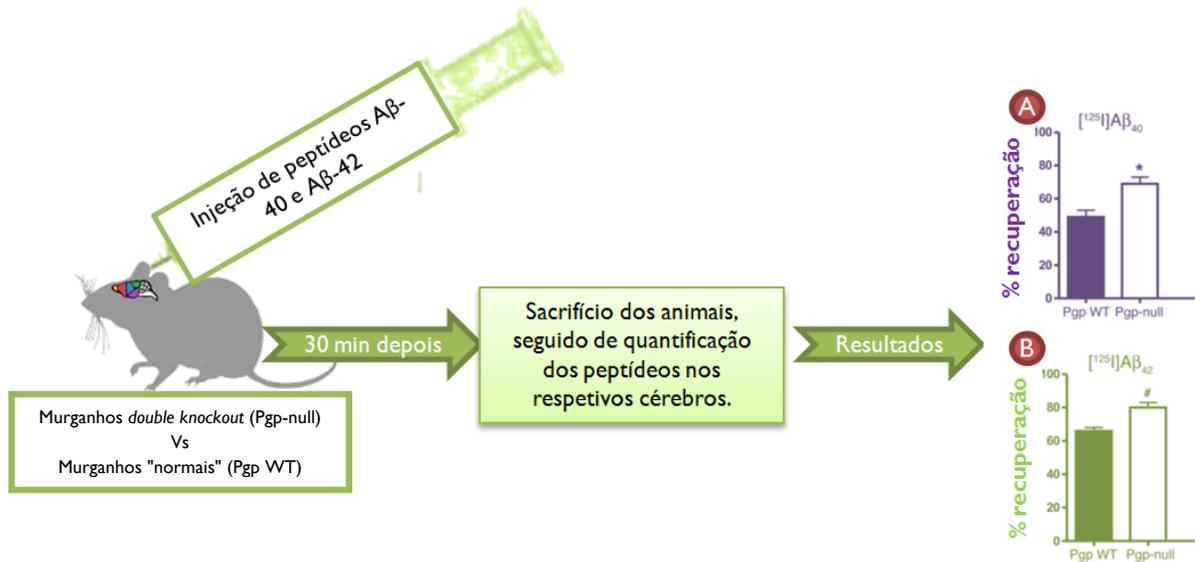


Figura 9 Esquema da experiência realizada para avaliação da atividade da Gp-P em murganhos *double knockout* vs murganhos "normais". O gráfico A representa a % de recuperação do peptídeo Aβ-40 em ambos os grupos, enquanto o gráfico B se refere ao peptídeo Aβ-42 [12].

Analisando os resultados, quer o peptídeo Aβ₄₀ quer o Aβ₄₂, encontram-se em maior quantidade no cérebro dos murganhos *double knockout*, o que nos indica que a gp-P pode ter um papel importante no efluxo destes peptídeos para o exterior do cérebro. Paralelamente a este estudo, o mesmo grupo de investigadores avaliou o efeito de administração de um inibidor (XR9576) na acumulação dos respetivos peptídeos, no qual se verificou que, nos murganhos tratados com o inibidor, a quantidade de peptídeo acumulado

no cérebro é superior em relação à encontrada nos animais tratados com inibidores, sugerindo que a modulação da atividade da bomba de efluxo pode ser uma estratégia a explorar para controlar a evolução da DA [12].

Outro estudo, realizado em murganhos, permitiu chegar às seguintes conclusões [13]:

a) A gp-P existente na BHE transporta o peptídeo A β 42. Este facto foi demonstrado recorrendo a capilares cerebrais de murganhos que foram incubados num meio contendo o peptídeo A β 42 marcado com fluoresceína. Após incubação, houve uma grande acumulação do mesmo no espaço vascular, indicando a existência de um transporte através da membrana dos capilares. O recurso a inibidores da gp-P como o verapamil e o XE9576 diminui a quantidade de peptídeo A β 42 que atravessa, sugerindo o envolvimento desta bomba de efluxo no transporte deste peptídeo. Para além disto, os autores do estudo

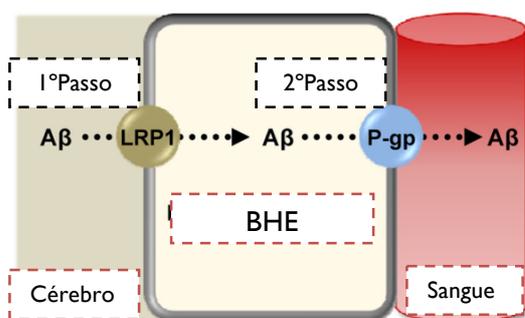


Figura 10 Esquema representativo do transporte da Gp-P através da BHE, envolvendo o recetor LRP1 e a Gp-P [13].

recorreram a inibidores do recetor LRP1 (Ko143, probenecid) verificando-se o mesmo efeito, ou seja, uma menor quantidade de peptídeo no compartimento vascular. Assim, estes resultados corroboram a teoria do envolvimento de ambos os transportadores no efluxo do peptídeo A β do cérebro (Figura 10) [13].

b) A função da gp-P encontra-se comprometida em murganhos transgênicos que sobreexpressam o APP. Para chegar a esta conclusão, os autores procederam à quantificação da expressão da gp-P em murganhos modificados geneticamente, sobreexpressando APP. Os resultados foram comparados com um grupo controlo verificando-se uma menor quantidade de peptídeo acumulado nos capilares do grupo experimental, indicando uma menor expressão/atividade da gp-P nestes murganhos [13].

c) É possível restaurar a atividade da gp-P em murganhos transgênicos, recorrendo à ativação do recetor X dos pregnanos (PXR), com conseqüente diminuição da acumulação do peptídeo A β . O mesmo grupo de investigadores demonstrou que a ativação do PXR, conduz a uma restauração da função da gp-P existente na BHE, com conseqüente diminuição dos peptídeos amiloides a nível cerebral, em murganhos que sobre-expressam o APP [13]. Esta descoberta pode contribuir para o aparecimento de novas terapêuticas para a DA, permitindo uma regressão dos sintomas associados a esta patologia.

4.1.1.2 Estudos em humanos

Num ensaio realizado em humanos, a população teste foi dividida aleatoriamente em dois grupos: o grupo experimental constituído por indivíduos com DA (n=15, dos quais 2 foram excluídos por não satisfazerem os critérios de inclusão) e o grupo controlo composto por indivíduos saudáveis (n=14) [4]. Do 1º grupo, 5 doentes tomavam inibidores da acetilcolinesterase que não interferem com a atividade da gp-P, contudo 2 consumiam antidepressivos que possivelmente são substratos desta glicoproteína. Em ambos os grupos foi avaliada a atividade da gp-P recorrendo à técnica de PET, utilizando o (R)-[11C]-verapamil como sonda. No que diz respeito às características dos grupos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, exceto no *Mini-Mental State Examination* (MMSE), que, tal como esperado, era significativamente menor no grupo experimental. Os resultados obtidos estão sumariados na Tabela 2.

Tabela 2 Características dos sujeitos participantes no estudo [4].

Características dos grupos	Grupo Controlo	Grupo Experimental	Valor P
n	14	13	
Idade (anos)	62 ± 4	65 ± 7	0,29
Sexo feminino (%)	43	23	0,29
MMSE	30 ± 1	23 ± 3	<0,000
Dose injetada de verapamil (MBq)	378 ± 31	354 ± 36	0,10
Atividade específica do verapamil (GBq/μmol)	40 ± 13	46 ± 29	0,98

Na Tabela 3 observa-se a quantidade de verapamil depositada em cada região cerebral, sendo que, nos indivíduos com DA, essa quantidade foi significativamente superior quando comparados com o grupo controlo na maioria das zonas do cérebro. Não houve diferenças significativas no lobo temporal medial nem no cerebelo.

Tabela 3 BP_{ND} do verapamil em ambos os grupos em estudo [4].

Região do cérebro	Grupo Controlo	Grupo Experimental	Valor P
Global	1,77 ± 0,41	2,18 ± 0,25	0,001
Frontal	1,79 ± 0,40	2,12 ± 0,28	0,029
Parietal	1,84 ± 0,46	2,15 ± 0,26	0,000
Temporal	1,84 ± 0,46	2,29 ± 0,27	0,000
Occipital	1,75 ± 0,38	2,20 ± 0,25	0,001
Cingulato Posterior	1,65 ± 0,30	2,20 ± 0,35	0,000
Cingulato Anterior	1,67 ± 0,50	2,06 ± 0,35	0,029
Lobo Temporal Medial	2,51 ± 0,79	2,97 ± 0,42	0,120
Cerebelo	1,87 ± 0,57	1,99 ± 0,24	0,109

Assim, os autores concluíram que há uma disfunção da atividade da gp-P em doentes com DA, o que conduz ao desenvolvimento da patologia, por esta estar associada à acumulação de um substrato transportado do interior para o exterior do cérebro com o auxílio da gp-P [4].

Outro estudo utilizou como amostra um conjunto de 30 pessoas que foram divididas em 2 grupos (um constituído por indivíduos doentes e outro por indivíduos saudáveis), os quais não exibiam diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito às características dos sujeitos em estudo.

Nesta investigação foi utilizado tecido cerebral para avaliar a expressão da gp-P nas várias regiões anatómicas do cérebro, bem como a acumulação dos peptídeos amiloides A β 40 e A β 42 [9]. Os resultados do estudo estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 Distribuição do peptídeo A β 40 e A β 42 e expressão da gp-P no grupo experimental e no grupo controlo em várias áreas do cérebro.

Grupo	Local	Peptídeo A β 40	Peptídeo A β 42	Gp-P nos capilares
Controlo	ST	132	688	1279
	HC	35	42	960
	BS	33	36	1358
Experimental	ST	986	3776	920
	HC	345	528	1192
	BS	78	83	1482

ST = córtex temporal superior; **HC** = Hipocampo; **BS** = Tronco Cerebral.

Com base nestes resultados, inferiu-se que:

- ✓ As NFT's encontraram-se em maior quantidade no grupo experimental;
- ✓ Existem diferenças na acumulação do peptídeo amiloide quando se comparam as várias zonas, sendo superior no córtex temporal superior, seguido do hipocampo e do tronco cerebral;
- ✓ Locais com elevada expressão da gp-P apresentam nenhuma ou baixa acumulação de peptídeo amiloide;
- ✓ Há uma maior expressão da gp-P no hipocampo e no tronco cerebral dos doentes de Alzheimer, enquanto nos controlos a sua expressão é maior no córtex temporal superior.

Assim, constatou-se que a expressão da gp-P é maior no tronco cerebral relativamente aos outros locais, havendo, neste local uma menor acumulação de placas senis, que é visível em ambos os grupos. Foram também demonstradas variações regionais na expressão da gp-P, em particular no tronco cerebral, que pode ter efeitos protetores contra a deposição de placas [9].

4.1.2 O polimorfismo do gene ABCB1

O gene ABCB1, responsável pela codificação da glicoproteína-P (responsável pelo transporte de substâncias do interior para o exterior das células) é altamente polimórfico, sendo conhecidas mais de 100 mutações num único nucleótico (SNP's). Apesar deste número elevado de mutações, a maioria ocorrem em intrões ou em zonas não codificantes, sendo que apenas uma minoria levam a alterações da cadeia de aminoácidos que constituem a proteína [14]. Os SNP's mais estudados atualmente são: C1236T, G2677T e C3435T.

A atividade da gp-P depende de dois parâmetros fundamentais: o grau de expressão do gene referido, que está diretamente relacionado com a quantidade de proteína que é produzida a nível celular; e a funcionalidade da bomba que determina que substratos serão reconhecidos e transportados pela mesma [15]. O primeiro parâmetro tem sido alvo de muitos estudos, uma vez que há uma correlação entre o grau de sensibilidade de células tumorais a determinados fármacos com o aumento da expressão do gene, que pode estar associado a amplificações genéticas ou à toma de indutores (ex.: rifampicina). Relativamente ao segundo parâmetro, este é definido de acordo com a sequência de aminoácidos que é codificado a partir do gene, ou seja, alterações na cadeia de aminoácidos podem interferir

com a função da gp-P. Alguns estudos nos quais se induziram mutações no gene ABCB1 demonstram que a glicoproteína reage, de uma forma muito reativa, a pequenas alterações na cadeia de aminoácidos. Estas modificações, podem, por conseguinte, alterar a capacidade de reconhecimento por parte da gp-P e, desta forma, alterar o espectro de substratos reconhecidos pela mesma. Assim, vários estudos têm sido conduzidos na tentativa de descobrir quais as mutações que ocorrem naturalmente que podem, de certa forma, conduzir a uma alteração da funcionalidade da bomba de efluxo referida [15].

Como parece haver um envolvimento desta glicoproteína na fisiopatologia da DA, alterações genéticas a este nível podem estar relacionadas com um maior risco de desenvolvimento da doença. Assim sendo, apresenta-se seguidamente um estudo [14] com o principal objetivo de identificar quais os polimorfismos associados ao aparecimento/desenvolvimento da doença.

Neste estudo, foram formados 2 grupos: um grupo controlo, composto por 32 pessoas do sexo feminino, e um grupo experimental onde se incluem 17 indivíduos com DA. Ambos foram sujeitos ao MMSE e foi avaliada a toma concomitante de medicamentos que pudessem interferir com a atividade da gp-P que foi avaliada recorrendo ao (R)-[11C]-verapamil.

A prevalência dos polimorfismos em ambos os grupos apresenta-se na Tabela 5.

Tabela 5 Prevalência de diferentes SNP's no grupo controlo e experimental [14].

		Grupo Controlo	Grupo com DA
C1236T	CC	34%	18%
	CT	34%	47%
	TT	31%	35%
G26677T/A	GG	31%	18%
	TG	31%	47%
	TT	31%	35%
C3435T	CC	25%	12%
	CT	47%	53%
	TT	28%	35%

Nos controlos, não foram encontrados efeitos dos SNP's em C1236T, G2677T e C3435T na atividade da gp-P ao nível da BHE, contudo, nos doentes com Alzheimer, estes

polimorfismos são relacionados com um aumento do BP_{ND} do (R)-[11C]-verapamil, o que sugere uma diminuição da atividade desta bomba. Assim sendo, este estudo demonstra que mutações ao nível do gene referido apenas afetam a função da gp-P quando esta já se encontra comprometida.

Contudo, existe uma questão que se coloca: “Será que a redução da expressão da gp-P ao longo do tempo conduz ao aparecimento dos sintomas da doença, ou esta diminuição está associada à acumulação do peptídeo $A\beta$ no cérebro?”. Para tentar responder a esta pergunta várias técnicas têm vindo a ser desenvolvidas de forma a utilizar-se o peptídeo $A\beta$ ou a proteína tau como ferramentas de diagnóstico da doença. Existem estudos a serem feitos na tentativa de se identificar quais os agentes terapêuticos que podem ser usados de forma que a gp-P seja uma ferramenta que favorece a eliminação do peptídeo $A\beta$ do cérebro e, desse modo, tentar reverter os sintomas da doença.

Assim, pode dizer-se que as variações genéticas no gene ABCB1 em doentes com DA podem contribuir para uma progressão da doença devido a uma redução adicional da atividade da gp-P, com conseqüente aumento da taxa de acumulação de substâncias tóxicas a nível cerebral, como é o caso do peptídeo amiloide.

5. Conclusão

A exploração da hipótese de como a gp-P contribui para a fisiopatologia da DA é, a meu ver, um futuro promissor para descoberta de novas formas de diagnóstico e tratamento da doença. O conhecimento do mecanismo exato do transporte do peptídeo amiloide através da BHE é de extrema importância para esse desenvolvimento, bem como a avaliação de como a atividade da bomba de efluxo referida pode influenciar a acumulação deste peptídeo a nível cerebral. Para além disto, o reconhecimento de quais os polimorfismos do gene responsável pela codificação desta proteína que contribuem para o desenvolvimento da doença mostram-se de extrema importância, pois podem contribuir para um diagnóstico muito mais precoce da doença, através da sequenciação do gene.

Da realização desta monografia, pode-se inferir que o facto de a gp-P parecer ter um efeito protetor na deposição de placas amiloide pode ser um ponto de partida para o desenvolvimento de novas terapêuticas para a DA. Assim, a gp-P pode funcionar como um alvo terapêutico e a sua modulação pode permitir o controlo do desenvolvimento desta patologia. Para além disto, a sua atividade também permite avaliar a propensão dos indivíduos para desenvolverem esta doença podendo ser usado, para além de agente terapêutico, como agente de diagnóstico, permitindo um diagnóstico mais precoce da doença.

Na minha opinião, esta via pode ter extrema importância para o desenvolvimento no campo das doenças neurodegenerativas e, a gp-P, pode assumir um papel crucial quer na fisiopatologia, quer na utilização como biomarcador.

6. Bibliografia

- [1] CONTINO, M., CANTORE, M., LEOPOLDO, M., COLABUFO, N. A. - **“Biomarkers for the early diagnosis of Alzheimer’s disease: The challenge of XXI century,”** *Adv. Alzheimer’s Dis.*, vol. 02, no. 1, pp. 13–30, 2013.
- [2] **“Cérebro saudável vs. cérebro com Alzheimer.”** Alzheimer’s Association. [Acedido a 7 de julho de 2015] [Online]. Disponível em: WWW.<URL:http://www.alz.org/brain_portuguese/09.asp>
- [3] BEKRIS, LYNN M., YU, C.-E., BIRD, THOMAS D., TSUANG, D. W. - **“Genetics of Alzheimer Disease”** *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.*, vol. 23, no. 4, pp. 213–227, 2010.
- [4] VAN ASSEMA, D. M. E., LUBBERINK, M., BAUER, M., VAN DER FLIE, W. M., SCHUIT, R. C., WINDHORST, A. D., COMANS, E. F. I., HOETJES, N. J., TOLBOOM, N., LANGER, O., MÜLLER, M., SCHELTENS, P., LAMMERTSMA, A. a., VAN BERCKEL, B. N. M. - **“Blood-brain barrier P-glycoprotein function in Alzheimer’s disease”**. *Brain*, vol. 135, no. 2011, pp. 181–189, 2012.
- [5] ROJAS, H., RITTER, C., PIZZOL, F. D. - **“Mecanismos de disfunção da barreira hematoencefálica no paciente criticamente enfermo: ênfase no papel das metaloproteinases de matriz,”** *Rev. Bras. Ter. Intensiva*, vol. 23, no. 2, pp. 222–227, 2011.
- [6] JEDLITSCHKY, G., VOGELGESANG, S., KROEMER, H. K. - **“MDRI-P-glycoprotein (ABCB1)-mediated disposition of amyloid- β peptides: implications for the pathogenesis and therapy of Alzheimer’s disease,”** *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 88, no. 4, pp. 441–443, 2010.
- [7] CHOICES N., **“Alzheimer’s disease - Symptoms - NHS Choices.”** [Acedido a 8 de julho de 2015]. Disponível em: WWW.<URL:http://www.nhs.uk/Conditions/Alzheimers-disease/Pages/Symptoms.aspx>
- [8] WINSLOW, B. T., ONYSKO, M. K., STOB, C. M., HAZLEWOOD, K. a. - **“Treatment of Alzheimer disease”** *Am. Fam. Physician*, vol. 83, pp. 1403–1412, 2011.
- [9] JEYNES, B., PROVIAS, J. - **“P-Glycoprotein Altered Expression in Alzheimer ’s Disease: Regional Anatomic Variability”** vol. 2013, 2013.
- [10] LAM, F. C., LIU, R., LU, P., SHAPIRO, A. B., RENOIR, J.-M., SHAROM, F. J., REINER, P. B. - **“ β -Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein”**. *J. Neurochem.*, vol. 76, no. 4, pp. 1121–1128, Dec. 2001.
- [11] ERICKSON, M., BANKS, W. - **“Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer’s disease.”** *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 33, no. April, pp. 1500–13, 2013.

- [12] CIRRITO, J. R., DEANE, R., FAGAN, A. M., SPINNER, M. L., PARSADANIAN, M., FINN, M. B., JIANG, H., PRIOR, J. L., SAGARE, A., BALES, K. R., PAUL, S. M., ZLOKOVIC, B. V, PIWNICA-WORMS, D., HOLTZMAN, D. M. - **“P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model.”**. *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 11, pp. 3285–3290, 2005.
- [13] HARTZ, A. M. S., MILLER, D. S., Bauer, B. - **“Restoring Blood-Brain Barrier P-Glycoprotein Reduces Brain Amyloid-B in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease”**. *Mol. Pharmacol.*, vol. 77, pp. 715–723, 2010.
- [14] ASSEMA, D. M., LUBBERINK, M., RIZZU, P., SWIETEN, J. C., SCHUIT, R. C., ERIKSSON, J., SCHELTENS, P., KOEPP, M., LAMMERTSMA, A. A, BERCKEL, B. N. - **“Blood--brain barrier P-glycoprotein function in healthy subjects and Alzheimer’s disease patients: effect of polymorphisms in the ABCB1 gene”**. *EJNMMI Res.*, vol. 2, p. 57, 2012.
- [15] HOFFMEYER, S., BURK, O., VON RICHTER, O., ARNOLD, H. P., BROCKMÖLLER, J., JOHNE, A., CASCORBI, I., GERLOFF, T., ROOTS, I., EICHELBAUM, M., BRINKMANN, U. - **“Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo.”**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 7, pp. 3473–8, Mar. 2000.
- [16] **“P-Glycoprotein.”** [Acedido a 21 de julho de 2015]. Disponível em: WWW.<URL:<http://flipper.diff.org/app/items/2097>>