

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS-UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Estresse oxidativo: Estudo comparativo de granulócitos humanos de doadores com doença de Alzheimer e durante o processo de envelhecimento, estimulados ou não com adrenalina.

LUCINARA MARTINS SILVA

Belo Horizonte - MG

2011

LUCINARA MARTINS SILVA

Estresse oxidativo: Estudo comparativo de granulócitos humanos de doadores com doença de Alzheimer e durante o processo de envelhecimento, estimulados ou não com adrenalina.

Dissertação apresentada ao
programa de pós-graduação em
Neurociências do Instituto de ciências
biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Neurociências.

Orientadora Profa. Dra. Miriam
Chaves Schultz.

Belo Horizonte-MG

2011

Folha de aprovação

“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice.

Colhe pois a sabedoria armazena suavidade para o amanhã.”

Leonardo da Vinci.

AGRADECIMENTOS

Com muito amor, dedico esta dissertação ao meu pai João e minha mãe Maria Helena, exemplo a seguir por toda minha vida, minhas irmãs Luciane e Mariselenia, minha fonte de incentivo em tudo que faço, ao amor da minha vida Rafael, meu companheiro em todas as horas, e toda a minha família que estão sempre ao meu lado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter colocado pessoas tão especiais em minha vida, as quais em nenhum momento pouparam esforços para que esse trabalho acontecesse.

A essas pessoas:

Agradeço a minha orientadora, professora Miriam Chaves Schultz pela confiança, paciência e credibilidade depositada em mim, e que ao longo do tempo, pude conhecer e admirá-la pelo exemplo de profissional, de pessoa, e acima de tudo, ser fonte de incentivo e exemplo a seguir.

Aos meus amigos do laboratório de imunologia e bioquímica do envelhecimento: Ana Caroline, Barbara, Flávia, Mariana, Marcela, Gil, Alexandre, Andrea, Paula, Nathálie, Fernanda, Gláucia, Sandra, Gabriela e Mônica, Clara, Paulo e todos que por lá ainda estão e passaram lhes agradeço, pois em vocês, encontrei requisitos primordiais para o sucesso em qualquer trabalho, carinho, apoio, ensinamentos, amizade, paciência, companheirismo.

A minha amigazócia e companheira Araci Penha Krauss, fonte de alegria, carinho, apoio incondicional em momentos tão difíceis da minha vida.

A professora Eliane Novato Silva, agradeço pelo carinho e incentivo.

A todos os meus colegas de mestrado, em especial Gabriela, Fernanda, Ana Carolina e Rodrigo, pelo apoio em momentos tão difíceis.

Aos meus colegas de trabalho do hospital Risoleta Tolentino Neves pela amizade, ensinamentos e incentivo.

Aos doutores Edgar Nunes de Moraes, Rodrigo Ribeiro dos Santos e Marco Túlio Gualberto Cintra, pelo apoio incondicional na execução desse trabalho.

A todos os membros do programa de pós-graduação em neurociências (professores, secretárias), em especial: a professora Maria Elena de Lima Peres Garcia, que foi fundamental na minha vida acadêmica, pois no começo, diante de tantas portas fechadas, pensei até mesmo em desistir, mas ela com seu exemplo de profissionalismo no qual não poupou esforços e me ajudou a encontrar a minha atual linha de pesquisa e orientadora.

A todos os doadores que foram fonte primordial desse trabalho.

A amiga Shirneia pelo auxílio na reta final dos meus estudos.

E por fim, a todos aqueles que não foram citados em nome aqui, mas que não deixaram de ter sua importância em minha vida, pois oraram, acreditaram, confiaram, incentivaram e me ensinaram, durante todo esse tempo, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

RESUMO

A literatura relata uma íntima relação entre o envelhecimento, estresse oxidativo e declínio do sistema imunológico no desenvolvimento da doença de Alzheimer (DA). Alguns hormônios, entre eles a adrenalina, atuam como moduladores nessa inter-relação e um possível desequilíbrio nos mecanismos de ação hormonal pode ser um fator predisponente para a evolução dessa doença. Nesse contexto, esta dissertação teve como objetivo, avaliar o efeito da adrenalina no controle ou exacerbação do estresse oxidativo em pacientes com DA ou não, durante o processo de envelhecimento. Utilizamos para o nosso estudo granulócitos humanos de dois grupos: sem DA (1) foram divididos em três faixas etárias de 20-39,40-59,60-80 anos, e com DA (2) com 60-80anos. Foram avaliados 3 protocolos: ensaios de MTT (avalia o efeito redutor celular), produção de NO (avalia a capacidade oxidativa celular) e fagocitose utilizando zimozan opsonizado com C3b (ZC3b), por microscopia óptica. Os três protocolos foram avaliados na ausência e presença de adrenalina, estimulando ou não a fagocitose por ZC3b. Para a escolha das concentrações de adrenalina avaliamos seis concentrações, onde selecionamos para cada protocolo, aquelas que apresentaram viabilidade celular maior que 95%, e potencialização do efeito em relação ao controle. De acordo com os resultados apresentados, foi concluído que, durante o processo de envelhecimento, ocorreu uma diminuição da fagocitose, capacidade antioxidante e imunoprotetora. Na comparação da DA em relação a doadores da mesma faixa etária, apresentaram um maior efeito redutor celular e diminuição da produção de NO e uma fagocitose semelhante. O desafio com adrenalina demonstrou que apresenta influência no circuito neuroimunoendócrino durante o envelhecimento e que pode ser um fator preponderante para o aparecimento de patologias como DA.

Palavras chave: envelhecimento, estresse oxidativo, Alzheimer, fagocitose, adrenalina.

ABSTRACT

Many authors have related aging, oxidative stress and a decline in the immune system throughout the Alzheimer's Disease (DA). Some hormones, for example the adrenaline, act as modulators in this related system and an imbalance in hormonal action mechanisms can be a factor for the predisposition in the Alzheimer's Disease evolution. In this context, the objective of this dissertation was to evaluate the adrenaline's effect in the control and exacerbation of the oxidative stress in patients with or without the Alzheimer's Disease during the aging process. Human granulocytes were used and divided into 2 groups: with the DA (1) divided in three age groups: 20-39, 40-59, 60-80 and with DA (2) from 60-80 years old. Three protocols were evaluated: MTT assays (evaluates the cellular reduction system), NO production (evaluates cellular oxidative capacity) and phagocytosis with zimosan opsonized with C3B (ZC3b), by optical microscopy. The three protocols were evaluated in presence and absence of adrenaline, stimulating or not phagocytosis by ZC3b. The adrenaline concentrations chosen were determined through a dose-response curve among six concentrations, which presented a cellular viability of 95% and potential effect. According to the presented results, it was concluded that during the aging process phagocytosis, antioxidant capacity and immune protection were declined. In comparison to DA, donors of the same age group presented a higher cellular reduction capacity and a diminished production of NO, but with similar phagocytosis. The challenge with adrenaline demonstrated its influence in the neuro-immune-endocrine system during aging being a preponderant factor for the emergence of pathologies such as DA.

Key words: aging, oxidative stress, Alzheimer, phagocytosis, adrenaline.

LISTA DE ABREVIATURAS

A β = Proteína beta amilóide

AD = Adrenalina

COEP = Comitê de ética em pesquisa

DA = Doença de Alzheimer

D = densidade

DO = Densidade óptica

EO = Estresse oxidativo

G = Granulócitos

HC = Hospital das clínicas

HCl = Ácido clorídrico

M = Molar

MEEM = Mini exame do estado mental

Min = minuto

μ L = Microlitro

KH₂PO₄= Hidrogenato de Potássio

MTT = (3-(4-(5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolin bromide

NaCl= Cloreto de sódio

NaHPO₄=Fosfato de sódio

NaOH= Hidróxido de sódio

NO = Óxido Nítrico

NOS = Óxido nítrico sintase

NOS_c = Óxido Nítrico sintase constitutivo

NOS_i = Óxido nítrico sintase indutivo

ONOO⁻=Peróxido nitrito

OMS = Organização mundial de saúde

nm= nanômetro

PBS = Solução salina tamponada

PNMT = Feniletanolamina N-metiltransferase

RNI = Intermediários reativos de nitrogênio

ROI = Intermediário reativos de oxigênio

Rpm= Rotações por minuto

RPMI = Meio de cultivo celular

SCMBH =Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte

UFMG = Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Mecanismo de formação e eliminação das ERN e ERO	27
Figura 02: Vias de modulação neural da inflamação	33
Figura 03: Testes para avaliação do declínio cognitivo.....	46
Figura 04: Testes para avaliação incapacidade funcional.....	48
Figura 05: Comparação qualitativa da fagocitose (G+ZC3b) em diferentes faixas etárias A- (20- 39anos), B - (40-59anos) e C - (60-89anos) sem estímulo com Adrenalina (AD)	55
Figura 06: Comparação da porcentagem de fagocitose (G+RPMI+ZC3b) em diferentes faixas etárias (20-39anos), (40-59anos), (60-89anos) sem estímulo com AD.....	56
Figura 07: Comparação qualitativa da fagocitose (G+ZC3b) entre células de doadores com (K) ou em (J) Alzheimer (DA) na faixa etária de (60-89anos) sem estímulo com Adrenalina (AD).....	57
Figura 08: Comparação da porcentagem de fagocitose (G+RPMI+ZC3b) em células de doadores com e sem Alzheimer na faixa etária de 60-89 anos em ausência de adrenalina(AD).....	58
Figura 09: Comparação qualitativa da fagocitose (G+ZC3b) em diferentes faixas etárias D e G(20-39anos), E e H -(40-59anos)eF e I - (60-89anos) estimuladas com Adrenalina (AD - $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$ e $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$).....	60
Figura 10: Comparação qualitativa da fagocitose (G+ZC3b) em granulócitos de doadores sem e com Alzheimer (DA) estimuladas com Adrenalina (AD - $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$ e $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$).....	63
Figura 11: Estudo do poder redutor de granulócitos em ausência e presença de zimozan opsonizado por C3b pelo ensaio de MTT em diferentes faixas etárias. O painel (A) representa a faixa etária 20-39 anos, (B) 40-59 e (C) 60-89 anos.....	66
Figura 12: Estudo do efeito redutor celular em doadores na faixa etária de 60-89 anos sem e com Alzheimer (DA).....	68
Figura 13: Estudo do poder redutor de granulócitos em presença de adrenalina 10^{-9}M pelo ensaio de MTT em três faixas etárias.....	69

Figura 14: Avaliação do poder redutor de granulócitos em presença de adrenalina 10^{-9} M pelo ensaio de MTT durante o processo de envelhecimento.....	70
Figura 15: Estudo do efeito redutor celular em doadores na faixa etária de 60-89 anos sem e com Alzheimer (DA) em presença de adrenalina 10^{-9} M.....	71
Figura 16: Estudo do poder redutor de granulócitos em presença de adrenalina 10^{-8} M pelo ensaio de MTT em três faixas etárias	72
Figura 17: Avaliação do poder redutor de granulócitos em presença de adrenalina 10^{-8} M pelo ensaio de MTTdurante o processo de envelhecimento.....	73
Figura 18: Estudo do efeito redutor celular em doadores na faixa etária de 60-89 anos sem e com Alzheimer (DA) em presença de adrenalina 10^{-8} M.....	74
Figura 19: Estudo da produção do óxido nítrico por granulócitos durante o processo fagocíticoem três faixas etárias.....	75
Figura 20: Estudo da produção de óxido nítrico por granulócitos em presença de adrenalina $1,7 \times 10^{-8}$ M.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Disposição dos grupos por faixa etária e protocolos	43
Tabela 02: Conteúdos para avaliação MTT	50
Tabela 03: Conteúdos para avaliação NO	51
Tabela 04: Conteúdos para microscopia óptica.....	53
Tabela 05: Efeito das concentrações de adrenalina ($1,7 \times 10^{-9} \text{M}$ e $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$) sobre a fagocitose de granulócitos durante o processo de envelhecimento	62
Tabela 06: Efeito das concentrações de adrenalina ($1,7 \times 10^{-9}$ e $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$) sobre a fagocitose de granulócitos de doadores sem e com Alzheimer.....	65
Tabela 07: Avaliação comparativa da capacidade redutora de granulócitos nas faixas etárias de 20-39,40-59 e 60-80 anos, através do teste de MTT.....	67
Tabela 08: Avaliação comparativa da produção de óxido nítrico por granulócitos nas faixas etárias de 20-39,40-59 e 60-80 anos.....	76
Tabela 09: Avaliação comparativa da produção de óxido nítrico por granulócitos de doadores sem e com Alzheimer.....	77
Tabela 10: Estudo da produção de óxido nítrico por granulócitos de doadores em presença de adrenalina $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$	79
Tabela 11: Estudo da produção de óxido nítrico por granulócitos de doadores sem e com Alzheimer em presença de adrenalina $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$	80
Tabela 12: Estudo da produção de óxido nítrico por granulócitos de doadores em presença de adrenalina $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$	82
Tabela 13: Estudo da produção de óxido nítrico por granulócitos de doadores sem e com Alzheimer em presença de adrenalina $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$	83

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	23
2-OBJETIVOS	37
2.1- Objetivo Geral	36
2.1.1- <i>Objetivos Específicos</i>	37
3-MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1- Materiais e equipamentos	40
3.1.1- <i>Protocolo coleta de sangue</i>	40
3.1.2- <i>Protocolo MTT</i>	40
3.1.3- <i>Protocolo de Separação de Sangue</i>	40
3.1.4- <i>Protocolo Óxido Nítrico</i>	40
3.1.5- <i>Protocolo Microscopia</i>	40
3.2- Reagentes	41
3.3- Soluções	42
3.3.1- <i>Solução salina de PBS</i>	42
3.3.2- <i>RPMI</i>	42
3.3.3- <i>Gradiente de separação de células</i>	42
3.3.4- <i>Azul de Tripán</i>	42
3.3.5- <i>Solução de sulfanilamida 1%</i>	42
3.3.6- <i>Solução de nifitiletlenodiamida 0,1%</i>	42

3.3.7-Solução de Griess.....	
3.4- Comitê de Ética.....	43
3.5-Seleção de Doadores.....	43
3.5.1-Critérios de Inclusão e Exclusão.....	44
3.5.1.1- <u>Grupo Alzheimer</u>	48
3.5.1.2- <u>Grupo Controle</u>	48
3.6-Escolha das concentrações de Adrenalina.....	48
3.7- Coleta de Sangue.....	49
3.8- Separação Celular.....	49
3.9- Opsonização Zimozan (ZC3b).....	49
3.10-Ensaio de MTT.....	50
3.11-Avaliação de Produção de Óxido Nítrico (NO).....	51
3.12-Viabilidade Celular.....	52
3.13-Fagocitose Através da Microscopia Óptica.....	52
4-RESULTADOS	54
4.1-Avaliação da Capacidade Fagocítica de Granulócitos por Microscopia Óptica-----	55
4.1.1-Análise por Faixa Etária.....	55
4.1.2-Durante o Processo de Envelhecimento.....	56
4.1.3-Avaliação comparativa de doadores com e sem Alzheimer na faixa etária 60- 89 anos.....	57
4.1.4-Análise por Faixa Etária.....	59
4.1.5-Durante o Processo de Envelhecimento.....	59
4.1.6-Avaliação comparativa de doadores com e sem Alzheimer na faixa etária 60- 89 anos	63

4.2-Avaliação da capacidade redutora celular em granulócitos humanos pelo MTT	
4.2.1-Análise por Faixa Etária	66
4.2.2-Durante o Processo de Envelhecimento	67
4.2.3-Avaliação comparativa de doadores com e sem Alzheimer na faixa etária 60- 89 anos.	67
4.2.4-Análise por Faixa Etária	69
4.2.5-Durante o Processo de Envelhecimento	70
4.2.6-Avaliação Comparativa de Doadores com e sem Alzheimer na Faixa Etária 60- 89 anos.	71
4.3-Avaliação da Produção de Óxido Nítrico (NO) pela Reação de Griess	71
4.3.1-Análise por Faixa Etária	71
4.3.2-Durante o Processo de Envelhecimento	76
4.3.3-Avaliação Comparativa de Doadores com e sem Alzheimer na Faixa Etária 60- 89 anos.	77
4.3.4-Análise por Faixa Etária	78
4.3.5-Durante o Processo de Envelhecimento	79
4.3.6-Avaliação Comparativa de Doadores com e sem Alzheimer na Faixa Etária 60- 89 anos.	82
5.DISCUSSÃO	84
6.CONCLUSÃO	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
ANEXOS	118

INTRODUÇÃO

1-INTRODUÇÃO

A população geriátrica é o grupo etário que mais cresce no Brasil e no mundo. Esse fenômeno traz uma preocupação mundial, pois geram problemas a diversos setores públicos e sem dúvida, implicará na necessidade de adequações nas políticas sociais, particularmente aquelas voltadas a atender crescentes demandas nas áreas de saúde, previdência e assistência social. Diante disso, inúmeros estudos têm sido feitos na tentativa de compreender o processo de envelhecimento e as condições patológicas que o acompanham.

De acordo com o IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística em 2008. As pirâmides etárias demonstram que o número de idosos brasileiros quintuplicou entre 1960-2000, passando de 3 para 14 milhões. Hoje o Brasil possui cerca de 19 milhões de pessoas com mais de 60 anos de idade, em 2020 a previsão é que essa população dobre, podendo chegar a 32 milhões.

O processo de envelhecimento é caracterizado como uma condição complexa, multifatorial e heterogênea. Existem inúmeras tentativas de definir o envelhecimento, mas a definição ideal ainda não é conhecida. Beckman e colaboradores em 1998, o definem como um fenômeno multifatorial, associado com a diminuição das funções fisiológicas, celulares e aumento na incidência de numerosas doenças neurodegenerativas.

Existem algumas doenças que são mais comuns na população idosa e a demência é uma delas. Em termos genéricos é descrita como uma condição clínica provocada por inúmeras causas, caracterizada por declínio cognitivo adquirido e manifestado a partir de um determinado padrão prévio estável. Essas mudanças cognitivas são frequentemente acompanhadas por transtornos de humor e do comportamento (APA, 1994)

Estimativas da OMS - Organização Mundial de Saúde, indicam que a doença de Alzheimer (DA) é a responsável por 50% de todas as demências, e é a forma mais comum de demência senil, aproximadamente 17 a 24 milhões de pessoas no mundo, já apresentaram essa patologia e a projeção é que esse número possa quase dobrar podendo chegar a 34 milhões em 2025 (WHO, 2009)

A DA foi descrita pela primeira vez em 1907 por Alois Alzheimer, quando trabalhava em um asilo municipal em Frankfurt, nessa ocasião publicou o seu famoso artigo sobre “Uma

rara doença do córtex cerebral”, que relatava algumas alterações neurológicas observadas em sua paciente Frau August D., 51 anos, que havia sido sua paciente em 1901 (VERHEY, *et al.*, 2009).

A associação americana de psiquiatria- APA 1994, define a DA, como uma forma de demência caracterizada por perda progressiva de memória e diminuição cognitiva, sendo esta a causa mais comum de demência na população idosa.

O marco neuropatológico é a presença de placas senis extracelulares por acúmulo de peptídeo β -amilóide (A- β) e emaranhados neurofibrilares com anormalidade na fosforilação da proteína Tau. Alguns marcadores genéticos podem funcionar como fator de risco na DA, como é a presença de apoenzima $\epsilon 4$ APOE4 (MARCOURAKIS, *et al.*, 2008).

A- β é um peptídeo amino-ácido 40-42 que é derivado de clivagem proteolítica de uma proteína de membrana integral, a proteína precursora amiloide (APP), por ação de β e γ -secretases. Existem duas isoformas de A- β : A- β (1-40) e a A- β (1-42) constituem a maioria das A- β no cérebro humano e tem sido consideradas importantes para o desenvolvimento e progressão da DA. A- β (1-42) é a mais tóxica dessas espécies, *in vitro* e *in vivo*, elas são mais proeminentes em placas amilóides de pacientes com DA e formam agregados mais facilmente do que A- β (1-40) (BUTTERFIELD, *et al.*, 2007).

Mutações genéticas tanto em genes para APP ou presenilin-1 e presenilin-2; que são elementos catalíticos de γ -secretase, estão mais susceptíveis em familiares de portadores de DA. Neles há uma demonstração de que exista um aumento da produção de A- β (1-42) e consequentemente um aparecimento mais agudo da DA (BUTTERFIELD, *et al.*, 2007).

Proteínas Tau fazem parte da família das proteínas associadas aos microtúbulos (*microtubule-associated proteins* – MAP). A principal função das MAPs é estabilizar os microtúbulos pela agregação da tubulina.

A hiperfosforilação reduz a capacidade da Tau em estabilizar os microtúbulos. Isso compromete a dinâmica microtubular, afetando o transporte intraneuronal, resultando em efeitos deletérios sobre diversos processos celulares. Todos os defeitos na proteína Tau alteram o transporte axonal, fatores vitais e necessários para a manutenção da homeostase neuronal. A regulação da dinâmica dos microtúbulos (estabilização e desestabilização) é essencial para a preservação da morfologia e da função da célula nervosa, da qual depende a manutenção da viabilidade celular. A hiperfosforilação da Tau favorece a formação de

agregados, bloqueando o tráfego intracelular de proteínas neurotróficas e outras proteínas funcionais, resultando em perda ou declínio no transporte axonal ou dendrítico nos neurônios. A hiperfosforilação da Tau presente no citosol durante estágios iniciais de degeneração neurofibrilar induz mudanças conformacionais que precedem sua agregação. Esses agregados são como já dissemos um fator neuropatológico comum na DA (BUE E, *et.al.*,2000)

O envelhecimento e passado genético, sugerem um forte fator de risco para aparecimento da DA. O alelo $\epsilon 4$ da apolipoproteína E (APOE) é o maior fator de risco de susceptibilidade genética da DA, mas os mecanismos envolvidos nesse efeito, ainda não estão completamente entendidos (MORRIS,*et.al.*, 2010).

Algumas respostas inflamatórias inatas podem ser moduladas pela APOE (LA DU, *et. al* , 2000, JUNGSU, *et. al.* , 2009) . O genótipo APOE, apresenta uma possível influência na produção de NO (MARCOURAKIS ,*et. al.*,2008).

Alguns questionamentos têm sido feitas em geriatria sobre como o envelhecimento acontece? Como ele se inicia? E porque ele ocorre? Isso tem estimulado muitos estudos e lançado inúmeras teorias do envelhecimento. Em consequência a grande complexidade de mudanças que ocorrem durante a senescência, mais de 300 teorias tem sido propostas, para explicar o processo de envelhecimento. Estas podem ser divididas em três grupos:

Grupo 1) - Teorias de Programação genética : Propõe que o envelhecimento é um programa proposto dirigido pelos genes .

Grupo 2) - Teorias Epigenéticas : Propõe que o envelhecimento é um resultado de eventos que não são guiados por programas, mas por eventos não geneticamente programados .

Grupo 3) - Teoria Evolucionária : Teoria que não tenta explicar o mecanismo do envelhecimento mas, o porque o processo de envelhecimento ocorre e as reações para diferentes estágios do envelhecimento e em diferentes espécies (VIÑA,*et. al.*, 2007)

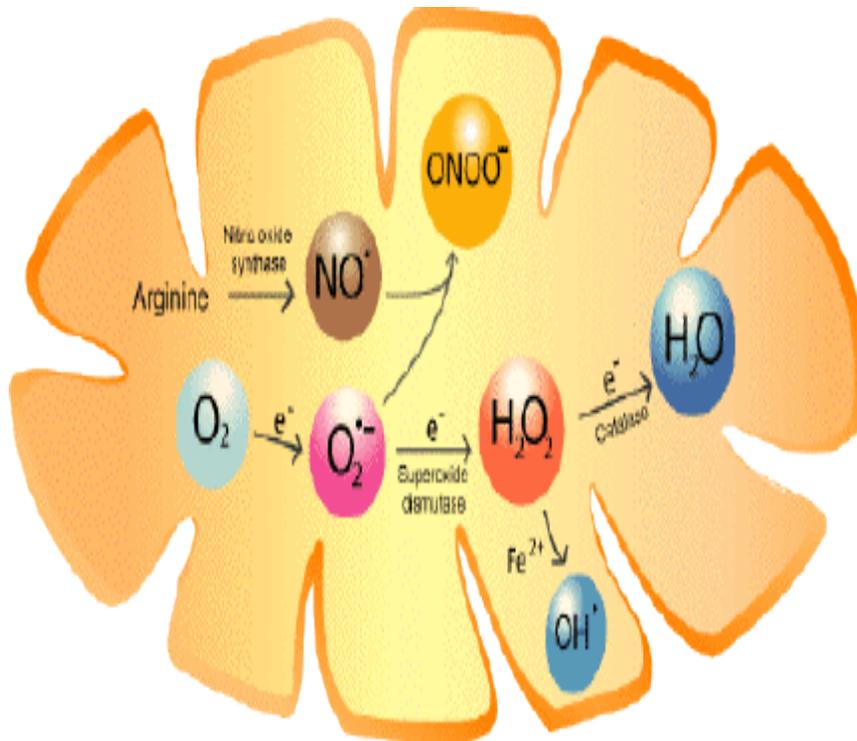
No presente, alguns pesquisadores que antes seguiam a teoria genética, agora defendem a idéia que o processo de envelhecimento aparece após maturação reprodutiva, que é dirigido por uma série de eventos, que não são programados gene. Assim alguma das teorias epigenéticas e evolucionárias é que estão sendo atualmente usadas para se tentar elaborar uma teoria integrada(DE LA FUENTE, *et.al.*, 2009)

Um importante grupo de teorias do envelhecimento são aquelas que estudam mudanças que ocorrem e que se acumulam com o passar do tempo (RICHTER, *et.al.*, 1995). Uma das teorias que vem se sustentando durante os anos, é a teoria de radicais livres, ela prediz que estes, estão diretamente relacionados a modificações genéticas, comportamentais e postula que as reações com radicais livres são envolvidas nas desordens relacionados a idade como o estresse metabólico celular (HARMAN,*et. al.*, 1956, 1959,1992).

Ela prediz que o envelhecimento é consequência do acúmulo de danos deletérios, causados por biomoléculas em oxidação, causando uma alta reatividade de radicais livres, espécies reativas de oxigênio, produzidos em nossas células, acredita-se que esses radicais promovam dano mitocondrial, no qual essa organela, não possa se regenerar e o processo de envelhecimento se inicia. A injúria mitocondrial causada por radicais livres, aliadas a uma perda da competência biomolecular, pode levar ao envelhecimento e morte celular e consequente morte do organismo(HARMAN,*et. al.*, 1956, 1959,1992).

Outra teoria que vem sendo proposta, é a teoria oxidativo-inflamatória proposta por, De La Fuentee 2005, 2008, 2009. Esta teoria sugere que, o envelhecimento é ligado a um estresse oxidativo crônico que afeta todas as células do organismo, mas especialmente aquelas do sistema neuroimunoendócrino. Os sistemas endócrino, imune e neurológico quando apresentam um grande dano oxidativo mostram-se inábeis a manter o balanço redutor, no qual sofrem perda funcional, incompatível com a preservação de uma adequada homeostase, com um resultante aumento na morbidade e mortalidade no idoso.

Fisiologicamente as espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são sintetizadas em pequenas concentrações e seu excesso é removido por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos, que podem ser endógenos e exógenos. Entretanto, em várias condições de estresse ao organismo, há um desequilíbrio entre essas funções pró-oxidantes e anti-oxidantes, isso promove uma situação que é denominada estresse oxidativo (EO)



www.mitosciences.com/oxidative_stress.html,

Figura 1 - Mecanismo de formação e eliminação das ERN e ERO.

A partir da redução do oxigênio molecular (O_2) é formado um radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ele pode originar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir de sua auto dismutação ou por ação da enzima superóxido dismutase (SOD). O ($\text{O}_2^{\bullet-}$) também pode reagir com óxido nítrico (NO) originando o peroxinitrito (ONOO^-). O (H_2O_2) pode ser catalisado pela enzima catalase ou originar radicais hidroxilas (OH^\bullet) em presença de metais (Figura-1).

O estresse oxidativo tem tido uma função primordial no envelhecimento e na patogênese de doenças neurodegenerativas como Alzheimer (ZABLOCKA, *et. al.*, 2008).

As ERN (Espécies reativas de nitrogênio) são derivadas diretamente de óxido nítrico (NO) e os mais significantes em sistemas biológicos são peróxido nítrico (ONOO^-) e o ácido peróxinitroso (OHOOH).

O (NO) está envolvido em inúmeras funções fisiológicas como: neurotransmissão, regulação em tônus vascular e resposta imune (TRIPATHI, *et.al.*, 2007).

A síntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela óxido nítrico sintase (NOS) (BERG,*et.al.*, 2008)

A família (NOs) apresenta 3 isoformas: 2 constitutivas (Óxido nítrico neuronal NO_n, Óxido nítrico endotelial - NO_e), que são dependentes dos íons cálcio e da calmodulina e que está envolvida diretamente na sinalização celular. A outra forma é a indutiva (NO_i) que sob condições normais não são expressas. Elas são induzidas por citocinase/ou endotoxinas em uma variedade de células incluindo-se macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condrócitos, neutrófilos e plaquetas (GUZIK, *et.al.*, 2005)

O nível de (NO_i) é baixo no sistema nervoso central, mas ele é induzido por alguns eventos como a reação inflamatória. As isoformas tanto constitutivas quanto induzidas, são auto reguladas nas células cerebrais sobre condições pró-inflamatórias (TRIPATHI, *et.al.*, 2007).

O NO é um importante mensageiro molecular no cérebro e tem uma função importante no aprendizado e memória e funciona também como agente neuro protetor (THATCHER, *et.al.*, 2006).

Existem algumas evidencias que demonstram que pode existir uma interrupção na via NO/GMPc na sinalização da DA, e ainda , que a A-β pode diminuir a regulação da via NO/GMPc/CREB (THATCHER,*et.al.*, 2006). A CREB está envolvida nos processos de aprendizado e memória. Quando o NO reage com anion superóxido forma produto extremamente tóxico como peróxido nitrito (ONOO⁻) o qual pode ser responsável pelo dano celular em doenças neurodegenerativas entre elas a DA. O peróxido nitrito é um componente da via A-β (TROY, *et. al.*, 2000). Quando ele é produzido em excesso pelo (NO_i) induz uma resposta inflamatória que é um fator comum nas doenças neurodegenerativas (CALLABRESE, *et. al.*, 2007).

As EROs são produtos da redução parcial de oxigênio nos sistemas biológicos onde os mais importantes são derivados de (O₂⁻), como o ânion superóxido, radical hidroxil (OH⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A mitocôndria é a maior fonte de origem de ERRO (BERG, *et.al.*, 2008)

A função geral mitocondrial é a geração de energia, elas são alvos de agentes exógenos e endógenos. 2 a 3% do oxigênio nas mitocôndrias é convertido a superóxido, no

complexo III (citocromo c oxidase) da cadeia transportadora de elétrons. Quando a frequência de elétrons, que entram na cadeia transportadora mitocondrial, excede sua capacidade de controlar o fluxo dos elétrons, eles são liberados dos complexos I e II excedendo a capacidade doadora local o que resulta em maior produção de superóxido com correspondente aumento do nível de estresse oxidativo (YAP, *et. al.*, 2009)

As mitocôndrias são organelas dinâmicas que continuamente se fundem e se dividem esse processo não só controla a morfologia mitocondrial, o número, mas também a função e a distribuição dessas organelas (CHAN, 2006). Evidências sugerem que um delicado equilíbrio nesse mecanismo é vital para o funcionamento da mitocôndria e que isso pode influenciar na produção de energia, produção de ERN, apoptose e senescência, e uma anormalidade nessa dinâmica mitocondrial pode ser um fator no qual danifica os neurônios na DA. (WANG, *et. al.*, 2009) .

A disfunção mitocondrial é uma característica comum de todas as doenças neurodegenerativas (KNOTT, *et. al.*, 2008).

Uma grande produção de A- β induz a fragmentação mitocondrial. Essa fragmentação pode ser induzida por agentes do NO como peróxido nítrico, que é acompanhada por dano estrutural, autofagia, declínio de ATP, e produção de espécies reativas de oxigênio e que esse mecanismo ocorre antes de um dano neuronal e morte celular (BARSOUM, *et. al.*, 2006).

O canal ânion voltagem dependente é um componente da membrana mitocondrial. Ele controla o fluxo de metabólitos e íons na membrana e um comprometimento nesses canais, demonstra um acúmulo anormal de A- β e conseqüente aumento de ERO e dano oxidativo (FERRER, 2009).

Quando existe um aumento na produção de A- β , existe uma inibição do complexo citocromo c oxidase e conseqüente aumento estresse oxidativo (PICKRELL, *et. al.*, 2009).

Acredita-se que, no envelhecimento, exista um declínio da fosforilação oxidativa mitocondrial (PICKRELL, *et. al.*, 2009).

Todos os tipos de células imunes são afetadas durante o envelhecimento, contribuindo para alta susceptibilidade a infecções e aumento da mortalidade observada em idosos. O efeito do envelhecimento sobre as células do sistema imune adaptativo é bem documentado. Em contraste, o conhecimento sobre as alterações observadas em neutrófilos polimorfonucleares (PMN), relacionadas à idade ainda é limitado (WESSELS, *et. al.*, 2010).

O sistema imune inato é mediado por diversos grupos de células incluindo macrófagos, monócitos, natural killer NK, natural killer T, células dendríticas e granulócitos que incluem neutrófilos, basófilos e eosinófilos. Nos leucócitos sanguíneos 60 a 70% são granulócitos e desses, 90% desses são neutrófilos. Dessa forma não se pode subestimar a importância dessas células na imunossenescência (SCHRODER & RINK, 1999). Os granulócitos são células fagocíticas, envolvidos na defesa não específica e em uma resposta aguda a agentes infecciosos. Sua arma bactericida inclui geração de ROI e RNI, radicais livres, liberação de enzimas degradativas e peptídeos microbiais, além de atuar na inflamação (THRUSH, *et. al.*, 1978, PANDA, *et. al.*, 2009). Estas células podem estar comprometidas durante o envelhecimento, aumentando não somente a morbidade mas a mortalidade, tanto por infecções bacterianas como doenças inflamatórias crônicas (PANDA, *et. al.*, 2009).

Um estudo relata que existe uma grande incidência na hospitalização por DA, o maior fator de risco observado, foi por doenças infecciosas, dessa forma observa-se o envolvimento do sistema imune na progressão da DA (ALBERT, *et. al.*, 1999). Relatos da literatura têm demonstrado o envolvimento de processos inflamatórios na DA (MACCIONI, *et. al.*, 2009).

As proteínas A- β afetam a sobrevivência dos neutrófilos além de induzir uma produção de quimiotaxia e produção de ROI em neutrófilos (PARK, *et. al.*, 2006). Estudos em nosso laboratório demonstraram que durante o processo de envelhecimento, a partir dos 40 anos de idade, os neutrófilos aumentaram a capacidade oxidativa com conseqüente redução do poder redutor celular, o mesmo ocorrendo quando esses neutrófilos foram estimulados com zimosan Zc3b (CHAVES, *et. al.*, 2008).

Fiala e colaboradores 1998, 2007, apresentaram estudos sobre o comprometimento imunológico mais especificamente a fagocitose na DA. Na DA a amiloidose pode estar relacionada ao defeito destruição da proteína A- β por células do sistema imune. (CASHMAN, *et. al.*, 2008). O balanço pró e antioxidante pode ser determinado pelo processo fagocítico. A influência da idade na função fagocítica, tem sido objeto de alguns estudos (MORONI, *et. al.*, 2007). Uma relação do processo de fagocitose em indivíduos idosos com e sem DA foi feita, e acredita-se que a fagocitose de A- β feita por macrófagos, é normal em indivíduos não portadores de DA e deficitária na DA (FIALA, *et. al.*, 2005, 2007).

Em 1936, Seyle foi o primeiro a demonstrar em seus estudos, que existe uma inter-relação entre o sistema imune e SNC.

Sabe-se que o sistema neuroimunoendócrino necessita da preservação da homeostase para a manutenção da saúde. Eles não funcionam como sistemas independentes. Para que essa comunicação entre eles exista, é necessário considerar alguns fatores como:

- a) - Células imunes, endócrinas e neuronais expressarem receptores para liberação de citocinas, hormônios e neurotransmissores.
- b) - Produtos imunes e neuroendócrinos co-existam em tecidos linfóides, neurais e endócrinos.
- c) - Mediadores endócrinos e neurais estimulem o sistema imune.
- d) - Mediadores imunes estimulem estruturas endócrinas e neurais (DE LA FUENTE, *et.al.*,2009).

A comunicação entre o cérebro e o sistema imune é bidirecional envolvendo mecanismos neurais e humorais. As duas maiores divisões do sistema nervoso autônomo são: sistema nervoso simpático (SNS) e sistema nervoso parassimpático (SNP) e elas estão fortemente envolvidas nessa comunicação. O sistema fisiológico nos mamíferos é regulado pelo sistema nervoso autônomo onde o seu controle é feito de forma involuntária(ELENLOV, 2000).

As catecolaminas são da família de moléculas contendo catecol e as principais catecolaminas são adrenalina, noradrenalina e dopamina, elas funcionam como agentes modulatórios da função celular imune (TRACEY, *et.al.*, 2009).

Sabe-se atualmente que diversos estímulos são capazes de modular o sistema imune .Oeixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal) é um dos responsáveis pelo elo de ligação entre esses dois sistemas (ALVES, *et. al.*, 2007).Durante o estresse o hipotálamo estimula a hipófise a qual estimula glândulas adrenais a liberar hormônios do estresse sendo um deles a adrenalina (SEYLE, 1956).

A epinefrina e a noradrenalina são os principais neurotransmissores simpáticos. Elas medeiam respostas celulares por interação dos receptores com proteína G acoplada a receptores adrenérgicos(SANDERS, *et. al.*, 1997).

Os receptores adrenérgicos são divididos em α (1,2) e β (1,2,3).Existem três subtipos de α 1 (A,B,D) e três de α 2 (A, B,C). Todos os receptores adrenérgicos são acoplados a proteínas G inibitórias ou estimulatórias. A estimulação de receptores ativam cas cata

fosfolipase C, e os β receptores acoplados a via adenilciclase nos quais regulam aminofosfato ciclico intracelular (cAMP). Os receptores adrenergicos α e β apresentam diferentes afinidades. O receptor adrenérgico β_2 está presente em quase todos os tipos de células imunes (SANDERS, *et. al.*, 1997) e parece ser o receptor mais importante do sistema imune (MADDEN, 2003).

A regulação das citocinas é altamente dependente do tipo de receptor estimulado, onde α -adrenoreceptor é associado predominantemente, com efeito, imuno estimulatório, ou seja, na indução de TNF α e IL -1 β . O estímulo de β -adrenoreceptor tem conseqüências geralmente imunossupressoras, ou seja, inibição de TNF α e IL -1 β e estimulação de IL -10 (BERGMANN, *et.al.*, 2002).

O sistema nervoso autônomo interage com cérebro primitivo, incluindo o sistema límbico (importante função na memória), tronco cerebral e hipotálamo. Recentes estudos têm identificado uma via básica neural que reflexamente monitora e ajusta uma resposta inflamatória, ou seja, uma ativação de um estímulo inflamatório, ativa uma via sensorial que leva informação para o hipotálamo. O controle neural da inflamação aguda é reflexiva, diretamente interconectado e controlado (TRACEY, *et.al.*, 2009).

Um reflexo é uma resposta involuntária a um estímulo, o arco reflexo autonômico controla a ação de vários órgãos. Um estímulo do arco aferente envia impulsos nos quais obtém uma resposta via eferente. O arco reflexo inflamatório consiste de um arco neural sensorial aferente que detecta produtos de injúria, infecção e inflamação e o arco neural eferente é que transmite sinais para modular uma resposta imune (ELENKOV, 2000).

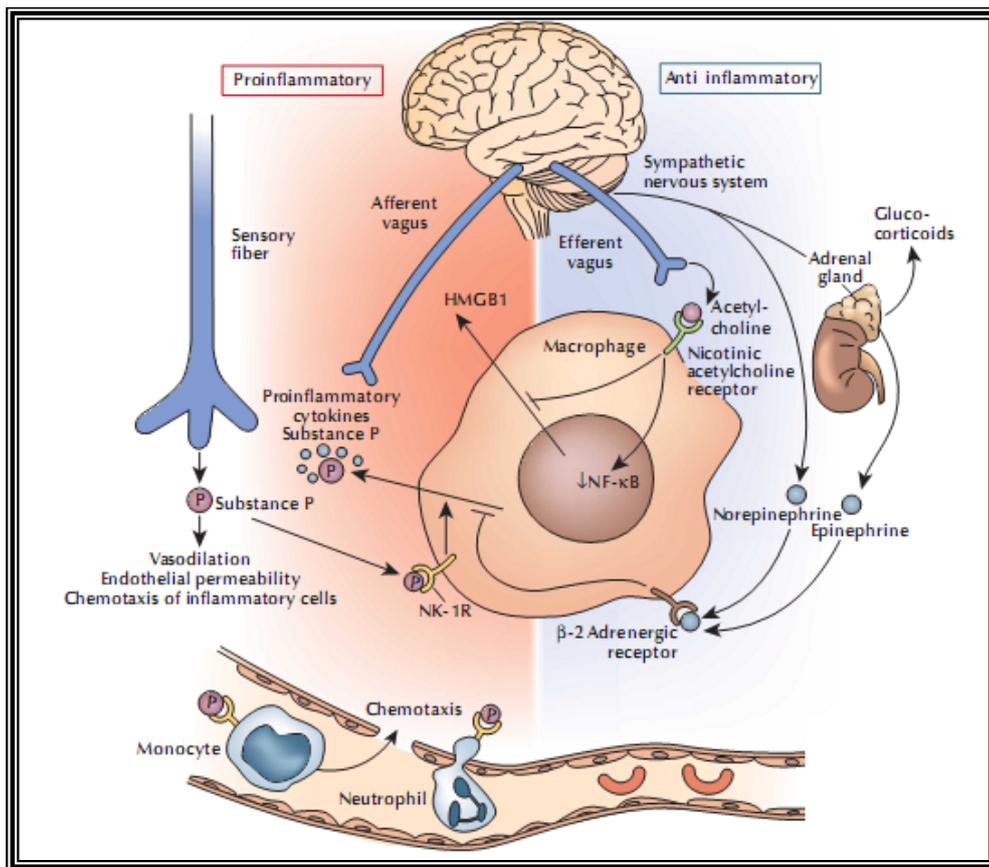


Figura 2: Vias de modulação neural da inflamação (MATTHAY, 2004)

O circuito neural do reflexo inflamatório tem seu início a partir do momento em que o sistema imunológico é ativado em resposta a um estímulo exógeno ou endógeno. Existe uma interação ligante-receptor que ativa resposta imune inata, induzindo a liberação de substância P, produzindo vasodilatação e consequente aumento da permeabilidade endotelial e influxo de células inflamatórias. Essa interação também estimula a secreção de citocinas pró-inflamatórias.

As citocinas ativam via aferente através do nervo vago. Este estímulo, chega através de um potencial de ação ao tronco cerebral onde ocorre uma integração do sinal. Após essa integração, ocorre ativação do arco eferente, nos quais ativam duas vias eferentes. Uma via anti-inflamatória colinérgica que leva a uma inibição de NF-κB e diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias.

Outra via do SNS também exerce efeitos antiinflamatórios, dependendo dos receptores nos quais são integrados. A partir do estímulo que chega ao núcleo do trato solitário, o eixo

hipófise pituitária adrenal-HPA é ativado, através de neurônios simpato excitatórios medulares ventrolateral rostral. Esses sinais estimulam a glândula supra-renal que libera adrenalina que interage, seja com β -adreno receptores (essa interação ligante receptor levam a uma diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocinas anti-inflamatórias), ou com receptores alfa adrenérgicos (onde as catecolaminas podem exercer efeitos pró-inflamatórios). (ELENKOV,*et.al.*,2000,MATTHAY& WARE, 2004 ROSAS-BALLINA&TRACEY, 2009, TRACEY, 2009).

As catecolaminas alteram o número e função de neutrófilos e linfócitos.Mais especificamente a epinefrina aumenta a explosão respiratória (BERGMANN e SAUTNER, 2002), além de inibir a geração de radicais livres (TRABOLD, *et.al.*,2007).

As metiltransferases têm uma importante função no funcionamento do cérebro. Essas incluem catecol O-metiltransferase (COMT), nos quais cataboliza catecolaminas neurotransmissoras, e feniletanolamina N-metiltransferase (PNMT) nos quais sintetiza o neurotransmissor epinefrina.A hiperhomocisteinemia é comum na doença de Alzheimer e isso pode levar a uma inibição das metiltransferases em especial a feniletanolamina N-metiltransferase (PNMT) (KENNEDY, *et al.*,2004).

O estresse oxidativo contribui para uma resposta inflamatória induzida por hiperhomocisteinemia em células vasculares (EDIRIMANNE, *et.al.*,2007).Uma hipometilação está envolvida com genes associados com DA semelhantemente com proteína precursora β A onde o aumento do nível dessas proteínas promove a produção de ERO (ZAWIA, *et. al.*, 2009).

Algumas regiões neuro anatômicas estão envolvidas no estímulo da adrenalina, bem como se demonstraram alteradas na DA. A amígdala é uma estrutura envolvida no processamento e memorização de reações emocionais, ela estimula hipotálamo que gera impulsos via lócus ceruleus e conseqüente ativação de epinefrina e noradrenalina. Estudos têm demonstrado que existe uma atrofia amigdalár em pacientes com DA (SCOTT,*et. al.*, 1992) bem como perda de locus ceruleusnesses doentes (KALININ,*et.al.*,2007).

Diante desses fatos, diversos estudos têm sido feitos na tentativa de conhecer os aspectos fisiopatológicos que envolvem o envelhecimento, a DA (Doença de Alzheimer), a fagocitose, a adrenalina, células do sistema imune e o estresse oxidativo, mas uma correlação entre todos eles ainda não foi estudada.

Assim, sabendo-se que pode existir uma inter-relação entre os mesmos, baseados nos antecedentes científicos acima referidos, a partir desse estudo, buscamos preencher uma lacuna que ainda existe sobre o conhecimento fisiopatológicos do indivíduo idoso e com a doença de Alzheimer e estreitar os conhecimentos em relação a sua correlação com o sistema imunológico e a adrenalina. Assim, nosso estudo pode cooperar para a geração de novas terapias que possam controlar ou proporcionar uma melhor qualidade de vida desses indivíduos.

OBJETIVOS

2-Objetivo Geral

Avaliar comparativamente o estresse oxidativo em granulócitos estimulados ou não com adrenalina em doadores com ou sem a doença de Alzheimer durante o processo de envelhecimento.

2.1-Objetivos Específicos:

➤ **Avaliação do poder redutor celular através do teste de redução do MTT:**

Este procedimento será realizado:

a) **Em ausência de Adrenalina:** que nos permitirá avaliar o comportamento do metabolismo basal de granulócitos.

b) **Em presença de Adrenalina:** que nos permitirá avaliar o efeito redutor nos granulócitos.

c) **Em presença de zimozan (ZC3b) opsonizado sem adrenalina:** que nos permitirá avaliar o comportamento do metabolismo basal de granulócitos na fagocitose.

d) **Em presença de zimozan (ZC3b) opsonizado com adrenalina:** que nos permitirá avaliar o efeito redutor nos granulócitos na fagocitose.

➤ **Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO) pela reação de Griess:**

Este procedimento será realizado:

a) **Em ausência de Adrenalina:** que nos permitirá avaliar o comportamento do metabolismo basal de granulócitos.

b) **Em presença de Adrenalina:** que nos permitirá avaliar o efeito oxidante nos granulócitos.

c) **Em presença de zimozan (ZC3b) opsonizado sem adrenalina:** que nos permitirá avaliar o comportamento do metabolismo basal de granulócitos na fagocitose.

d) **Em presença de zimozan (ZC3b) opsonizado com adrenalina:** que nos permitirá avaliar o efeito oxidante nos granulócitos, na fagocitose.

➤ **Avaliação do processo de fagocitose nos granulócitos realizada com Zimozan(ZC3b) opsonizado corado através de microscopia óptica:**

Esse procedimento será realizado:

- a) **Na ausência de adrenalina:** Que nos permitirá avaliar o comportamento basal dos granulócitos.
- b) **Na presença de adrenalina:** Que nos permitirá avaliar o efeito da adrenalina sobre o processo de fagocitose.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

3.1.1-Para coleta de sangue

Agulhas descartáveis, tubos heparinizados.

3.1.2-Protocolo de separação de sangue :

Tubos de vidro siliconizados e comuns, pipetas paster, microscópio, câmara de Newbawer banho Maria 37°C, pipetas graduadas 5 ml, pêra, centrífuga, becker, papel alumínio.

3.1.3-Protocolo MTT

Centrífuga, espectrofotômetro, tubos siliconizados, reagentes pipeta graduada, pipeta paster, pipetas de plástico, microscópio, câmara de Newbawer.

3.1.4 -Protocolo óxido nítrico

Leitor de Elisa, plástico, microscópio, câmara de Newbawer

3.1.5-Protocolo de microscopia

Tubos siliconizados, microscópio

3.2-**REAGENTES**

Ácido fosfórico 85% -Sigma

Azul de tripan -Sigma

Epinefrina – Hiriden

Isopropanol- Vetec

Leokopac –Bion Ltda

Monopac- Bion Ltda

MTT- Sigma

Nafitiletienodiamida-Sigma

RPMI-1640- Sigma

Sulfanilamida – Sigma

Zimozan –Sigma

3.3-SOLUCÕES

3.3.1-Solução salina de PBS

Para o preparo de PBS foram misturados os seguintes sais: NaHPO_4 (8,12g),

KH_2PO_4 (1,35g), NaCl (8g) , sendo o volume final completado para 1L . O pH da solução é de 7,3.

3.3.2-RPMI

Um com HEPES foi diluído em 900 ml de água destilada. Em seguida foram adicionados 2,0g de bicarbonato de sódio e 1 ampola de antibiótico (garamicina 120mg) . O pH foi ajustado para a faixa de 7,3-7,4, utilizando-se NaOH 0,5N. O volume final da solução foi ajustado para 1000ml. Em seguida a solução foi filtrada em membrana de porosidade de 0,22 microns e colocada em recipiente estéril.

3.3.3- Gradiente de separação de células

Para separação dos granulócitos foram utilizados dois gradientes de densidades diferentes, a saber:

Monopaque: (d = 1,08) (Bion LTDA)

Leukopaque: (d = 1,12)(Bion LTDA)

3.3.4- Azul de Tripan

1,0% em solução de salina

0,3% em solução de salina

3.3.5-Solução de sulfanilamida 1%

Sulfanilamida 1,0g

Ácido fosfórico 2,5% 100ml

Após o preparo, a solução foi protegida pela luz.

3.3.6-Solução de nafitiletenodiamida 0,1%

Nafitiletenodiamida..... 0,1g

Ácido fosfórico 2,5% 100ml

3.3.7-Solução de Griess

Esta solução foi preparada a partir de 5ml de Sulfanilamida 1% que são misturados a 5 ml de nãfitiletilenodiamida 0,1% no momento da dosagem de nitrito.

3.4-COMITÊ DE ÉTICA

O trabalho foi submetido ao comitê de ética (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais UFMG. Parecer nº ETIC 175/09.

3.5-SELEÇÃO DE DOADORES

Foram selecionados indivíduos dos sexos masculino e feminino divididos em 3 grupos em diferentes faixas etárias , em 3 protocolos, de acordo com quadro a seguir .

Tabela 1-Disposição dos grupos por faixa etária e protocolos.

GRUPOS/PROTOCOLOS	MTT	NO	MICROSCOPIA
I-20-39anos	20	20	20
II-40-59anos	20	20	20
III-60-89anos	20 com DA 20 sem DA	20 com DA 20 sem DA	20 com DA 20 sem DA

3.5.1- CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.

3.5.1.1-GRUPO ALZHEIMER

Os pacientes com DA, foram avaliados pela equipe médica (Prof. Dr. Edgar Nunes de Moraes e Dr. Rodrigo Santos, Dr Marco Túlio Gualberto Cintra) do Instituto Jenny de Andrade Faria de Atenção à Saúde do Idoso e da Mulher no HC-UFMG, que foram responsáveis pela seleção dos sujeitos de pesquisa.

Na DA não há exame complementar suficiente para diagnóstico de certeza, o diagnóstico conclusivo da DA é, eminentemente, clínico e baseia-se na exclusão de outras causas de incapacidade cognitiva e de demência. Nesse contexto foram utilizados alguns critérios para avaliação, inclusão e exclusão do doador com DA (MORAES, *et.al.*,2010):

1- Todos os idosos passaram por avaliação através do protocolo multidimensional do idoso (ANEXO -1-protocolo multifuncional) que contém resumidamente os seguintes itens :

Revisão dos sistemas fisiológicos, atividades de vida diária, cognição, humor, mobilidade, comunicação, saúde bucal, continência esfinteriana, avaliação nutricional, avaliação ambiental, história pessoal e progressão (etilismo, tabagismo, sexualidade), uso de medicamentos.

2- Na presença de suspeita de incapacidade cognitiva.

Os pacientes seguiram com:

a) Avaliação indireta da função cognitiva detectando declínio funcional pelos testes (Pfeffer, Lawton-Brody, escala Katz).

b) Avaliação direta declínio cognitivo (Mini exame do estado mental (MEEM)).

3- Se detectado limitação ou restrição AVDs e/ou pontuação suspeita no MEEM (em doadores com baixa escolaridade < 18 pontos, alta escolaridade < 26 pontos).

Foi aplicada a triagem cognitiva completa (lista de 10 palavras CERAD, teste de reconhecimento de figuras, fluência verbal semântica – animais e frutas, teste de relógio de Schulman).

4- Os pacientes diagnosticados como declínio cognitivo seguiram em triagem.

Avaliação dos pacientes com demência segundo critérios do DSM-IV.

DSM-IV (Diagnostical and Statistical Manual of Mental Disorders)

a) Desenvolvimento de múltiplos déficits cognitivos manifestados tanto por (1) quanto por (2):

1-Comprometimento da memória (capacidade prejudicada de aprender novas informações ou recordar informações anteriormente aprendidas.

2- Uma ou mais das seguintes perturbações cognitivas (afasia, apraxia, agnosia, disfunção executiva).

b) Os déficits cognitivos nos critérios 1 e 2 causam comprometimento significativo do funcionamento funcional social ou ocupacional e representam um declínio significativo em relação a um nível anteriormente superior de funcionamento .

c) O curso caracteriza-se por início gradual e declínio cognitivo contínuo.

d) Os déficits cognitivos nos critérios A1 e A2 não se devem a quaisquer dos seguintes fatores: condições do sistema nervoso central que causam déficits progressivos de memória e cognição, condições comprovadamente causadoras de demência, condições induzidas por substâncias.

e) Os déficits não ocorrem exclusivamente durante o curso de *delirium*.

f) A perturbação não é mais bem explicada pela presença de outro transtorno: depressão,doenças mentais.

5- Se existissem dúvidas entre demências e depressão seguiram em:

Aplicação de escalas padronizadas para avaliação de depressão no idoso (Escala de depressão geriátrica – GDS-5 e GDS-15) e dos critérios DSM-IV de depressão. Foram excluídos os pacientes no qual a depressão foi a causa do declínio cognitivo (pseudodemência).

6- Se diagnosticados como síndrome demencial.

Foram eliminadas:

1-Causas reversíveis :

-Tóxicas, infecciosas inflamatórias, metabólicas, estruturais.

2-Causas irreversíveis:

Degeneração lobo fronto-temporal, demência vascular, demência por corpos de Lewy e formas mistas de demência.

3-Outras causas raras de demência não-Alzheimer:

Demência associada à doença de Parkinson, degeneração córtico basal, paralisia supra-nuclear progressiva, doença de Huntington, doença de Creutzfeldt-Jacob.

7- O diagnóstico dos doadores com demência de Alzheimer obedeceu aos critérios de NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurological and communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*).

NINCDS-ADRDA categoriza a DA da seguinte forma:

PROVÁVEL (Achados que tornam a DA improvável ou incerto)

POSSÍVEL (classificação definitiva da DA)

DEFINITIVO(pós-mortem)

8-Os doadores selecionados para esse estudo foram os categorizados como diagnóstico de DA provável.

Objetivos dos testes de avaliação da incapacidade cognitiva:

Figura (3) - Testes para avaliação declínio cognitivo

1- **Mini Mental (MEEM):** É um instrumento de triagem cognitiva, utilizado na triagem de idosos com déficits cognitivos, seguimento de pacientes demenciados e monitoramento de resposta terapêutica. É composta de 11 itens, a primeira metade do teste avalia basicamente a memória e função executiva (atenção e concentração), a segunda metade avalia as funções corticais (linguagem, gnosia, praxia, função executiva e praxia visuo-espacial). (BRUCK, *et.al.*, 2003, FOLSTEIN, *et.al.*,1975).

2-Lista de 10 palavras de CERAD: Testes que avaliam a memória episódica, curva de aprendizagem e reconhecimento. O Teste consiste em apresentar ao paciente 10 palavras, uma a uma, com tempo de 2 segundos de apresentação. A palavra deve ser lida pelo examinado ou pelo examinador, quando este estiver impossibilitado. Ao fim das palavras o examinado tem 90 segundos para evocar o maior número de palavras possível. As palavras são apresentadas mais duas vezes, em ordem distintas, com o mesmo tempo para evocação. Após as três apresentações, o paciente é submetido a tarefas destinadas a distraí-lo por 5 minutos e após este período é solicitado que se lembre das 10 palavras lidas anteriormente – evocação tardia de 5 minutos. Logo em seguida é lida uma lista de 20 palavras que contém as dez do teste, uma tarefa destinada a verificar a capacidade do paciente de reconhecer as 10 palavras. É esperada uma curva de aprendizado com pontuações de quatro, seis e oito pontos, uma pontuação de evocação tardia de quatro pontos e oito pontos de reconhecimento (BERTOLLUCCI, *et al.*, 2001).

3- Desenho do Relógio: um teste que comumente usado em várias baterias de exame neuropsicológico e encontrado em diferentes versões. Na versão utilizada no presente estudo o sujeito deve desenhar um relógio de ponteiros, com todos os números marcando onze horas e dez minutos. O teste avalia habilidades visio espaciais, praxia e outras funções cognitivas, incluindo funções executivas. A versão desenvolvida por Schulman *et al.* com pontuação variando de 0 (pior) a 5 (melhor) foi utilizada em nosso protocolo (SCHULMAN, *et al.*, 2000).

4- Teste de reconhecimento de 10 figuras: Avaliam a percepção visual. O teste consiste em apresentar 10 figuras, por um período de 30 segundos. A figura deve ser observada e nomeada pelo examinado ou sob auxílio do examinador, quando este estiver impossibilitado. Ao fim dos 30 segundos, o examinado tem 60 segundos para evocar o maior número de figuras possível. As figuras são apresentadas mais duas vezes, com o mesmo tempo para evocação. Após as três apresentações, o examinado é submetido a tarefas distratoras por 5 minutos e após este período é solicitado que se lembre das 10 figuras observadas anteriormente – evocação tardia de 5 minutos. Logo em seguida é mostrada ao examinado uma lista de 20 figuras que contém as dez do teste, uma tarefa destinada a verificar a capacidade do paciente de reconhecer as 10 figuras. É esperada uma percepção e nomeação de nove das 10 figuras, uma curva de aprendizado com pontuações de cinco, cinco e seis pontos, uma pontuação de evocação tardia de cinco pontos e oito pontos de reconhecimento (NITRINI, *et al.*, 1994).

5- Teste de fluência verbal e semântica– Avalia a memória semântica (conhecimento geral sobre o mundo, dos fatos, das palavras sem relação com o momento de seu aprendizado), a função executiva (busca ativa de elementos dentro de uma determinada categoria semântica, inibindo elementos que não pertencem à ela) e a linguagem expressiva. Consiste na avaliação de categorias semânticas pré-definidas, como por exemplo animais e frutas. O teste o examinador dá um comando: “Fale todos os animais que conseguir lembrar. Vale qualquer tipo de bicho”. Após o comando é cronometrado um minuto e todos os animais mencionados são anotados pelo terapeuta. O escore corresponde ao número de animais lembrados nesse período. Os animais citados que só diferem devido ao gênero, como gato e gata, recebem apenas um ponto. Palavras distintas quanto a semântica, como boi e vaca, são consideradas duas, valendo assim dois pontos. Também valem pontos as categorias, exemplo: pássaros. Indivíduos sem disfunção cognitiva com escolaridade de oito anos ou mais são capazes de evocar pelo menos 13 animais, enquanto os com escolaridade menor que oito anos evocam pelo menos nove animais (Spreen, Sherman & Strauss, 2008).

Figura (4) Testes para incapacidade funcional

1. **Escala de Lawton-Brody**- Avalia atividades instrumentais de vida diária são avaliadas 8 atividades e classificadas quanto a assistência, qualidade de execução e iniciativa (LAWTON, *et.al.*,1969).
2. **Escala de Pfeffer**- Específica para avaliar declínio cognitivo e avalia 10 atividades da vida diária com escores variando de 0-30 score acima de 5 indicam declínio funcional (mínimo= 0, Maximo= 30 (PFEFFER, *et.al.*,1982)
3. **Índice de Katz**- Utilizado para avaliação das atividades de vida diária O grau de assistência exigido é avaliado em seis atividades tomar banho, vestir-se, usar vaso sanitário, transferência, continência, alimentar-se. É realizada pontuação de(0-3), sendo que (0) representa independência completa,(1)necessidade de ajuda não humana, (2) necessidade de ajuda humana, (3) dependência completa (KATZ, 1963).

3.5.1.2-GRUPO CONTROLE

Para a escolha dos doadores do grupo controle adotamos critérios de exclusão de acordo com protocolo SENIEURS (LIGTHART *et. al.*,1984), que é um sistema de estudo no qual avaliam um indivíduo saudável do não saudável que apresenta como critérios exclusão, doenças e medicamentos que influenciam nos parâmetros imunogerontológicos. Os critérios de exclusão apontados no protocolo são: Fumantes, portadores de infecção, inflamação, malignâncias, desordens lipoproliferativas, arteriosclerose, insuficiência cardíaca, uso de medicamentos que influenciem diretamente na função imune. Os controles não apresentavam incapacidade cognitiva, independente da etiologia (demência, depressão, doença mental ou *delirium*) e nem apresentavam história familiar de depressão ou demência. Todos os controles foram submetidos à bateria de testes cognitivos e funcionais acima descritos.

3.6-ESCOLHA DAS CONCENTRAÇÕES DE ADRENALINA.

Foram avaliadas 6 concentrações 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} e 10^{-13} M, nas quais os critérios de escolha das mesmas, foram as que apresentaram efeito ativatório em relação ao controle e que apresentaram viabilidade celular próximo de 95%.

As concentrações que apresentaram esse perfil foram 10^{-8} e 10^{-9} M, elas foram diluídas de acordo com o volume final de cada protocolo. Para o protocolo MTT as concentrações finais foram de 10^{-8} M e 10^{-9} M. Para os protocolos microscopia óptica e NO utilizamos as concentrações foram $1,7 \times 10^{-8}$ M e $1,7 \times 10^{-9}$ M.

3.7-COLETA DE SANGUE

Após prévio consentimento e explicação dos procedimentos e assinatura do TCLE dos doadores. Foram coletados 7ml de sangue em tubos heparinizados e levados imediatamente ao laboratório de Bioquímica do envelhecimento e doenças correlacionadas no Instituto de ciências biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG.

3.8-SEPARAÇÃO CELULAR

Em um tubo comum foram adicionados 3mL de Leokopaque, 3 mL de monopaque, 4 mL de sangue periférico. Esse conteúdo foi centrifugado a 2500 rpm por 45 min . Após esse período foi observado no tubo, plasma seguido de dois anéis interfásicos (mononucleares, granulócitos respectivamente).

O plasma e os dois anéis foram acondicionados em diferentes tubos, e adicionado PBS pH 7,3 até metade do tubo em cada um deles. Uma nova centrifugação foi feita por 15 min 1500rpm, logo após esse período foi observado sobrenadante límpido o mesmo foi retirado e desprezado e adicionado PBS pH 7,3 até metade do tubo e novamente centrifugado por 15min a 1500rpm.

O sobrenadante foi totalmente desprezado, e o “pellet” foi ressuspense em 1000 μ L de RPMI. As células foram contadas e em um tubo, foram ajustadas de forma que em 1000 μ L tivéssemos um número de 10×10^6 de células. Os granulócitos foram utilizados nos três experimentos (MTT, Produção de NO, Microscopia óptica)(BICALHO, *et.al.*, 1981).

3.9-OPSONIZAÇÃO DO ZIMOZAN (ZC3b)

O zimozan 240 μ L foi diluído em 760 μ L de PBS. Em um tubo foi adicionado 100 μ L de zimozan diluído e 900 μ L de PBS, foi centrifugado por 5 min em centrifuga a 1500rpm , a seguir foi retirado o sobrenadante e adicionado 200 μ L de plasma e 800 μ L de PBS esse conteúdo foi encubado por 30 min a uma temperatura de 37°C, sendo homogeneizado a cada 10 min. No final foi adicionado PBS até a metade do tubo e centrifugado 5 min 1500 rpm, foi retirado o sobrenadante e realizado o mesmo procedimento por 2 vezes, no final foi adicionado 500 μ L de PBS.

3.10-ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT

A quantificação do efeito redutor celular foi feito pela técnica de MTT(3-(4,5 - Dimetiltiazol-2-il) -2,5-di fenilo tetrazolium brometo, um tetrazole)uma técnica proposta por Malaquias,1991. O ensaio MTT são testes laboratoriais e do padrão de ensaio colorimétrico (um teste que mede mudanças na cor) para medir a atividade das enzimas que reduzem MTT para formazan,dando uma cor roxa. Isso acontece principalmente nas mitocôndrias e, portanto, fazem a medida da atividade mitocondrial.

A técnica resume-se em: tubos siliconizados foram adicionados os seguintes conteúdos como seguem a tabela 2:

Tabela 2-Conteúdos para avaliação MTT.

Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
100µL G	100µL G	100µL G	100µL G	100µL G	100µL G
380µL RPMI	330µL RPMI	330µL RPMI	280µL RPMI	230µL RPMI	230µLRPPI
			100µL ZC3b	100µL ZC3b	100µL ZC3b
	50µL AD 10^{-8} M	50µLAD 10^{-9} M		50µL AD 10^{-8} M	50µL AD 10^{-9} M

Esses conteúdos foram incubados a uma temperatura de 37°C durante 90min, nos quais foi adicionado 20 µL de MTT após 30min desse período, a reação foi interrompida com 1ml de isopropanol/HCl, logo após esses procedimentos foi realizada a leitura no espectrofotômetro em D.O.570nm.

3.11-AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Foi avaliado a quantificação de nitrito segundo reação de Griess (GRIESS,*et. al.*, 1864) para observar a produção de óxido nítrico por granulócitos no qual segue o seguinte protocolo segundo tabela 3 em 6 tubos siliconizados foram adicionados:

Tabela 3-Conteúdos para avaliação NO

Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
100µL G	100µL G	100µL G	100µL G	100µL G	100µL G
200µL RPMI	150µL RPMI	150µL RPMI	100µL RPMI	50µL RPMI	50µL RPPMI
			100µL ZC3b	100µL ZC3b	100µL ZC3b
	50µL AD $1,7 \times 10^{-8} M$	50µLAD $1,7 \times 10^{-9} M$		50µL AD $1,7 \times 10^{-8} M$	50µLAD $1,7 \times 10^{-9} M$

Os granulócitos foram mantidos em banho Maria por 24 h. Em seguida todos os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos, isso resultou em um sobrenadante, que foi coletado e utilizado para dosagem de óxido nítrico. O pellet foi resuspenso em 200µl de RPMI e imediatamente submetido à análise de viabilidade celular.

➤ Procedimentos para dosagem da produção de óxido nítrico

Foram dispostos em placas de 96 poços, 200µL do sobrenadante referido acima e, 100µL da solução de Griess (Mistura de 1:1 de sulfanilamida e naftiletlenodiamida em bécker protegido da luz) e feito leitura no leitor de Elisa em D.O. 540nm, isso foi feito com todas as concentrações.

Os resultados obtidos foram comparados com valores da curva de padrão de nitrito (veja abaixo), e analisados por regressão linear. Ao final foram ajustados de milimolar (mm) para micromolar (µm).

➤ **Preparação da curva padrão de nitrito**

Em uma placa de Elisa de 96 poços foram colocados nos poços de (2 a 10) 100µL de RPMI, e no poço (1) 200µL da solução padrão de nitrito (75µl da solução padrão + 425 µL RPMI).Diluições sucessivas foram feitas a partir do primeiro poço, retirando deste 100µl e colocando no segundo poço que continha agora 200µL (homogeneizar bastante), fazendo o mesmo procedimento até o poço 10. No poço 10 sobrou 100µL que foi descartado. Foi feita leitura da placa em leitor de Elisa com comprimento de onda de 540nm em absorbância, os valores obtidos formaram a curva de nitrito.

3.12-VIABILIDADE CELULAR

Essa avaliação foi realizada pelo teste de azul de tripan (OLIVEIRA –LIMA e DIAS DA SILVA, 1970). Aos 200µL foram adicionados 1 gota de solução 1% de azul de tripan em salina. Após este procedimento, os granulócitos foram contados em câmara de Neubauer e células mortas e vivas foram contadas. Em todos os ensaios a viabilidade celular nunca deveria ser inferior a 95%.

3.13-FAGOCITOSE ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ÓPTICA

➤ **Procedimento para corar Zimozan opsonizado**

Em 250 µL de zimozan previamente opsonizado, adicionou-se, 5 gotas de azul de tripan 1%, esse conteúdo foi homogeneizado 3 vezes, a cada 10 min, por 30 min, em banho Maria a uma temperatura de 37° C.Esse conteúdo foi lavado com PBS, centrifugado à 1500 rpm, durante 5 min, por 2 vezes.O sobrenadante foi descartado em cada lavada, e ao último “pellet” foi adicionado 250 µL de PBS(PERILLO,*et.al.*, 2005).

➤ **Preparo para microscopia**

Em um tubos siliconizado foram adicionados os seguintes conteúdos como mostra a Tabela a seguir:

Tabela 4 - Conteúdos para microscopia óptica

Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
100µL G	100µL G	100µL G
	50µl AD $1,7 \times 10^{-8} M$	50µl AD $1,7 \times 10^{-9} M$
100µL ZC3b corado	100µL ZC3b corado	100µL ZC3b corado
100µL RPMI	50µl RPMI	50µl RPMI

Esses conteúdos ficaram encubados em banho Maria por 30 minutos a temperatura de 37°C, a seguir foram homogeneizados e colocados em câmara de Neubauer, as células fagocitadas bem como as não fagocitadas foram imediatamente contadas e fotografadas em microscópio óptico.

RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em três blocos, representando dados sobre o efeito da adrenalina durante o processo de envelhecimento, em três faixas etárias e de doadores sem Os resultados serão apresentados em três blocos, representando dados sobre o efeito da adrenalina durante o processo de envelhecimento, em três faixas etárias e de doadores sem doença de Alzheimer em comparação com os doadores com doença de Alzheimer na mesma faixa etária (60-89), através da avaliação dos seguintes parâmetros: fagocitose, produção de óxido nítrico e capacidade redutora celular (MTT).

4.1 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FAGOCÍTICA DE GRANULÓCITOS POR MICROSCOPIA ÓPTICA.

4.1.1-Análise por faixa etária

A figura 5 mostra o perfil fagocítico de granulócitos em três diferentes faixas etárias, a saber: 20-30, 40-59 e 60-89 anos. Nossos resultados mostraram através da observação por microscopia óptica uma diminuição qualitativa da fagocitose durante o processo de envelhecimento em ausência de adrenalina (AD).

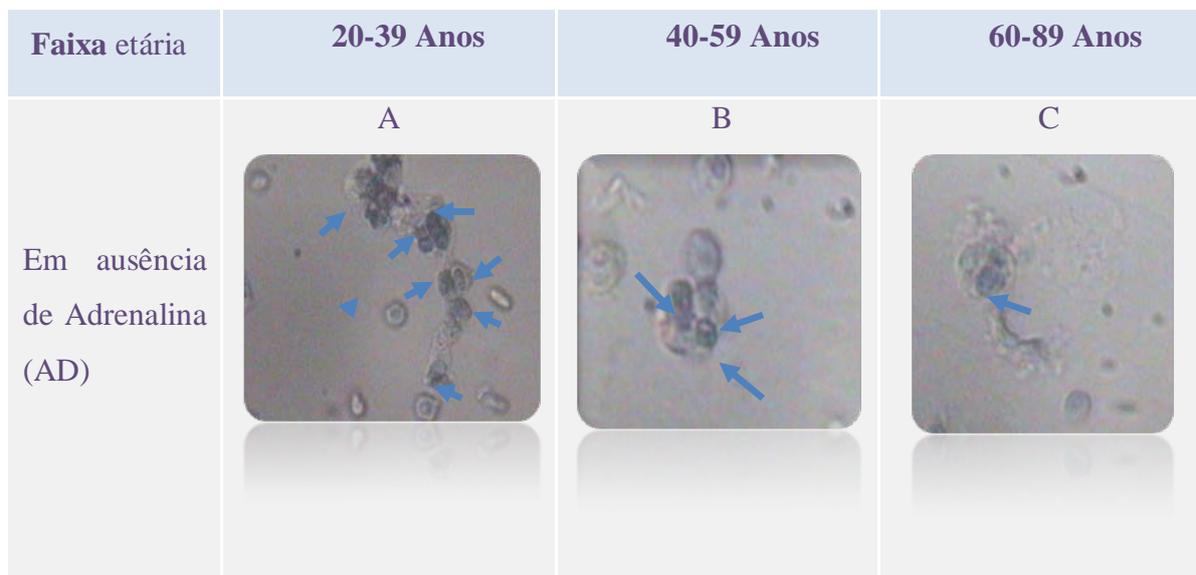


Figura 5 - Comparação qualitativa da fagocitose (G+ZC3b) em diferentes faixas etárias A – (20- 39anos), B - (40-59anos) e C - (60-89anos) sem estímulo com Adrenalina (AD) . As setas em azul demonstram partículas de ZC3b fagocitadas.

4.1.2- Durante o processo de envelhecimento.

Ao quantificamos estas diferenças observados anteriormente, observamos uma redução significativa de $p < 0,05$ pelo teste não paramétrico de Mann Whitney, da capacidade fagocítica, de 23% quando comparamos as faixas etárias de 40-59 anos e de 29% de 60-89 anos com a faixa etária de 20-39 anos, respectivamente (Figura 6). Na comparação da faixa etária de 40-59 e 60-89anos não ocorreu diferença significativa ($p > 0,05$).

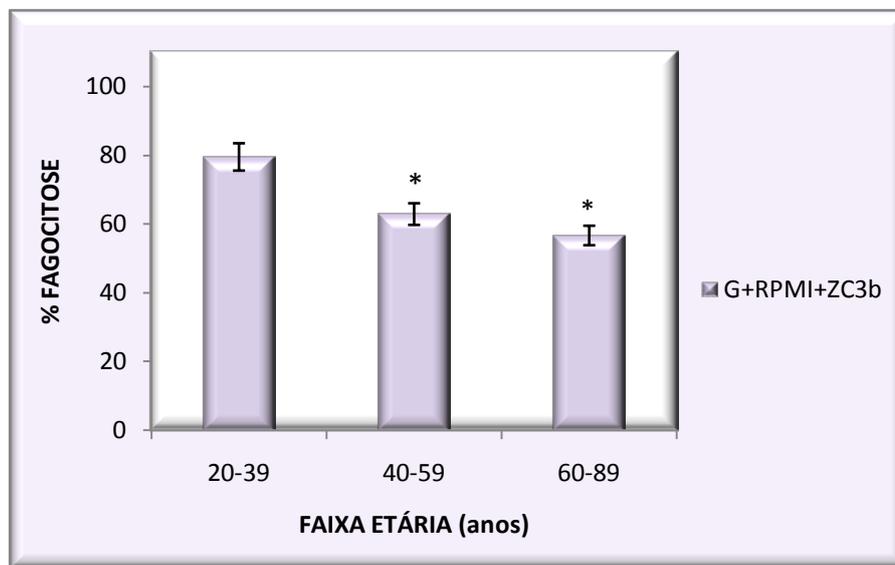


Figura 6- Comparação da porcentagem de fagocitose (G+RPMI+ZC3b) em diferentes faixas etárias (20-39anos), (40-59anos), (60-89anos) sem estímulo com AD . G = granulócito, RPMI = Meio de cultura, ZC3b = Zimosan opsonizado C3b, AD = adrenalina. N=20 doadores em cada faixa etária.

O símbolo (*) representa $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney que comparou (G+RPMI+ZC3b) a faixa etária de (20-39) com as demais faixas etárias (40-59 e 60-89anos). Na comparação da faixa etária de 40-59 e 60-89anos não ocorreu diferença significativa ($p > 0,05$).

4.1.3-Avaliação comparativa de doadores com e sem doença de Alzheimer na faixa etária 60- 89 anos .

Ao avaliarmos através de microscopia óptica se existiam diferenças significativas entre células de doadores com (K) ou sem (J) Alzheimer, na mesma faixa etária (60-89 anos), verificamos através de análise qualitativa o mesmo padrão fagocítico (Figura 7).

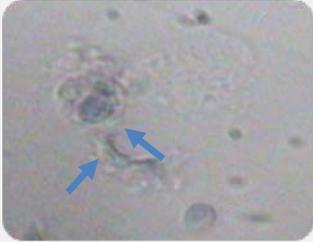
Faixa etária (60-89 ANOS)	Sem DA	Com DA
Em ausência de Adrenalina (AD)	<p style="text-align: center;">J</p> 	<p style="text-align: center;">K</p> 

Figura 7 - Comparação qualitativa da fagocitose (G+ZC3b) entre células de doadores com (K) ou sem (J) Alzheimer (DA) na faixa de (60-89 anos) sem estímulo com Adrenalina (AD).As setas em azul demonstram partículas de ZC3b fagocitadas.

Ao quantificamos, verificamos que não existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre as percentagens de fagocitose quando comparamos células de doadores com (56,9%) e sem (56,6%) Alzheimer na mesma faixa etária (60-89 anos) (Figura 8).

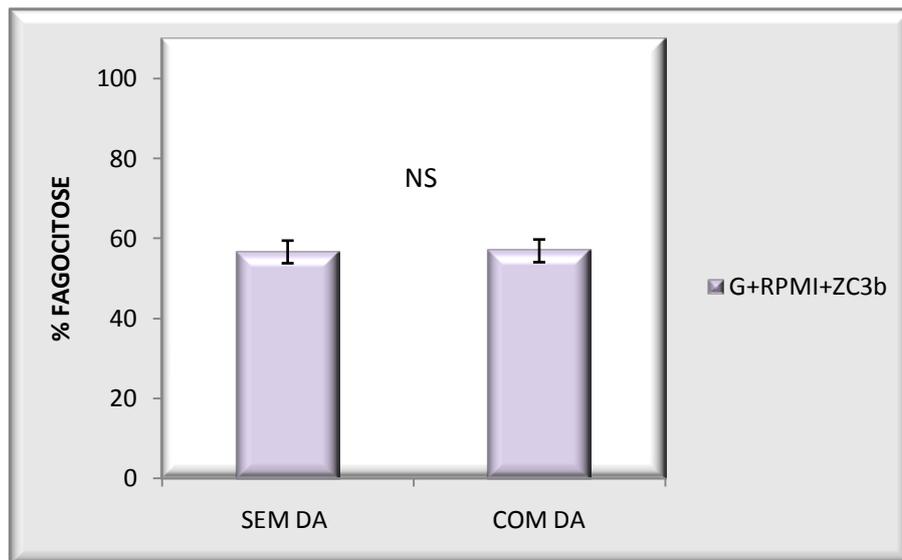


Figura 8 -Comparação da percentagem de fagocitose (G+RPMI+ZC3b) em Células de doadores com e sem Alzheimer na faixa etária de 60-89 anos em ausência de adrenalina (AD). N=20 doadores com e sem DA

G = granulócito, RPMI = Meio de cultura, ZC3b = Zimosan opsonizado C3b, DA = Doença de Alzheimer.

N.S. = $p > 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney que comparou (G+RPMI+ZC3b) entre células de doadores com e sem Alzheimer na faixa etária de 60-89 anos.

Sabemos que a adrenalina interfere diretamente sobre a reatividade de células do sistema imunológico, podendo assim alterar a capacidade fagocítica celular, e desencadear respostas diferenciadas frente a um desafio imunológico, tanto em condições fisiológicas como patológicas. Neste contexto, realizamos nossos experimentos em presença de Adrenalina (AD). Nossas avaliações levaram em conta o estudo do efeito da adrenalina durante o processo de envelhecimento e no Alzheimer.

4.1.4-Análise por faixa etária

4.1.5-Durante o processo de envelhecimento

A figura 9 mostra o perfil fagocítico de granulócitos em três diferentes faixas etárias, a saber: 20-30, 40-59 e 60-89 anos em presença de adrenalina nas concentrações $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$ e $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$. Nossos resultados mostraram através da observação por microscopia óptica que as duas concentrações de adrenalina foram eficientes em gerar um aumento da fagocitose pelos granulócitos nas faixas etárias de 20-39 e 40-59 anos. Entretanto, na faixa etária de 60-89 anos verificamos que a concentração de $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$ produziu uma menor capacidade fagocítica do que a dose de $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$. Verificamos também que ao compararmos a capacidade fagocítica da faixa etária de 60-89 anos com a faixa etária de 20-59 anos observamos um menor efeito da adrenalina sobre a capacidade fagocítica desta faixa etária (figura 9).

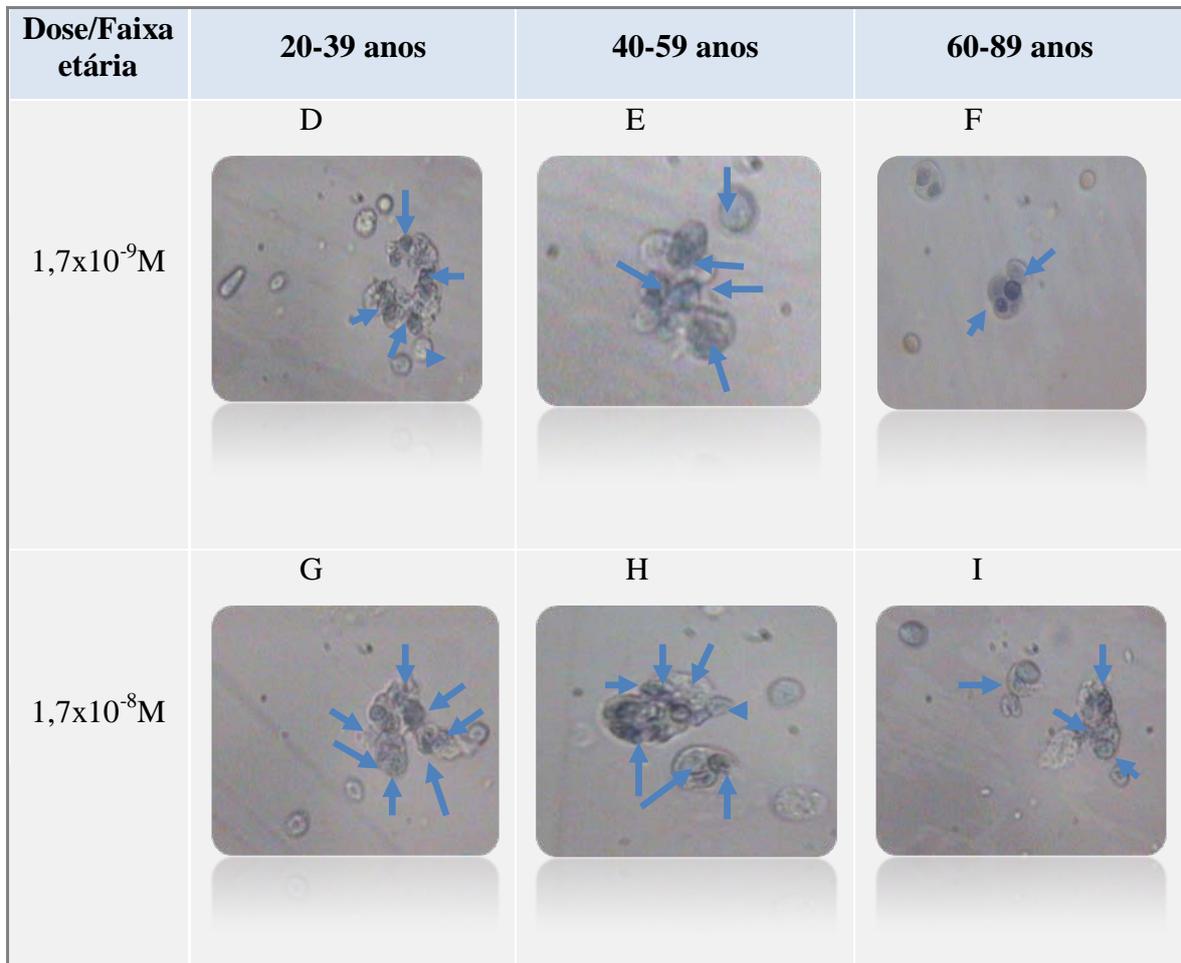


Figura 9- Comparação qualitativa da fagocitose (G+ZC3b) em diferentes faixas etárias D e G - (20-39anos), E e H - (40-59anos) e F e I - (60-89anos) estimuladas com Adrenalina (AD $-1,7 \times 10^{-9} M$ e $1,7 \times 10^{-8} M$). As setas em azul representam partículas de ZC3b fagocitadas.

Ao quantificamos estas diferenças observados anteriormente, verificamos que quando granulócitos são incubados com adrenalina na concentração de $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$ ocorre uma ativação significativa $p < 0,05$ do processo fagocítico de 34% e 35% nas faixas etárias de 20-39 e 40-59 anos respectivamente (tabela 5). Entretanto, ao analisarmos a faixa etária de 60-89 anos, verificamos uma ativação não significativa ($p > 0,05$) de 10% do processo fagocítico pelo teste não paramétrico de Mann Whitney (tabela 5).

Ao analisarmos a concentração de $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$, observamos que em todas as faixas etárias estudadas (20-39, 40-59 e 60-89) ocorreu um aumento (42%, 43% e 37% respectivamente) significativo ($p < 0,05$) da capacidade fagocítica (tabela 5).

Entretanto, ao analisarmos comparativamente o quanto a dose $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$ foi mais eficiente em ativar o processo fagocítico do que a dose de $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$ verificamos que nas faixas etárias de 20-39 e 40-59 anos a eficiência no processo de ativação foi de 06% e 05% respectivamente, não sendo significativo a $p > 0,05$. Ao observamos a faixa etária de 60-85 anos verificamos que esta eficiência foi de 23% o qual foi significativo $p < 0,05$ pelo teste não paramétrico de Mann Whitney (tabela 5).

Tabela 5- Efeito das concentrações de adrenalina ($1,7 \times 10^{-9} \text{M}$ e $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$) sobre a fagocitose de granulócitos durante o processo de envelhecimento.

% FAGOCITOSE		MÉDIA ± EP	%	%
		Ativação		$1,7 \times 10^{-8} \text{M}$ / $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$
SEM AD	(N= 18)	(G+RPMI+ZC3b)		
	20-39 anos	69,50 ± 1,43		
	40-59 anos	62,89 ± 1,27		
	60-89 anos	56,57 ± 1,02		
AD $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$	(N=18)	(G+ AD $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$ +ZC3b)		
	20-39 anos	93,00 ± 1,23	34% *	
	40-59 anos	85,39 ± 0,90	35% *	
	60-89 anos	62,17 ± 1,36	10% #	
AD $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$	(N=18)	(G+ AD $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$ +ZC3b)		
	20-39 anos	98,78 ± 0,46	42% *	6 %
	40-59 anos	90,06 ± 1,85	43% *	5%
	60-89 anos	77,67 ± 1,47	37% **	25%*#

Os resultados foram expressos como média ± EP. G = Granulócitos; AD = Adrenalina; ZC3b = Zimozan opsonizado com C3b; * = significativo $p < 0,05$ pelo teste não paramétrico de Mann Whitney quando comparado (G+ AD $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$ +ZC3b) e (G+RPMI+ZC3b); (G+ AD $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$ +ZC3b) e (G+RPMI+ZC3b) e (G+ AD $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$ +ZC3b)/ (G+ AD $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$ +ZC3b). # = significativo $p < 0,05$ quando comparado a faixa etária de 60-89 anos com as faixas etárias de 20-39 e 40-59 anos pelo testes de comparações múltiplas Kruskal - Wallis.

4.1.6 Avaliação comparativa de doadores com e sem Alzheimer na faixa etária 60-89 anos.

A figura 10 mostra o perfil fagocítico de granulócitos de doadores sem e com Alzheimer em presença de adrenalina ($AD\ 1,7 \times 10^{-9}M$ e $1,7 \times 10^{-8}M$). Nossos resultados mostraram através da observação por microscopia óptica (avaliação qualitativa) que na faixa etária de 60-89 anos tanto em granulócitos de doadores sem e com Alzheimer, que a concentração de $1,7 \times 10^{-9}M$ produziu uma menor capacidade fagocítica do que a dose de $1,7 \times 10^{-8}M$ (figura 5). Observamos também que na mesma concentração, tanto de $1,7 \times 10^{-8}M$ quanto de $1,7 \times 10^{-9}M$ em granulócitos de doadores sem e com Alzheimer ocorreu uma fagocitose semelhante (figura 10).

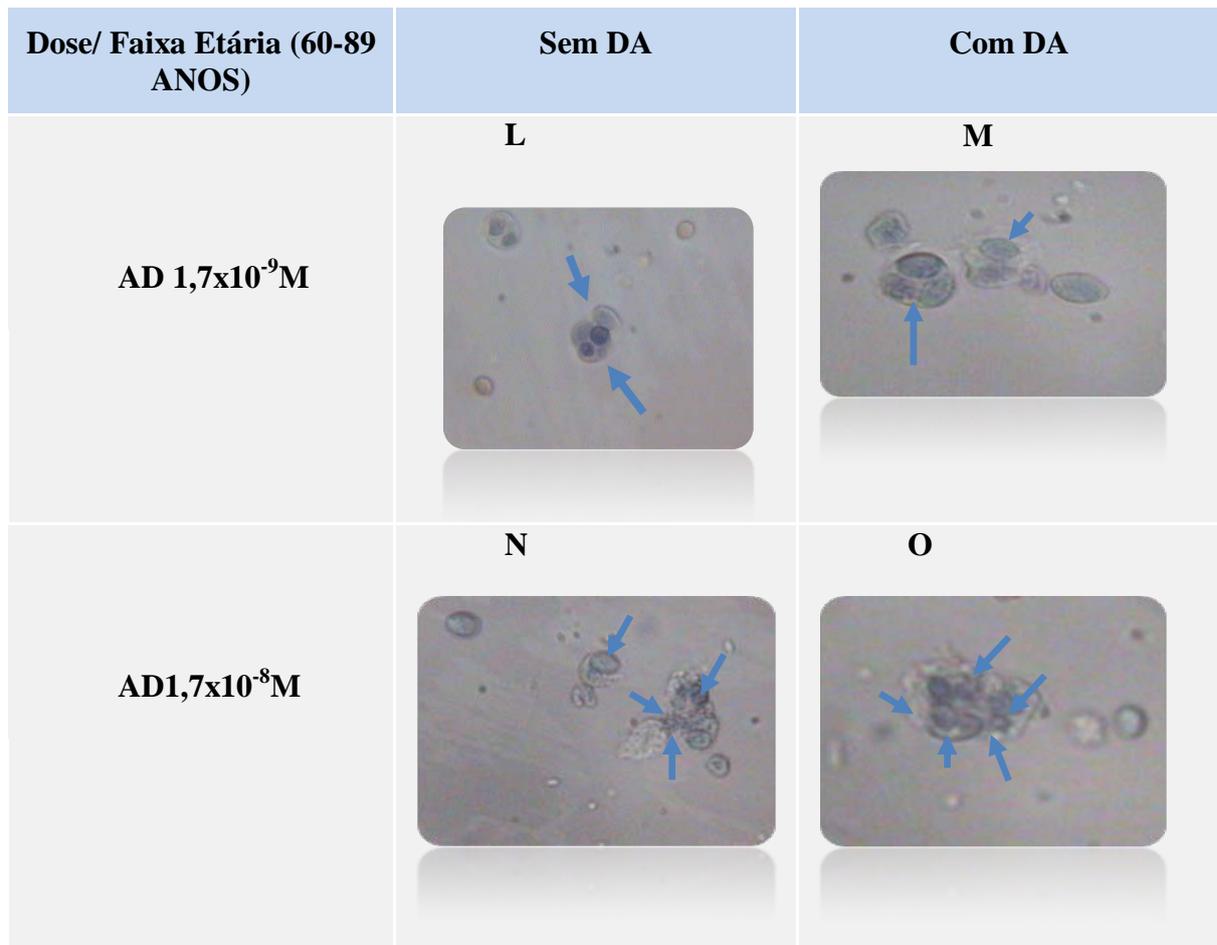


Figura 10- Comparação qualitativa da fagocitose (G+ZC3b) em granulócitos de doadores sem e com Alzheimer (DA) estimuladas com Adrenalina ($AD - 1,7 \times 10^{-9}M$ e $1,7 \times 10^{-8}M$). As setas em azul demonstram partículas de ZC3b fagocitadas.

Ao analisarmos comparativamente a fagocitose de granulócitos de doadores com e sem Alzheimer na mesma faixa etária (60-89 anos), agora numa análise quantitativa, verificamos uma ativação não significativa ($p>0,05$) de 10% (sem DA) e 9,3 % (com DA) do processo fagocítico pelo teste não paramétrico de Mann Whitney (tabela 6).

Ao analisarmos a concentração de $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$ observamos que tanto granulócitos de doadores com e sem Alzheimer apresentaram um aumento (36% e 37% respectivamente) significativo ($p<0,05$) da capacidade fagocítica (tabela 6).

Avaliamos, também, comparativamente o quanto a concentração $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$ foi mais eficiente em ativar o processo fagocítico do que a dose de $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$ e verificamos que em ambas as células ocorreram um aumento da eficiência que foi de 24% (Sem DA) e 24% (com DA) os quais não foram significativos entre si pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (tabela 6).

Tabela 6- Efeito das concentrações de adrenalina ($1,7 \times 10^{-8}M$ e $1,7 \times 10^{-9}M$) sobre a fagocitose degranulócitos de doadores sem e com Alzheimer.

60-89 ANOS	MÉDIA ± EP	% Ativação	% $1,7 \times 10^{-8} / 1,7 \times 10^{-9}M$
SEM AD (N = 18)	(G+RPMI+ZC3b)		
SEM DA	56,57 ± 1,02		
COM DA	56,94 ± 1,15		
AD $1,7 \cdot 10^{-9}M$ (N = 18)	(G+AD $1,7 \times 10^{-9}M$ +ZC3b)		
SEM DA	62,17 ± 1,36	10%	
COM DA	62,25 ± 1,34	9,3%	
AD $1,7 \cdot 10^{-8}M$ (N = 18)	(G+ AD $1,7 \times 10^{-8}M$ +ZC3b)		
SEM DA	77,67 ± 1,47	37%*	24%*
COM DA	77,38 ± 1,34	36 %*	24%*

Os resultados foram expressos como média ± EP. Da = Doença de Alzheimer G = Granulócitos AD = Adrenalina; ZC3b = Zimozan opsonizado com C3b; * = significativo $p < 0,05$ pelo teste não paramétrico de Mann Whitney quando comparado (G+ AD $1,7 \times 10^{-9}M$ +ZC3b) e (G+RPMI+ZC3b); (G+ AD $1,7 \times 10^{-8}M$ +ZC3b) e (G+RPMI+ZC3b) e (G+ AD $1,7 \times 10^{-8}M$ +ZC3b)/ (G+ AD $1,7 \times 10^{-9}M$ +ZC3b).

4.2--AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE REDUTORA CELULAR EM GRANULÓCITOS HUMANOS PELO MÉTODO DE MTT:

4.2.1-Análise por faixa etária

A figura 11 mostra o poder redutor de granulócitos, através do ensaio de MTT, em três diferentes faixas etárias, a saber: 20-30, 40-59 e 60-89 anos. Nossos resultados mostraram um aumento significativo $p < 0,05$ do poder redutor de granulócitos em todas as faixas etárias quando estes foram incubados com zimozan opsonizado com C3b (ZC3b).

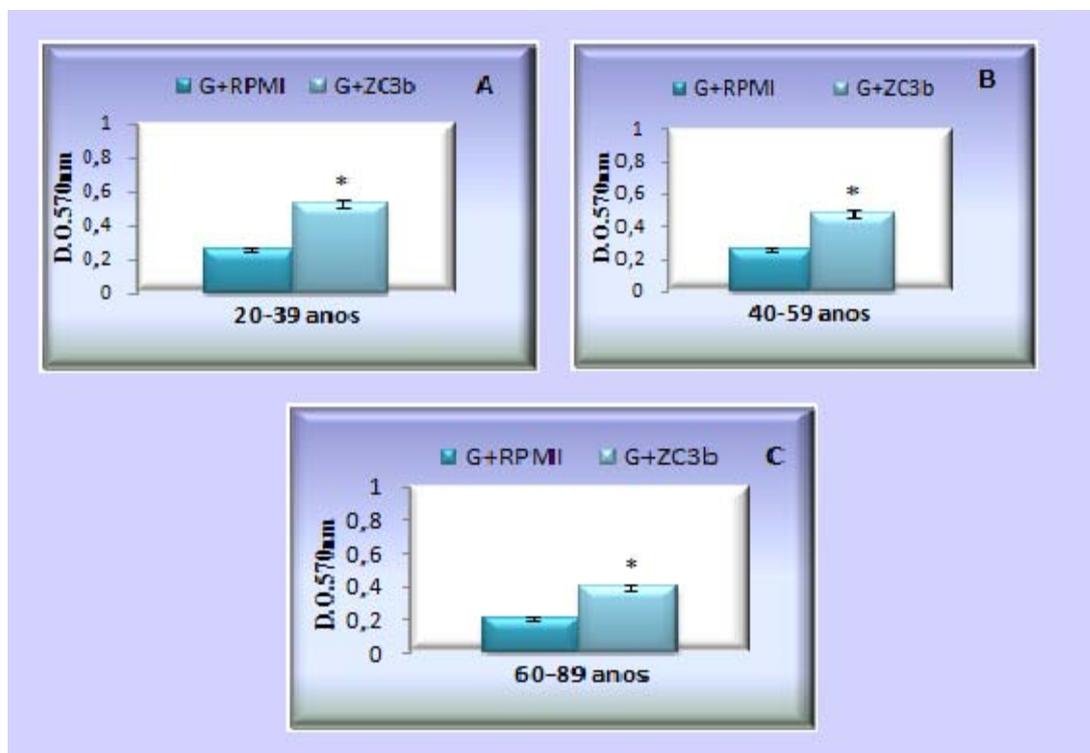


Figura 11 Estudo do poder redutor de granulócitos em ausência e presença de zimozan opsonizado por C3b pelo ensaio de MTT em diferentes faixas etárias. O painel (A) representa a faixa etária 20-39 anos, (B) 40-59 e (C) 60-89 anos.

*= significativamente diferente $p < 0,05$ avaliados pelo teste de Mann-Whitney que comparou (G+ZC3b) em relação (G+RPMI).

G = Granulócitos; RPMI = Meio de cultura; ZC3b = zimozan opsonizado com C3b

4.2.2-Durante o processo de envelhecimento.

Os resultados da tabela 7 mostram que durante o processo de envelhecimento ocorreu uma diminuição da capacidade redutora de granulócitos, onde encontramos uma fagocitose de 93% (20-39 anos); 57% (40-59 anos) e 32% (60-80 anos). Esta redução foi significativa $p < 0,05$ quando comparamos todas as faixas etárias entre si, pelo teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis.

Tabela 7 -Avaliação comparativa da capacidade redutora de granulócitos nas faixas etárias de 20-39, 40-59 e 60-80 anos, através do teste de MTT.

FAIXAS ETÁRIAS	MTT D.O. 570nm(média ± EP)			N
	(G+RPMI)	(G+RPMI+ZC3b)	%Ativação redução de MTT	
20-39 anos	0,263 ± 0,17	0,508 ± 0,04 [#]	93% [#]	15
40-59 anos	0,260 ± 0,19	0,410 ± 0,03 [#]	57% [#]	21
60-89 anos	0,238 ± 0,02	0,316 ± 0,02 [#]	32% [#]	21

Os resultados foram expressos através da média ± erro padrão (EP). D.O. = densidade óptica; G= granulócitos; RPMI = Meio de cultura; EP= erro padrão; MTT = sal de tretazolium; ZC3b = zimozan opsonizado. # = Significativo ($p < 0,05$) pelo teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis.

4.2.3-Avaliação comparativa de doadores com e sem Alzheimer na faixa etária 60-89 anos.

Nossos resultados mostram que granulócitos de doadores com Alzheimer apresentaram um poder redutor basal e estimulado com ZC3b significativamente ($p < 0,05$) maior que os encontrados em granulócitos de doadores sem Alzheimer pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (figura 12).

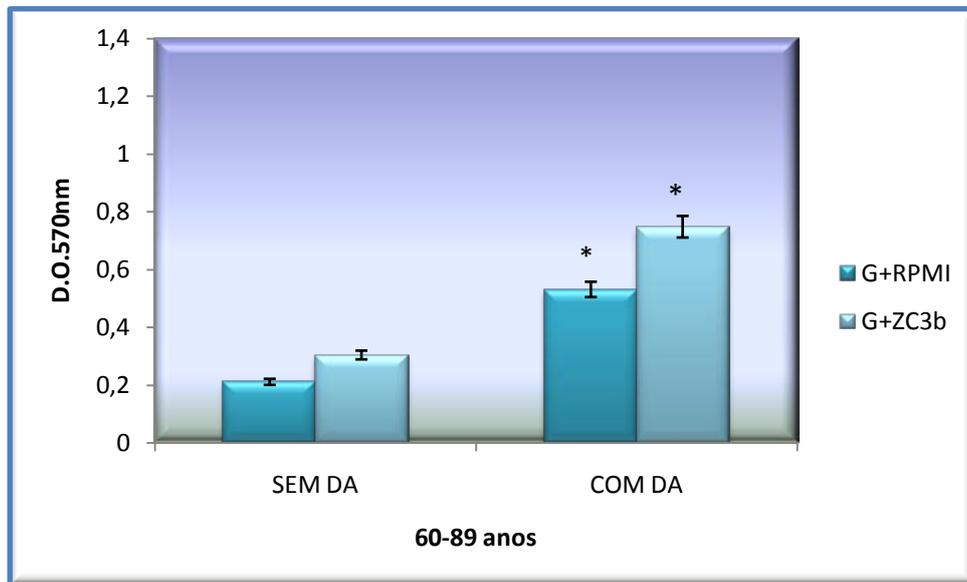


Figura 12 – Estudo do efeito redutor celular em doadores na faixa etária de 60-89 anos sem e com Alzheimer (DA). N=20 doadores de cada faixa etária. Os valores representam média \pm E.P de 18 experimentos com MTT em cada grupo. D.O. = densidade óptica; G= granulócitos; RPMI = Meio de cultura; EP= erro padrão; MTT = sal de tretazolium; ZC3b = zimozan opsonizado. * = significativa $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney que comparou (G+RPMI) e (G+ZC3b).

Uma vez verificada que a capacidade fagocítica tanto durante o processo de envelhecimento quanto na doença de Alzheimer se encontra alterada, o nosso próximo passo foi verificar se a adrenalina (AD) poderia modificar este quadro. Os resultados são mostrados a seguir:

4.2.4- *Análise por faixa etária.*

Nossos resultados mostram que quando granulócitos das faixas etárias de 20-39; 40-59 e 60-80 anos foram incubados com adrenalina (AD) na concentração de 10^{-9} M ocorreu um aumento da capacidade redutora celular, gerada pelo processo fagocítico, que foi significativo $p < 0,05$, em todas as faixas etárias, pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (figura 13).

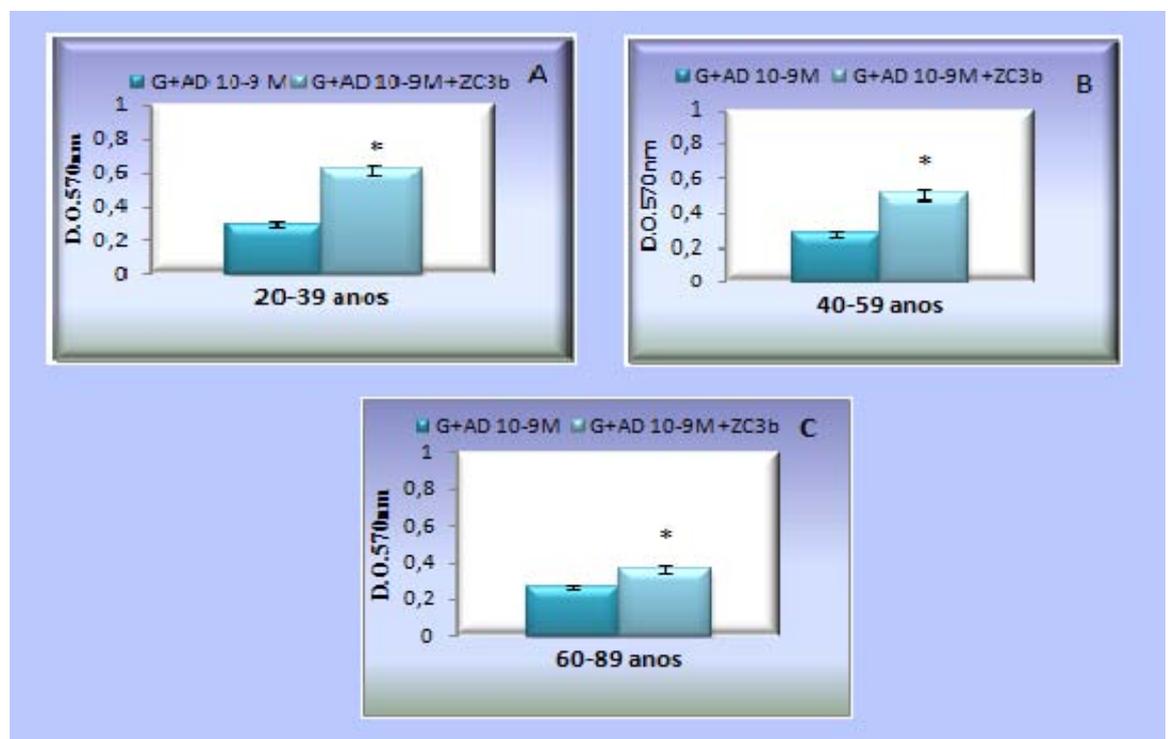


Figura 13-Estudo do poder redutor de granulócitos em presença de adrenalina 10^{-9} M pelo ensaio de MTT em três faixas etárias. O painel (A) representa a faixa etária 20-39 anos, (B) 40-59 e (C) 60-89 anos. G = Granulócitos; RPMI = Meio de cultura; ZC3b = zimosan opsonizado com C3b; AD= adrenalina* = significativamente diferente $p < 0,05$ avaliados pelo teste de Mann-Whitney que comparou $(G + 10^{-9}M + ZC3b)$ em relação $(G + 10^{-9}M)$

4.2.5- *Durante o processo de envelhecimento:*

A figura 14 mostra que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a capacidade redutora celular de granulócitos estimulados com adrenalina (AD) 10^{-9} M sem estímulo com ZC3b, pelo teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis. Entretanto, quando granulócitos foram incubados com AD 10^{-9} M e avaliados no processo fagocítico, verificamos uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da capacidade redutora celular durante o processo de envelhecimento.

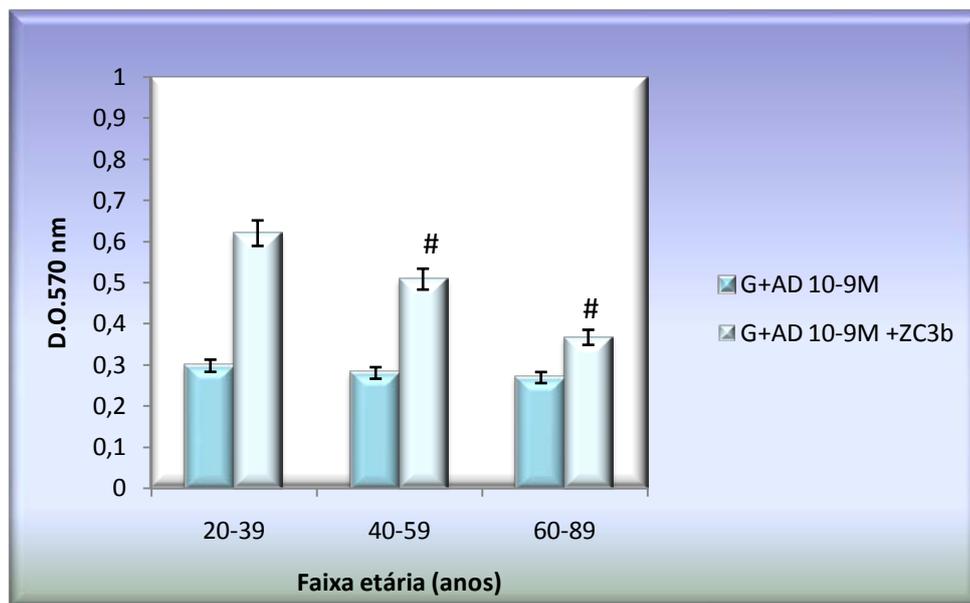


Figura 14- Avaliação do poder redutor de granulócitos em presença de adrenalina 10^{-9} M pelo ensaio de MTT durante o processo de envelhecimento. G = Granulócitos; RPMI = Meio de cultura; ZC3b = zimosan opsonizado com C3b; AD= adrenalina. #= significativamente diferentes $p < 0,05$ pelo teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis .

4.2.6-Avaliação comparativa de doadores com e sem Alzheimer na faixa etária 60-89 anos em presença de adrenalina $10^{-9}M$.

Os resultados da figura 15 mostram que granulócitos de doadores com Alzheimer estimulados com adrenalina $10^{-9}M$ e avaliados durante o processo fagocítico apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) da capacidade redutora celular pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney quando comparados com granulócitos de doadores sem Alzheimer na mesma faixa etária.

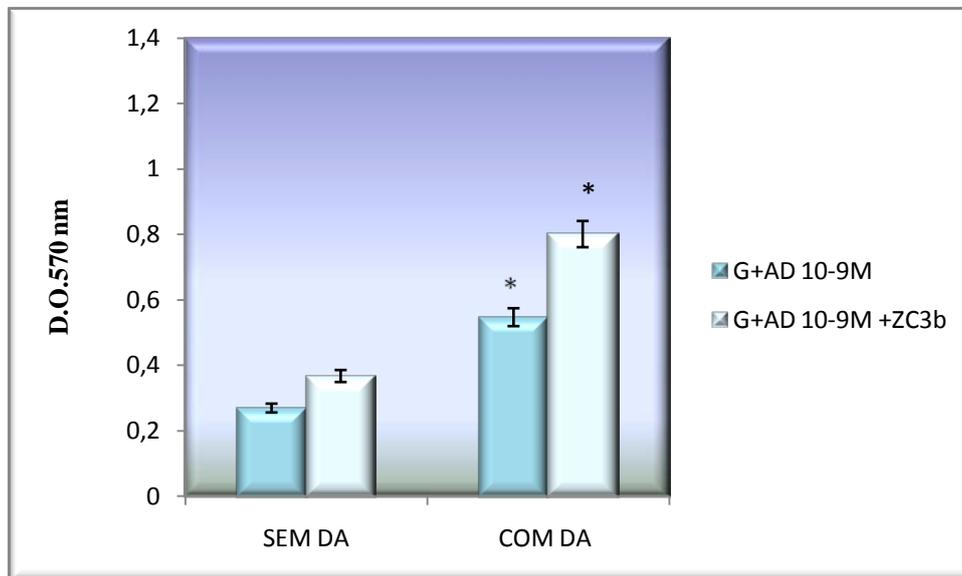


Figura 15 – Estudo do efeito redutor celular em doadores na faixa etária de 60-89 anos sem e com Alzheimer (DA) em presença de adrenalina $10^{-9}M$.

Os valores representam média \pm E.P de 18 experimentos com MTT em cada grupo. D.O. = densidade óptica; G= granulócitos; RPMI = Meio de cultura; EP= erro padrão; MTT = sal de tretazolium; ZC3b = zimozan opsonizado, AD= adrenalina. * = significativa $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Withney que comparou (G+RPMI) e (G+AD $10^{-9}M$ ZC3b).

Após a avaliação da influência da adrenalina ($10^{-9}M$) na capacidade redutora celular em presença ou ausência do processo fagocítico, foi de nosso interesse verificar se o aumento da concentração de AD ($10^{-8}M$) poderia alterar os resultados acima apresentados.

4.2.7-Análise por faixa etária

Nossos resultados mostram que quando granulócitos das faixas etárias de 20-39; 40-59 e 60-80 anos foram incubados com adrenalina (AD) na concentração de 10^{-8} M ocorreu um aumento da capacidade redutora celular, gerada pelo processo fagocítico, que foi significativo $p < 0,05$, em todas as faixas etárias, pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (figura 16).

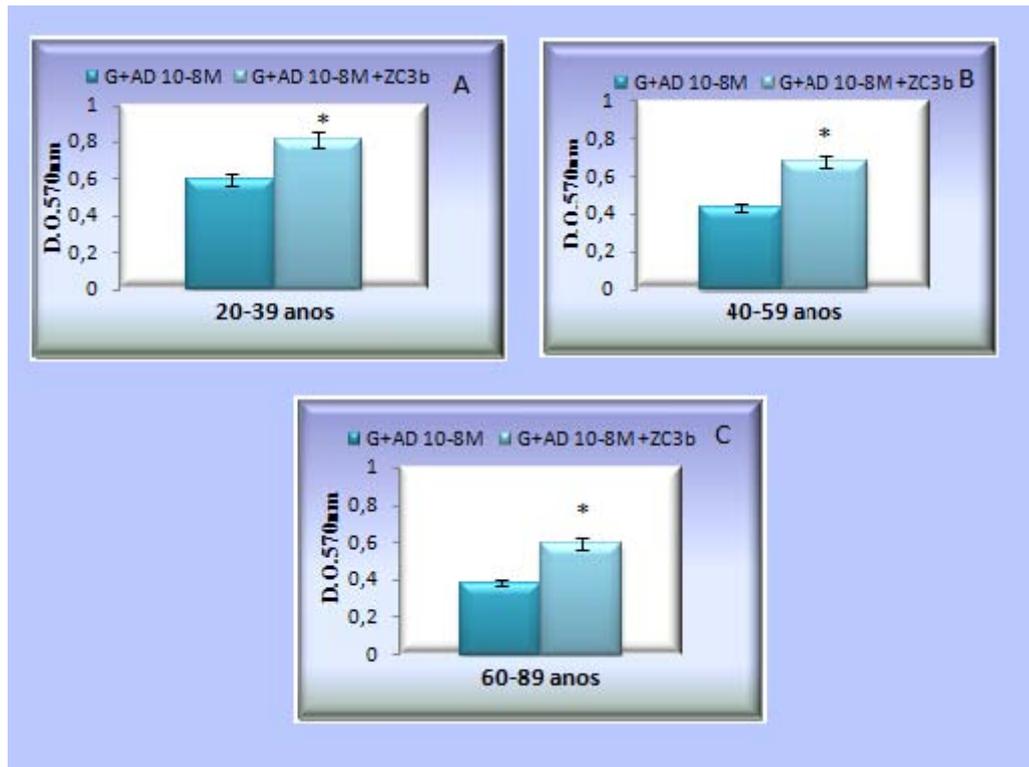


Figura 16- Estudo do poder redutor de granulócitos em presença de adrenalina 10^{-8} M pelo ensaio de MTT em três faixas etárias.

O painel (A) representa a faixa etária 20-39 anos, (B) 40-59 e (C) 60-89 anos. G = Granulócitos; RPMI = Meio de cultura; ZC3b = zimozan opsonizado com C3b; AD= adrenalina* = significativamente diferente $p < 0,05$ avaliados pelo teste de Mann-Whitney que comparou ($G + 10^{-8}$ M + ZC3b) em relação ($G + 10^{-8}$ M).

4.2.8-Durante o processo de envelhecimento.

A figura 17 mostra que a adrenalina na concentração de 10^{-8} M diminui tanto a capacidade redutora de granulócitos na presença ou não do processo fagocítico durante o envelhecimento. A significância destes resultados foi avaliada pelo testes de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis.

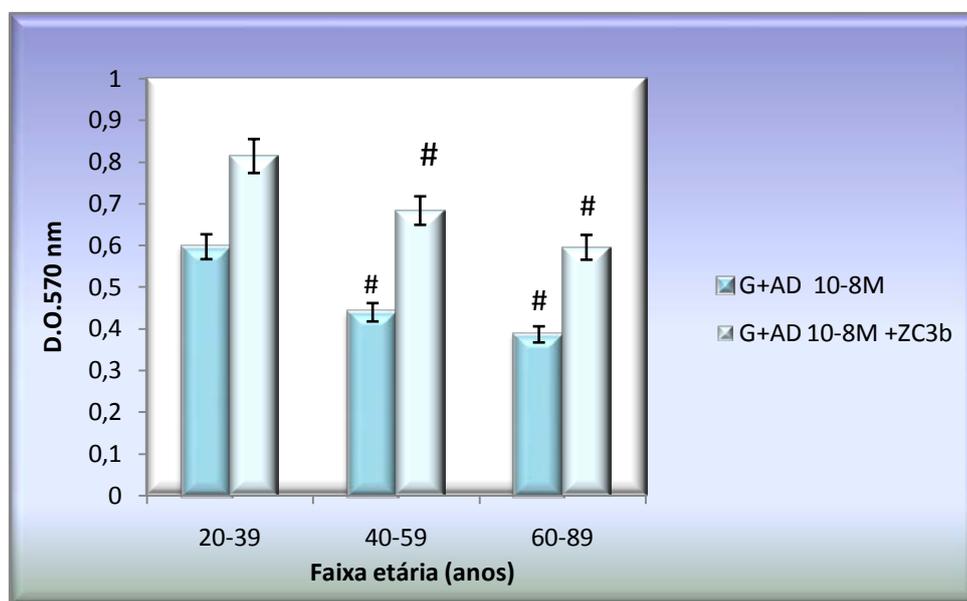


Figura 17-Avaliação do poder redutor de granulócitos em presença de adrenalina 10^{-8} M pelo ensaio de MTT durante o processo de envelhecimento. G = Granulócitos; RPMI = Meio de cultura; ZC3b = zimozan opsonizado com C3b; AD= adrenalina
= significativamente diferentes $p < 0,05$ pelo teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis

Outra análise importante foi quando comparamos o efeito das concentrações de adrenalina sobre a capacidade redutora celular em presença ou ausência de fagocitose. Nossos resultados mostram na concentração de 10^{-9} M uma eficiência do processo fagocítico de 100%, 81% e 36% nas faixas etárias de 20-39, 40-59 e 60-89 anos respectivamente. Entretanto, quando granulócitos foram incubados com adrenalina na concentração de 10^{-8} M verificamos uma redução de 64% e 26% da capacidade fagocítica nas faixas etárias de 20-39 e 40-59 anos e um aumento da capacidade redutora de 20% na faixa etária de 60-89 anos em relação à concentração de 10^{-9} M. Estas comparações foram significativas $p < 0,05$ pelo teste não paramétrico de Mann-Whithney.

4.2.9-Avaliação comparativa dos de doadores com e sem Alzheimer na faixa etária 60-89 anos em presença de adrenalina $10^{-8}M$.

Os resultados da figura 18 mostram que granulócitos de doadores com Alzheimer estimulados com adrenalina $10^{-8}M$ e avaliados durante o processo fagocítico apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) da capacidade redutora celular pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney quando comparados com granulócitos de doadores sem Alzheimer na mesma faixa etária.

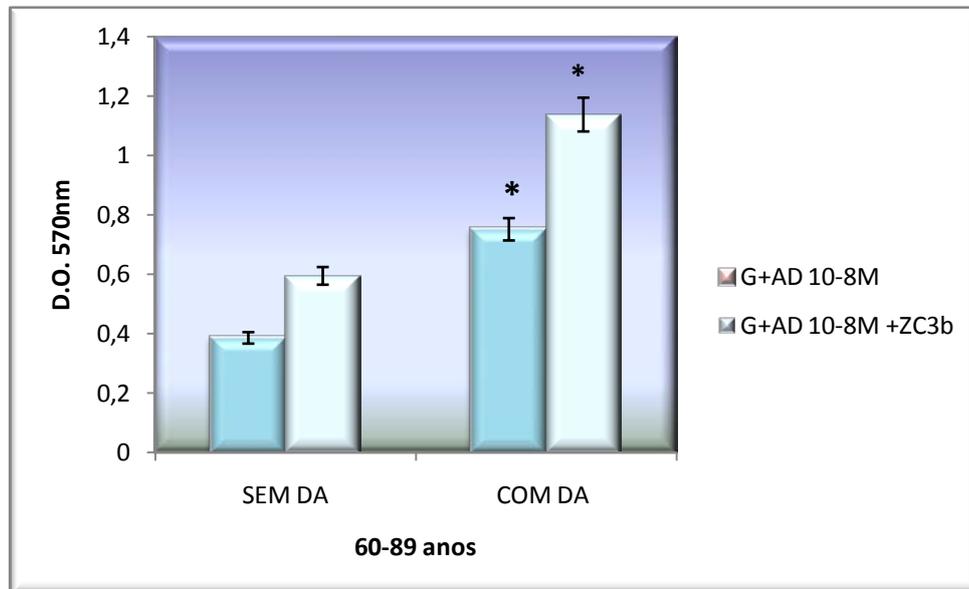


Figura 18 – Estudo do efeito redutor celular em doadores na faixa etária de 60-89 anos sem e com Alzheimer (DA) em presença de adrenalina $10^{-8}M$. Os valores representam média \pm E.P de 18 experimentos com MTT em cada grupo. D.O. = densidade óptica; G= granulócitos; RPMI = Meio de cultura; EP= erro padrão; MTT = sal de tretazolium; ZC3b = zimozan opsonizado, AD= adrenalina. * = significativa $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Withney que comparou (G+RPMI) e (G+ZC3b).

4.3-AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) PELA REAÇÃO DE GRIESS.

4.3.1-Análise por faixa etária

A figura 19 mostra a produção de óxido nítrico por granulócitos em três diferentes faixas etárias, a saber: 20-30, 40-59 e 60-89 anos. Nossos resultados mostraram um aumento significativo $p < 0,05$ da produção de óxido por granulócitos em todas as faixas etárias quando estes foram incubados com zimozan opsonizados com C3b (ZC3b) .

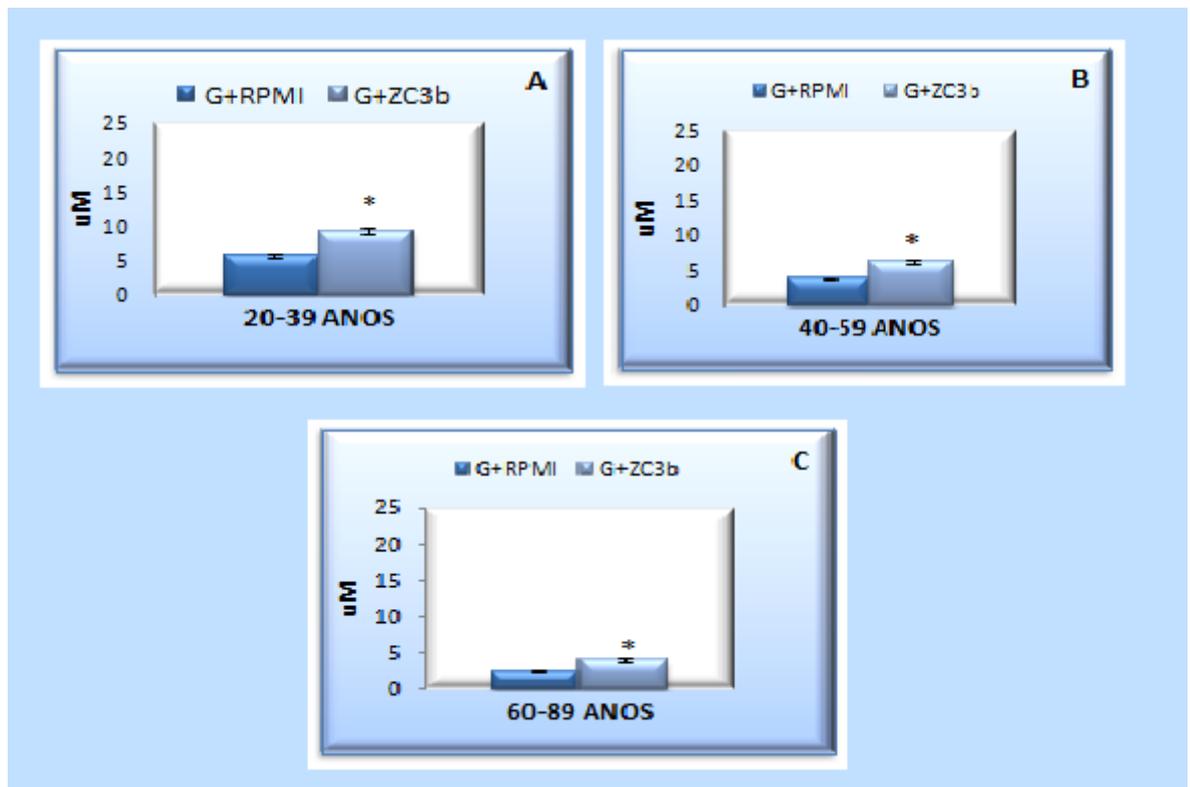


Figura 19-Estudo da produção do óxido nítrico por granulócitos durante o processo fagocítico em três faixas etárias.

O painel (A) representa a faixa etária 20-39 anos, (B) 40-59 e (C) 60-89 anos.

G = Granulócitos; RPMI = Meio de cultura; ZC3b = zimozan opsonizado com C3b.

* =significativamente diferente $p < 0,05$ avaliados pelo teste de Mann-Whitney que comparou (G+ ZC3b) em relação (G+RPMI).

4.3.2-Durante o processo de envelhecimento.

Os resultados da tabela 8 mostram que durante o processo de envelhecimento ocorreu uma diminuição da produção de óxido nítrico por granulócitos, tanto em ausência (30% e 58%) como em presença (32% e 55%) de fagocitose. Verificamos que quando comparamos as três faixas etárias entre si através do teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis observamos que todas foram significativas.

Tabela 8 -Avaliação comparativa da produção de óxido nítrico por granulócitos nas faixas etárias de 20-39, 40-59 e 60-80 anos.

FAIXAS ETÁRIAS	μM (média ± EP)				N
	(G+RPMI)	% inibição	(G+RPMI+ZC3b)	% Inibição	
20-39 anos	5,9 ± 0,28		9,4 ± 0,25		21
40-59 anos	4,1 ± 0,16	30 [#]	6,4 ± 0,16 [#] 32 [#]		22
60-89 anos	2,5 ± 0,02	58 [#]	4,2 ± 0,15 [#]	55 [#]	31

Os resultados foram expressos através da média ± erro padrão (EP).

D.O. = densidade óptica; G= granulócitos; RPMI = Meio de cultura; EP= erro padrão; ZC3b = zimozan opsonizado com C3b.

= Significativo ($p < 0,05$) pelo teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis.

4.3.3-Avaliação comparativa de doadores com e sem Alzheimer na faixa etária 60-89 anos .

A tabela 9 mostra que a produção de óxido nítrico por granulócitos de doadores com Alzheimer em presença de ZC3b não difere significativamente ($p > 0,05$) da produção basal destes, pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Nossos resultados mostraram também que granulócitos de doadores com Alzheimer geram uma menor porcentagem de óxido nítrico tanto em condição basal (41%) como estimulada com ZC3b (67%) quando comparados com granulócitos de doadores sem Alzheimer pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (tabela 9).

Grupos Faixa etária (60-89 anos)	μM (média ± EP)				N
	(G+RPMI)	% inibição	(G+RPMI+ZC3b)	% Inibição	
SEM DA	2,5 ± 0,14		4,2 ± 0,15		31
COM DA	1,48 ± 0,08	41*	1,38 ± 0,06 ^{N.S.} 6 ^{N.S.} ; 67*		15

Tabela 9-Avaliação comparativa da produção de óxido nítrico por granulócitos de doadores sem e com Alzheimer.

Os resultados foram expressos através da média ± erro padrão (EP).

D.O. = densidade óptica; G= granulócitos; RPMI = Meio de cultura; EP= erro padrão; ZC3b = zimozan opsonizado com C3b.

* = Significativo ($p < 0,05$) pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

N.S. = não significativo pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Nosso próximo passo foi avaliar a influência da adrenalina na produção de óxido nítrico como foi avaliado na fagocitose e capacidade redutora celular.

4.3.4-Análise por faixa etária

A Tabela 10 mostra que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a produção basal de óxido nítrico por granulócitos estimulados com adrenalina $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$ (AD) quando as faixas etárias de 20-39 e 40-59 anos foram comparadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Entretanto, quando estas mesmas faixas etárias foram comparadas com a faixa etária de 60-89 anos verificamos uma diminuição significativa ($p < 0,05$). Verificamos também que na faixa etária de 60-89 anos não ocorreu diferença significativa ($p > 0,05$) entre a produção basal e no processo fagocítico de NO.

Ao fazermos as mesmas comparações na presença de ZC3b, verificamos os mesmos resultados acima descritos (tabela 10).

4.3.5-Durante o processo de envelhecimento.

Quando avaliamos as possíveis diferenças durante o processo de envelhecimento verificamos que pelo teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis, a produção de óxido nítrico tanto basal quanto na presença de ZC3b foi significativa na faixa etária de 60-89 anos quando comparada com as faixas etárias de 20-39 e 40-59 anos (tabela 10).

Tabela 10-Estudo da produção de óxido nítrico por granulócitos de doadores em presença de adrenalina $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$.

FAIXA ETÁRIA	μM (média \pm EP)			N
	(G+AD $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$)	(G+ AD $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$ +ZC3b)	% Ativação	
20-39 anos	$7,7 \pm 0,20$	$10,3 \pm 0,16$	34	21
40-59 anos	$6,6 \pm 0,09$	$8,9 \pm 0,19$	35	22
60-89 anos	$4,2 \pm 0,17^{* \#}$	$4,4 \pm 0,13^{\text{N.S.} * \#}$	05	31

Os resultados foram expressos através da média \pm erro padrão (EP).

D.O. = densidade óptica; G= granulócitos; RPMI = Meio de cultura; EP= erro padrão; ZC3b = zimozan opsonizado com C3b.

* = Significativo ($p < 0,05$) pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney,

= Significativo ($p < 0,05$) pelo teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis.

4.3.3-Avaliação comparativa de doadores com e sem Alzheimer na faixa etária 60-89 anos .

Nossos resultados mostram que granulócitos de doadores com Alzheimer não diferem significativamente ($p > 0,05$) na produção de óxido nítrico quando comparados com doadores sem Alzheimer estimulados com adrenalina $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$, tanto em condições basais quanto no processo fagocítico pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (tabela 11).

Tabela 11-Estudo da produção de óxido nítrico por granulócitos de doadores sem e com Alzheimer em presença de adrenalina $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$.

Grupos Faixa etária (60-89 anos)	μM (MÉDIA \pm EP)		N
	(G+AD $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$)	(G+ AD $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$ +ZC3b)	
SEM DA	$4,4 \pm 0,17$	$4,2 \pm 0,13^{\text{N.S}}$	31
COM DA	$4,2 \pm 0,19$	$4,4 \pm 0,15^{\text{N.S}}$	15

Os resultados foram expressos através da média \pm erro padrão (EP).

D.O. = densidade óptica; G= granulócitos; RPMI = Meio de cultura; EP= erro padrão; ZC3b = zimosan opsonizado com C3, AD = adrenalina.

N.S. = Não significativo pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Nosso passo final neste estudo foi avaliar se a concentração de adrenalina de ($1,7 \times 10^{-8} \text{M}$) poderia alterar a geração de óxido nítrico gerada pela concentração de ($1,7 \times 10^{-9} \text{M}$) tanto no processo de envelhecimento (faixas etárias) quanto em doadores com Alzheimer.

4.3.7-Análise por faixas etárias e durante o processo de envelhecimento.

A figura 20 mostra que granulócitos de doadores nas faixas etárias de 20-39 e 40-59 anos apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre a produção de óxido nítrico quando estimulados apenas com adrenalina $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$ (AD) e estimulados com adrenalina $1,7 \times 10^{-8} \text{M} + \text{ZC3b}$ (figura 20). Entretanto, ao avaliarmos a faixa etária de 60-89 anos verificamos que não existe diferença significativa ($p > 0,05$) quando a mesma comparação foi realizada.

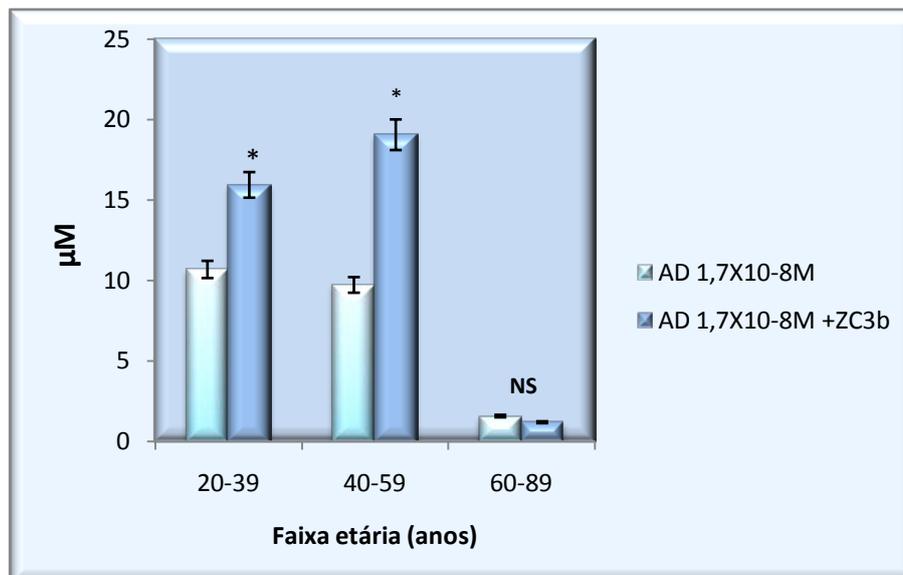


Figura 20 – Estudo da produção de óxido nítrico por granulócitos em presença de adrenalina $1,7 \cdot 10^{-8} \text{M}$. G = Granulócitos; RPMI = Meio de cultura; ZC3b = zimosan opsonizado com C3b; AD = Adrenalina.

*= significativamente diferente $p < 0,05$ avaliados pelo teste de Mann-Whitney que comparou ($G + 1,7 \times 10^{-8} \text{M} + \text{ZC3b}$) em relação ($G + 1,7 \times 10^{-8} \text{M}$).

N.S. = Não significativo pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney

Quando avaliamos o efeito da estimulação de granulócitos com adrenalina $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$ durante o processo de envelhecimento observamos que a produção de NO da faixa etária 60-89 anos é significativamente menor do que as outras faixas etárias $p < 0,05$ pelo teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis. Ao analisarmos o efeito da adrenalina no processo fagocítico observamos que ocorre diferença significativa ($p < 0,05$) entre as três faixas etárias.

Tabela 12- Estudo da produção de óxido nítrico por granulócitos de doadores em presença de adrenalina $1,7 \times 10^{-8} M$

FAIXAS ETÁRIAS	μM (MÉDIA \pm EP) %			N
	(G+AD $1,7 \times 10^{-8} M$)	(G+ AD $1,7 \times 10^{-8} M$ +ZC3b)	Ativação	
20-39 anos	10,1 \pm 0,13	15,9 \pm 0,2157		21
40-59 anos	9,7 \pm 0,20	18,9 \pm 0,36* [#]	94	22
60-89 anos	1,6 \pm 0,08 [#]	1,2 \pm 0,06* [#]		31

Os resultados foram expressos através da média \pm erro padrão (EP).

D.O. = densidade óptica; G= granulócitos; RPMI = Meio de cultura; EP= erro padrão; ZC3b = zimozan opsonizado com C3b, AD = adrenalina .

*= significativamente diferente $p < 0,05$ avaliados pelo teste de Mann-Whitney que comparou (G+ $1,7 \times 10^{-8} M$ +ZC3b) em relação (G+ $1,7 \times 10^{-8} M$).

= Significativo ($p < 0,05$) pelo teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis.

Da mesma forma como fizemos com a capacidade redutora comparando o efeito das concentrações de adrenalina sobre a capacidade redutora celular em presença ou ausência de fagocitose realizaremos com a produção de óxido nítrico (NO). Nossos resultados mostraram que na concentração de $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$ ocorreu uma eficiência na liberação de NO durante o processo fagocítico de 33% e 34% nas faixas etárias de 20-39 e 40-59 anos respectivamente. Já na faixa etária de 60-89 anos não ocorreu aumento da produção de NO quando comparado com a produção basal. Quando granulócitos foram incubados com adrenalina na concentração de $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$ verificamos um aumento de 26% e 60% da produção de NO nas faixas etárias de 20-39 e 40-59 anos e uma produção não significativa de NO na faixa etária de 60-89 anos em relação a concentração de $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$.

4.3.-Avaliação comparativa de doadores com e sem Alzheimer na faixa etária 60-89 anos .

Nossos resultados mostram que granulócitos de doadores com Alzheimer não diferem significativamente ($p > 0,05$) na produção de óxido nítrico quando estimulados com adrenalina $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$, tanto em condições basais quanto no processo fagocítico pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (tabela 13).

Quando comparamos a produção de óxido nítrico (NO) por granulócitos de doadores sem e com Alzheimer em presença ou ausência do processo fagocítico estimulados com AD $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$, verificamos que não existe diferença significativa ($p > 0,05$) pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (tabela 13).

Tabela 13-Estudo da produção de óxido nítrico por granulócitos de doadores sem e com Alzheimer em presença de adrenalina $1,7 \cdot 10^{-8} \text{M}$.

GRUPO	μM (MÉDIA \pm EP)		N
	(G+AD $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$)	(G+ AD $1,7 \times 10^{-8} \text{M} + \text{ZC3b}$)	
SEM DA	1,6 \pm 0,08	1,5 \pm 0,06 ^{N.S}	31
COM DA	1,5 \pm 0,08	1,4 \pm 0,06 ^{N.S}	15

Os resultados foram expressos através da média \pm erro padrão (EP).

D.O. = densidade óptica; G= granulócitos; RPMI = Meio de cultura; EP= erro padrão; ZC3b = zimozan opsonizado com C3b, AD = adrenalina.

N.S. = Não significativo pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney

DISCUSSÃO

5-DISCUSSÃO

O envelhecimento é uma experiência que todo ser humano compartilha, mas nem sempre compreende. Não apenas o entendimento do processo de envelhecimento é fundamental como também determinar as causas do envelhecimento e intervenções necessárias para o seu adiamento. Do modo mais simples, o envelhecimento é o tempo cronológico de existência desde o nascimento até a morte, sendo tempo e idade relativos sob interpretação. Apesar ser de fácil detecção a idade física, é quase imperceptível aos olhos a idade fisiológica (SPIRDUSO, *et. al.*, 2005).

Com o envelhecimento, a massa de vários sistemas como o muscular, ósseo e cerebral, diminui. Funções fisiológicas como gasto energético total, quantidade espontânea de movimentos, reflexos, tônus e resistência muscular, batimento cardíaco máximo, função cognitiva, e taxa de filtração glomerular diminuem continuamente com o passar dos anos. Menor quantidade e velocidade de movimentos, menor massa muscular, acúmulo de excreções celulares, desorganização nuclear e celular, e enrugamento são características da senescência (CUMMINGS, 2007). Além do acúmulo progressivo de mudanças deletérias resultando em declínio funcional e aumento da probabilidade de doenças e morte. (TERMAN *et. al.*, 2006).

O processo de envelhecimento pode ser definido como diminuição progressiva e geral das funções do organismo, diminuindo a habilidade de reagir a mudanças adaptativas, e manter o seu estado de equilíbrio. Ele é ligado a um estresse oxidativo crônico nos quais afeta todas as células do organismo, mas especialmente as células do sistema neuroimunoendócrino. Os sistemas nervoso central, imune e endócrino, são os maiores sistemas adaptativos, nos quais, respondem rapidamente a numerosas mudanças. Inúmeras evidências, apontam para a existência de uma integração entre eles (CALABRESE, *et.al.*, 2009). Eles apresentam vias bidirecionais, que é necessário o perfeito equilíbrio entre, hormônios, citocinas, sistemas adaptativos, incluindo eixo HPA (Hipófise Pituitária Adrenal) e SNS (Sistema Nervoso Simpático). Esse balanço influencia na efetividade da resposta imune (ELENKOV, *et.al.*, 2008).

O sistema neuroimunoendócrino pode demonstrar grande dano oxidativo e desequilíbrio no balanço redutor, podendo sofrer perda funcional e da homeostase entre eles,

resultando em um aumento da morbidade e mortalidade em idosos. Nesse contexto, o sistema imune precisa gerar continuamente componentes oxidativos e inflamatórios, podendo ativar, se não estiver em equilíbrio, alguns fatores com NF- κ B. Se essa ligação entre componentes oxidativos e inflamatórios não estiver sob controle, inicia-se um círculo. Não existindo um controle desse círculo, estes componentes podem se desorganizar, e alterar o funcionamento das células do sistema imune no idoso. Esses fatores contribuem para manutenção do estresse oxidativo crônico. Evidências apontam que o sistema imunológico, pode iniciar um estado oxidativo, não controlado e processo inflamatório, fatores esses que estão ligados ao processo de envelhecimento (DE LA FUENTE, *et.al.*, 2009)

No sistema imune os granulócitos são as células leucocitárias mais abundantes. Eles são mediadores de uma resposta imune inata, quando são invadidas por microorganismos. A habilidade dos neutrófilos em neutralizar rapidamente a agentes invasores é indispensável para a manutenção da saúde. Quaisquer alterações nessas células podem levar a um quadro inflamatório recorrente e uma maior vulnerabilidade a algumas doenças, aumentando a morbidade e mortalidade, com o avanço da idade (FORTIN, *et.al.*, 2008). Os granulócitos, estão envolvidos na resposta aguda a agentes infecciosos e algumas funções dessas células, estão comprometida com o envelhecimento (FORTIN, *et.al.*, 2008, LORD, *et.al.*, 2001). A associação entre mudanças metabólicas em granulócitos, relacionadas com a idade, são bem documentas, porém os mecanismos que as levam, ainda não são bem definidos (WESSELS *et.al.*, 2010). No idoso a habilidade fagocítica e explosão respiratória em neutrófilos tem sido objeto de discussões e na literatura resultados controversos são encontrados (FORTIN, *et.al.*, 2008).

A associação entre uma desordem no tempo de sobrevivência do neutrófilo e processo inflamatório foi documentado. No idoso esse tempo de sobrevivência é maior, sendo esse um fator que pode contribuir para o maior acometimento de doenças que envolvem ativação do processo inflamatório. A mitocôndria é um componente central no qual coordena as vias patológicas desse processo (KOBAYASHI, *et.al.*, 2009).

Quando uma célula do sistema imune entra em contato com agentes exógeno ou endógeno, existe uma interação ligante receptor que ativa resposta imune inata. Essa interação também estimula a secreção de citocinas pró-inflamatórias. As citocinas prolongam o tempo de sobrevivência dos neutrófilos, elas geram um sinal que trafega através do nervo vago até o tronco cerebral, onde ocorre uma integração do sinal que ativa duas vias: uma via

antiinflamatória colinérgica que leva a diminuição NF- κ B e diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias. Outra via do SNS, também exerce efeitos antiinflamatórios, dependendo dos receptores aos quais são integrados. A partir do estímulo que chega ao núcleo do trato solitário, o eixo hipófise pituitária adrenal-HPA é ativado, através de neurônios simpáticos excitatórios medulares ventro lateral rostral. Esses sinais estimulam a glândula supra-renal que libera adrenalina que interage, seja com os receptores β -adrenérgicos, (essa interação ligante-receptor levam a uma diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocinas antiinflamatórias), ou com receptores alfa-adrenérgicos (onde as catecolaminas podem exercer efeitos pró-inflamatórios) (ELENKOV, *et.al.*, 2000, MATTHAY & WARE, 2004 ROSAS-BALLINA & TRACEY, 2009, TRACEY, 2009).

Quando os granulócitos são estimulados por algum agente nocivo, o processo fagocítico inicia-se, os microorganismos podem ser ingeridos através da ligação em diferentes receptores de membrana dos fagócitos. Alguns se ligam a microorganismos e outros a microorganismos opsonizados. Eles são internalizados para dentro dos fagossomos, aos quais se ligam aos lisossomos, para formar os fagolisossomos, onde os microorganismos são destruídos por intermediários reativos de oxigênio, nitrogênio e enzimas proteolíticas (ABBAS, *et.al.*, 2008).

Nossos resultados mostraram que granulócitos das três faixas etárias, a saber: 20-39, 40-59 e 60-89 anos, foram eficientes em fagocitar partículas opsonizadas por C3b (figura 5).

Alguns estudos propõem que várias funções dos granulócitos estão comprometidas no idoso. Isso contribui para o aparecimento de algumas doenças que podem ser explicadas por um desequilíbrio na função dos neutrófilos (FORTIN, *et.al.*, 2008). O comprometimento destas funções como, capacidade fagocítica, síntese de intermediários reativos de oxigênio, eficiência na eliminação de patógenos dos neutrófilos nos idosos são alteradas.

Uma das principais funções dos neutrófilos é a fagocitose, a base molecular para a redução da fagocitose em idosos não é bem entendida, alguns trabalhos relatam que, a diminuição na atividade fagocítica em idosos é reduzida, devido a mudanças na polimerização actínica (BUTCHER, *et.al.*, 2001). Outro estudo revelou que essa redução é devida a diminuição da ativação do receptor $Fc\gamma$ (CD16) os quais são necessários para a fagocitose (BUTCHER, *et.al.*, 2001). Neste contexto, um trabalho realizou a medida do

indicador fagocítico (% neutrófilos fagocitados x média intensidade de fluorescência) bem como, a geração de superóxido em resposta a estímulo por (fMLP), comparando células de jovens e idosos. Os autores observaram que estas células, ao realizarem o processo fagocítico, obtiveram uma redução na fagocitose e aumento na geração de superóxido em idosos quando comparados a indivíduos jovens (BUTCHER, *et.al.*,2001). Outros trabalhos relatam que granulócitos apresentam capacidade diminuída de fagocitar algumas bactérias como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, em idosos (WENISCH, *et.al.*,2000).

Os nossos resultados, confirmaram o envolvimento do processo de envelhecimento, na habilidade fagocítica, através da redução significativa ($p < 0,05$) pelo teste não paramétrico de Mann Whitney, demonstrando que existe uma diferença da capacidade fagocítica, entre jovens e idosos que se inicia a partir de 40 anos de idade (Figuras 5 e 6).

Outro estudo de grande relevância no campo da avaliação da fagocitose consiste em verificar como ela se comporta em patologias que estão ligadas ao processo de envelhecimento.

Neste contexto, o aumento exponencial na ocorrência de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (DA), com a idade cronológica, sugerem que embora suas etiologias sejam diferentes o processo de envelhecimento, e as doenças neurodegenerativas relacionadas com a idade, têm alguns mecanismos em comum (YAP, *et.al.*,2009).

Alterações imunomoduladoras são fatores evidentes na patogênese da DA (MACCIONI, *et.al.*, 2009) A hipótese é de que exista alguma alteração na integração entre mecanismos que promovam danos celulares ativando a cascata inflamatória resultando em alterações a nível cerebral (MACCIONI, *et.al.*, 2009).

Esses fatores fazem com que exista a ativação do sistema imune inato o qual modifica a atividade de receptores na superfície celular. Dessa forma as células do sistema imune inato são ativadas, fazendo com que ocorra uma super produção de citocinas as quais tem sido consideradas aumentadas nessa patologia ativando a cascata neuroinflamatória, levando a um dano cerebral correlacionado com declino cognitivo (MACCIONE, *et.al.*,2009). Na DA, o sistema imune inato auxilia na prevenção de danos neuro- tóxicos, participando no processo de eliminação de proteínas que comprometem o SNC (RIVEST, *et.al.*,2009). Estudo feito em macrófagos demonstrou que na DA existe uma ineficiência na destruição de proteínas β -Amilóide, e uma ineficiência na fagocitose nesses doentes em relação a idosos

sem DA além de uma diminuição da efetividade em eliminar esse peptídeo fazendo com que ele se acumule (FIALA,*et.al.*,2007).Um estudo realizado com macrófagos utilizando citometria de fluxo demonstrou que a fagocitose normal da β -Amilóide está relacionada com menor risco de DA (AVAGYAN, *et.al.*,2009). Maccione, *et.al.*, (2009), observaram que alguns fatores de risco como: dislipidemia, alterações vasculares, estresse oxidativo, estão relacionados com DA e que os mesmos ativam uma cascata inflamatória e a imunidade inata.

Inúmeros trabalhos têm sido realizados na tentativa de compreender aspectos envolvidos com o processo fagocítico na doença de Alzheimer, porém o comportamento de outros tipos de células da imunidade inata, como os granulócitos, ainda não foram bem definidos (FORTIN, *et.al.*, 2008). Neste contexto, os nossos resultados com granulócitos em ausência de adrenalina, não mostraram diferença significativa ($p>0,05$) entre as porcentagens de fagocitose quando comparamos células de doadores com (56,9%) e sem (56,6%) Alzheimer (Figuras 7 e 8).

Como relatamos anteriormente, um equilíbrio entre os sistemas adaptativos se faz necessário. Dessa forma, com a confirmação do comprometimento da habilidade fagocítica, durante o processo de envelhecimento e a semelhança deste processo na doença de Alzheimer, nós buscamos através do nosso estudo observar se existe algum comprometimento do eixo neuroimune avaliando influência da adrenalina em células do sistema imune.

Estudos prévios utilizando sangue periférico, demonstraram alterações, na fagocitose e explosão respiratória em resposta a um elevado nível de catecolaminas circulantes (MADDEN, *et.al.*,1995). Estudos *in vitro*, demonstraram que hormônios adrenérgicos podem alterar todas as fases de uma resposta imune, modificando funções como, produção de citocinas, proliferação de linfócitos. Em modelos de animais de doenças auto imunes, a inervação simpática, é reduzida antes do início dos sintomas da doença e uma simpatectomia química pode exacerbar a gravidade da doença. Esses resultados ilustram a importância do SNS na modulação imune em condições patológicas e não patológicas (CHRISTO,*et.al.*, 1996).

O eixo HPA é uma das vias que coordena a liberação de alguns hormônios, entre eles adrenalina. Ela funciona como reguladora central do metabolismo e uso de energia, além de coordenar respostas fisiológicas entre os organismos, através da sinalização hormonal. Com o envelhecimento algumas vias de sinalização que são regulados pelo eixo HPA estão alteradas (AGUILERA,*et.al.*,2010, BISHOP, *et.al.*,2010, CONRAD, *et.al.*,2010).

Nesse contexto, estudamos o efeito da adrenalina sobre a capacidade fagocítica e a possível existência de uma relação com o processo de envelhecimento. Quando avaliamos o perfil fagocítico de granulócitos estimulados com adrenalina ($AD\ 1,7 \times 10^{-9}M$ e $1,7 \times 10^{-8}M$), verificamos que as duas concentrações foram capazes de gerar um aumento da fagocitose pelos granulócitos nas faixas etárias de 20-39 e 40-59 anos, diferentemente do perfil encontrado, na faixa etária de 60-89 anos (Figura 9), onde somente na concentração de ($1,7 \times 10^{-8}M$), encontramos um aumento significativo $p < 0,05$ na porcentagem de células fagocíticas nessa faixa etária (Tabela 5).

Estes resultados sugerem que exista uma necessidade maior de estímulo para que ocorra a fagocitose demonstrando uma ineficiência na comunicação do sistema imune e nervoso durante o processo de envelhecimento. Além disso, verificamos também, que a adrenalina, influencia na atividade fagocítica e que durante o envelhecimento, pode existir uma alteração na sinalização da adrenalina e conseqüentemente, perda da efetividade em manter a ativação, tornando a fagocitose menos eficiente nessa faixa etária, justificando a maior propensão dos idosos ao aparecimento de doenças, através do comprometimento do sistema imune.

Quando avaliamos comparativamente o comportamento fagocítico dos granulócitos de doadores com e sem doença de Alzheimer estimulados com adrenalina nas concentrações de $1,7 \times 10^{-9}$ e $1,7 \times 10^{-8}M$, observamos que ambos os grupos, tiveram uma capacidade fagocítica semelhante (Figura 10). A tabela 6 mostra estas observações quantificadas e estas confirmam os resultados descritos na figura 10 onde não observamos diferenças estatísticas entre granulócitos de portadores ou não de Alzheimer, $p > 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney. Entretanto, verificamos que as duas concentrações ($1,7 \times 10^{-9}$ e $1,7 \times 10^{-8}M$) foram efetivas em aumentar a capacidade fagocítica em relação ao controle, $p < 0,05$.

Esses resultados relativos ao processo fagocítico observados através da microscopia óptica, revelaram que entre o grupo de 60-89 anos com e sem DA, existem semelhanças entre eles, tanto em ausência quanto em presença de adrenalina nas duas concentrações testadas. Estas observações demonstraram que as alterações observadas em relação à habilidade fagocítica podem ser conseqüentes do processo de envelhecimento e não da doença de Alzheimer.

Prosseguindo a nossa avaliação, sabe-se que a vida aeróbica depende da combustão controlada de energia e esta é controlada, catalisada e regulada por uma maquinaria metabólica que pode ser danificada por reações oxidativas incontroláveis associadas com a

produção de energia. Devido à extrema ameaça desta oxidação, seres aeróbios desenvolveram um sistema antioxidante complexo para controlar essas reações e reparar ou substituir a maquinaria afetada (JONES, 2006).

Neste contexto, quando analisamos a capacidade redutora celular nas três faixas etárias em estudo na presença do processo fagocítico, verificamos que todas foram eficazes em aumentar significativamente ($p < 0,05$) a capacidade antioxidante celular (Figura 11).

Entretanto, sabe-se que durante o processo de envelhecimento ocorrem alterações na capacidade que o organismo tem de neutralizar espécies reativas de oxigênio geradas durante o processo fagocítico, podendo gerar um estresse oxidativo que se refere a um perigoso desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a defesa antioxidante (HALLIWELL, 2007).

Assim, diante do exposto acima outro ponto relevante a ser observado é a influência do processo fagocítico sobre a maquinaria antioxidante dos granulócitos durante o processo de envelhecimento. Sabe-se que um declínio da função celular associado ao envelhecimento tem sido em decorrência de alterações em vias metabólicas, acompanhadas por um acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Mais de 50 anos atrás, Harman propôs a sua teoria de radicais livres, onde postulou que o acúmulo gradual de danos causados por macromoléculas celulares durante o envelhecimento pode ser devido a efeitos deletérios, de radicais livres, produzidos pelo metabolismo aeróbico.

A mitocôndria exerce uma função especial na produção de ATP celular, e espécies reativas de oxigênio. Dessa forma essa organela torna-se um dos principais alvos, que sofre maior influência de efeitos deletérios. Nesse contexto, ela tem sido apontada como elemento chave no processo de envelhecimento, onde essa teoria foi posteriormente renomeada, como teoria mitocondrial do envelhecimento. Está claro que existe um declínio na integridade da mitocôndria com a idade e concomitantemente a isso o aparecimento de doenças a ela relacionadas (RAFAELLO, *et. al.*, 2010).

Nesse contexto diversos estudos em relação ao poder redutor celulares em diferentes células durante o envelhecimento têm sido realizados. Um estudo linear do estado redutor realizado no plasma coletado de indivíduos com 19-85 anos de idade revelou que existe uma diminuição do mesmo a partir dos 45 anos de idade (JONES, *et.al.*, 2002). Em mitocôndrias de células renais foi observado que existe uma diminuição de NADPH durante o

envelhecimento (YARIAN, *et.al.*,2006). A geração de energia mitocondrial é comprometida com o envelhecimento e isso resulta uma alteração no nível da NADPH (YAP,*et.al.*,2009). Estudos realizados em nosso laboratório com granulócitos com e sem estímulo fagocítico apontaram para uma redução significativa do poder redutor celular a partir da faixa etária de 50-59 anos de idade (CHAVES,*et.al.*, 1998).

Por um longo período, acreditou-se que os granulócitos por terem habilidade de fagocitar em condições anaeróbias, não teriam uma dependência de uma grande atividade mitocondrial. Porém essa idéia mudou durante o tempo levantando estudos que demonstraram a importância do perfeito funcionamento das mitocôndrias, na ativação dos neutrófilos durante a infecção e inflamação, participando do processo de eliminação de agentes patogênicos, que levam uma resposta inflamatória (FOSSATI, *et.al.*,2003).

Em nosso trabalho observamos que com o avanço da idade, existe um comprometimento do sistema redutor de células do sistema imune, pois quando avaliamos o efeito redutor em granulócitos simulando a fagocitose, estimulando-os com partículas de zimozan opsonizados com (ZC3b) em todas as faixas etárias, observamos que houve aumento da capacidade redutora celular, gerada pelo processo fagocítico $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney (figura 11). Porém, quando avaliamos esses grupos durante o processo de envelhecimento ocorreu uma diminuição da capacidade redutora de granulócitos em seu estado basal, onde encontramos uma fagocitose de 93% (20-39 anos); 57% (40-59 anos) e 32% (60-80 anos). Esta redução foi significativa $p < 0,05$ quando comparamos todas as faixas etárias entre si, pelo teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis (tabela 7). Estes resultados evidenciaram uma mudança no padrão de reatividade celular em relação ao poder redutor com o avanço da idade (tabela 7).

Alguns modelos animais têm demonstrado que durante o envelhecimento a defesa antioxidante é interrompida, por doenças relacionadas ao envelhecimento, levando a danos aos lipídios, proteínas, e DNA. O DNA mitocondrial é altamente vulnerável a mudanças oxidativas, por causa da sua proximidade com a cadeia transportadora de elétrons. Mutações no DNA mitocondrial reduzem a efetividade da transferência de elétrons provocando aumento de espécies reativas de oxigênio e dano no DNA mitocondrial, levando a um ciclo vicioso, gerando um aumento exponencial, do dano oxidativo e disfunção mitocondrial (BUTTERFIELD, *et.al.*, 2009, MANCUSO, *et. al.*,2008)

Alterações morfológicas e morfométricas na mitocôndria parecem ser fatores evidentes durante o avanço da idade e de algumas doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer (DA)(KNOTT, *et. al.*, 2008) Um grande número de hipóteses tem tentado explicar a patogênese dessa patologia:citotoxicidade, inflamação, estresse oxidativo (SULTANA, *et.al.*,2010). Alguns relatos apontam para mudanças na função mitocondrial causando um aumento do estresse oxidativo e alteração do estado redutor celular que são componentes do envelhecimento e doenças a ele relacionadas (BUTTERFIELD, *et. al.*,1999).

A doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência no mundo e sua marca patológica principal é o acúmulo de peptídeo A- β e emaranhados neurofibrilares, e consequente perda progressiva da cognição evoluindo para um quadro de demência(MACCIONE, *et.al.*, 2009). Porém evidências demonstraram a existência de outros distúrbios metabólicos alterando a função celular. Muitos componentes da mitocôndria são alterados como os da cadeia respiratória e canais ânion voltagem dependentes, contribuindo para estresse oxidativo (FERRER, *et.al.*, 2009).

Altos níveis de oxidação no DNA mitocondrial promovem anormalidade mitocondrial na DA, levando ao aumento de superóxido culminando com estresse oxidativo (SULTANA, *et.al.*,2010). O peptídeo A- β gera um ciclo no qual ocorre aumento na produção de espécies reativas de oxigênio que afetam DNA mitocondrial e proteínas, levando a alterações na cadeia transportadora de elétrons, gerando um declínio na produção de energia mitocondrial (OTHA, *et.al.*,2006, BUTTERFIELD, *et.al.*,2007). Estudos demonstraram que existe uma série de mudanças morfológicas e morfométricas na mitocôndria, alterações na crista mitocondrial diminuição de tamanho em comparação a grupos controles (BALOYANNIS, *et.al.*,2006).

O número e o tamanho mitocondrial influenciam na dinâmica dessa organela na qual se funde e se divide em um movimento coordenado que está comprometido na DA sendo outro fator gerador de estresse oxidativo (WANG,*et.al.*,2009).

O nível de estresse oxidativo também interfere na atividade inflamatória. Um estudo realizado com neutrófilos circulantes de doadores com DA revelou que podem existir alterações mitocondriais dessas células (VITTE,*et.al.*,2004).

Diante dessas evidências em relação a alterações na mitocôndria nessa doença, seguimos nossos estudos em relação ao efeito redutor celular de granulócitos, comparando os grupos com e sem a doença de Alzheimer na mesma faixa etária, 60-89 anos. Nossos

resultados mostraram um aumento significativo $p < 0,05$ da capacidade redutora celular em granulócitos com DA em relação ao grupo sem DA (figura 12). Estes resultados nos parecem contraditórios, pois esperaríamos uma diminuição desta capacidade redutora pelo vasto comprometimento mitocondrial existente nesta patologia. Entretanto, uma explicação plausível seria que como estamos estudando esta capacidade redutora em granulócitos, verificamos que nesta população celular a maior capacidade redutora encontra-se no citoplasma e não na mitocôndria, podendo assim, explicar esta maior capacidade redutora celular.

Recentemente a NADPH oxi-redutase (NOX) tem sido associado às doenças neurodegenerativas (BLOCK, *et. al.*, 2008). Ela está ativa no cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer (SHIMOHAMA, *et.al.*, 2000). A atividade de (NOX) bem como suas subunidades regulatórias (p47phox) e catalíticas (gp91) foram avaliadas no giro frontal e cerebelo de doadores portadores ou não de DA, e uma análise imuno-histoquímica demonstrou uma alta expressão pela micróglia do nível de (gp91phox) demonstrando que esse aumento na NOX pode participar na patogênese da doença de Alzheimer (BRUCE-KELLER, *et.al.*, 2010).

Após estas observações, o nosso próximo passo foi verificar se existe uma possível regulação neuroimunoendócrina no processo redutor de granulócitos avaliando o comportamento destes frente ao estímulo com adrenalina.

Nossos resultados mostraram que granulócitos estimulados com adrenalina 10^{-9} M mais Zimosan C3b, nas diferentes faixas etárias, apresentaram um aumento do poder redutor celular significativo $p < 0,05$ quando comparados com o controle, pelo teste de Mann-Whitney (figura 13). Estes resultados demonstraram que em todas as faixas etárias estudadas existe uma regulação neuroimunoendócrina evidenciada pela estimulação com a adrenalina.

Após evidenciar a existência desta regulação o nosso próximo passo foi o de verificar se esta, estaria nos mesmos patamares durante o processo de envelhecimento. A figura 14 mostrou que durante o processo de envelhecimento ocorreu uma diminuição do poder redutor celular quando granulócitos foram incubados com adrenalina na concentração de 10^{-9} M que foi significativo $p < 0,05$ pelo teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis. Estes resultados encontrados nessa concentração apontaram para um possível comprometimento entre a via de sinalização da adrenalina no efeito redutor celular durante o processo de envelhecimento.

Assim, ao observarmos a existência de um comprometimento da via de sinalização da adrenalina no idoso seguimos nossas observações em relação à doença de Alzheimer (DA). Neste sentido sabemos que existem algumas alterações anatômicas, metabólicas ou em nível de receptores, que levam a um comprometimento da liberação desse hormônio nessa doença.

Com relação a alterações anatômicas, alguns estudos comparam a diminuição de memória e alterações emocionais relacionados ao dano amigdalar na DA, que é uma estrutura geradora de impulso ao hipotálamo para ativação do SNS gerando uma resposta reflexa na qual o núcleo locus ceruleus libera alguns hormônios entre eles adrenalina (TALAROVICOVA, *et.al.*, 2007). Perda da função locus ceruleus são manifestações evidentes em doenças neurodegenerativas como DA (KALININ, *et.al.*, 2007).

Com relação a comprometimentos metabólicos que comprometem a liberação da adrenalina um dos mais evidentes na DA é a hiperhomocisteinemia que é uma alteração metabólica comum na doença de Alzheimer podendo levar a uma inibição das metiltransferases em especial a feniletanolamina N-metiltransferase (PNMT) que cataboliza adrenalina (KENNEDY, *et al.*, 2004). Elevados níveis de homocisteína são uns dos fatores que contribuem para doenças neurodegenerativa e neuroinflamatórias (TYAGI, *et.al.*, 2009). O estresse oxidativo produz uma elevação da homocisteína induzindo uma resposta inflamatória além de aumento da NADPH oxidase (EDIRIMANNE, *et.al.*, 2007).

Algumas alterações em relação a receptores adrenérgicos também são observadas nessa doença, ativação de alguns desses receptores influenciam na formação da placa - amilóide (NI, *et.al.*, 2006, NN, *et.al.*, 2010). No que se referem ao efeito da adrenalina em relação ao sistema imune inato poucos são os relatos da literatura. Nesse contexto buscamos avaliar o efeito da adrenalina em granulócitos estimulados com ZC3b em doadores com e sem DA.

Nossos resultados mostraram que quando granulócitos de doadores com doença de Alzheimer são incubados com adrenalina 10^{-9} M ocorreu um aumento significativo $p < 0,05$, da capacidade redutora celular quando estes foram estimulados com partículas de zimozan opsonizadas com C3b (ZC3b) (figura 15).

Quando avaliamos comparativamente granulócitos de doadores com e sem DA na mesma faixa etária, a saber, 60-89 anos, verificamos um aumento do poder redutor celular

tanto em ausência como em presença de ZC3b em granulócitos de doadores com DA em relação aos não portadores (figura 15).

Estes resultados demonstraram uma possível regulação diferenciada da capacidade redutora de granulócitos com DA que não é dependente da idade e sim de mecanismos imunomoduladores relacionados à patologia.

Ao avaliarmos granulócitos estimulados com adrenalina na concentração de 10^{-8} M nas três faixas etárias em estudo verificamos que ocorreu um aumento significativo $p < 0,05$ da capacidade redutora celular (figura 16). Verificamos também, que quando comparamos a figura 13 e a figura 16 observamos uma exacerbação da capacidade redutora celular da concentração de 10^{-8} M em relação à de 10^{-9} M em todas as faixas etárias estudadas. Estes resultados confirmam a influência da adrenalina na capacidade redutora celular e que esta capacidade se mostrou dose dependente.

Como demonstrado anteriormente no que tange ao efeito da adrenalina na capacidade redutora celular durante o processo de envelhecimento através da dose de 10^{-9} M de adrenalina, verificamos que também a dose de 10^{-8} M não altera o padrão encontrado com a dose de 10^{-9} M que foi o de diminuir a capacidade redutora celular durante o processo de envelhecimento (figuras 14 e 17). Estes dados reafirmam que durante o processo de envelhecimento pode ocorrer uma mudança no padrão de sinalização da adrenalina afetando diretamente os padrões antioxidantes celulares podendo assim alterar a dinâmica do sistema imunológico e nervoso.

Continuando a nossa análise, comparamos o efeito da adrenalina na concentração de 10^{-9} M em granulócitos de doadores com e sem a doença de Alzheimer. Os nossos resultados mostraram mais uma vez que granulócitos de doadores com DA apresentam maior capacidade redutora celular tanto em ausência como em presença de ZC3b estimuladas com adrenalina (figura 17).

A literatura relata que NADPH oxidase (NOX) e o estresse oxidativo são agentes neurotóxicos que estimulam a cascata inflamatória, eles tem sido importantes mediadores do envelhecimento. Essa doença é caracterizada por acúmulo de $A\beta$ que induzem uma resposta inflamatória em nível cerebral. A $A\beta$ é um fator ativador de superóxido do que conseqüentemente ativa NADPH oxidase (BIANCA, *et.al.*, 1999). Existem fortes evidências demonstrando que o peptídeo $A\beta$ funciona com forte agente antimicrobica (MAC-

NAULL, *et.al.*, 2010) e que a atividade de NADPH oxidase é aumentada por peptídeo β A (BRUCE-KELEEN, *et.al.*, 2010) sendo que sua atividade também está aumentada em cultura de neurônios e em microglia (BIANCA, *et.al.*,1999). Talvez isso possa ser também um dos fatores que contribuam para a grande expressão da NADPHoxidase.

O estresse oxidativo é condição na qual existe um desequilíbrio entre componentes oxidantes e redutores. É um dos fatores que contribuem para alterações imunológicas, durante o processo de envelhecimento, e doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (DA)(SULTANA, *et.al.*, 2010, DE LA FUENTE, *et.al.*, 2010)

Até aqui, o nosso estudo avaliou o comportamento do efeito redutor celular, durante o processo de envelhecimento e na DA, bem como, o comprometimento da atividade adrenérgica e processo fagocítico, sobre esse efeito metabólico celular. Porém, ainda ficou uma lacuna em relação ao comportamento oxidante, esse conhecimento se faz necessário, pois em estudos realizados em nosso laboratório foi demonstrado que existe uma correlação inversa entre poder oxidante e redutor em granulócitos de doadores sadios a partir de 40 anos de idade, podendo sugerir um desequilíbrio metabólico nessa faixa etária (CHAVES, *et.al.*,1998).

Neste contexto a avaliação destas duas respostas são parâmetros importantes para entendimento do balanço oxidante/redutor durante o envelhecimento. Em nosso estudo, seguimos avaliando a produção de NO por granulócitos, pela importância do seu caráter oxidante e também neuroprotetor, durante o processo de envelhecimento e sua correlação com doença de Alzheimer.

O óxido nítrico é uma molécula que atua na modulação de respostas imunes, vasodilatação, neurotransmissão, proliferação e apoptose. Ele é sintetizado por uma classe de NO sintase (NOS) por conversão de L-Arginina a L-Citrulina, a qual necessita de dois cofatores, oxigênio e fosfato dinucleotideo adenina nicotinamida (NADPH). A síntese de NO, pode ser inibida por uma variedade de análogos da arginina os quais competem com L-arginina e agem como inibidor estéreo específico da NOS (LIU, *et.al.*,2003).

A principal ação do NO é estimular a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) aumentando a concentração de (GMPc). O aumento de (GMPc) ativa as proteínas quinases dependentes de (GMPc) as quais catalisam a fosforilação das proteínas. Foi demonstrado que existe uma alteração funcional metabólica no balanço entre GMPc, AMPc, e espécies reativas

de oxigênio em neutrófilos humanos a partir de 50 anos de idade (HORTA, *et.al.*, 2005). A via NMDA (Nmetil D aspartato)/NOS/ GMPc/ foi estudada através de hipocampo de ratos e foi observado que o fluxo de GMPc diminui 55% durante o processo de envelhecimento (VALLEBUONA, *et.al.*, 1995).

Existem três classificações da óxido nítrico sintase (NOS): a forma constitutiva, onde apresenta duas isoformas, neuronal (NOSn) e endotelial (NOSe), que são encontradas em diferentes células e tecidos, e são dependente de Ca^{+} . A forma indutiva (NOi) é, induzida por citocinas inflamatórias e são independentes de Ca^{+} . Essas duas formas são do tipo citosólicas e um terceiro subtipo é classificada de acordo com a sua localização subcelular (NOSmt) mitocondrial (FORSTERMANN, *et.al.*, 1994, NAVARRO, *et.al.*, 2008).

Uma concentração nanomolar de NOSmt ligado ao centro binuclear do citocromo oxidase em competição com oxigênio, promove uma rápida despolarização do potencial de membrana mitocondrial com uma consequente diminuição do fluxo de elétrons e extravasamento de prótons. Ao inibir o fluxo de elétrons no citocromo oxidase na cadeia transportadora de elétrons existe um comprometimento do estado redutor celular (INOUE, *et.al.*, 1999). Este também pode comprometer a dinâmica mitocondrial no processo de fusão e difusão, além de participar do processo de fragmentação mitocondrial (FERRER, *et.al.*, 2009)

Os efeitos do NO na mitocôndria podem ser através do NO gerado no citosol se difundindo na mitocôndria ou pela atividade do (NOSmt). O nível de NOSmt diminui com o envelhecimento especialmente no cérebro e tem sido apontado como biomarcador do envelhecimento, isso talvez seja devido as alterações mitocondriais observadas nessa fase (YAP, *et.al.*, 2009). A integração entre esses tipos de NOS, bem como, a efetividade de cada uma dessas moléculas tem sido documentadas (NAVARRO, *et.al.*, 2008).

O NO gerado pelos neutrófilos está envolvido na função antimicrobial. Ele foi identificado como modulador de diversas cascatas de sinalização que regulam várias funções como adesão, quimiotaxia, fagocitose, explosão respiratória apoptose e fator de eliminação de patógenos, além de modular a geração de radicais livres (KOBAYASHI, *et.al.*, 2009). Estudos a respeito de características de isoformas de NOS presentes em neutrofilos são limitados, sendo os primeiros estudos sobre este tema sido realizados através de outros tipos de células. Porém um recente estudo relata a presença das três isoformas em neutrófilos em sangue periférico de ratos onde demonstrou que e sua concentração depende do estágio de maturação ao qual se encontram. O (NOSn) está estável durante todo processo de maturação, (NOSe)

apresenta-se em maior quantidade em células imaturas, e o (NOSi) aumenta durante o processo de maturação celular (KUMMAR, *et.al.*, 2010, SAINE, *et.al.*, 2006).

Evidências sugerem o potencial envolvimento do NO/NOS durante o processo de envelhecimento (LIU, *et.al.*, 2003).

Baseados nestes relatos o nosso próximo passo foi o de verificar primeiramente se granulócitos das três faixas etárias em estudo seriam capazes de produzir do óxido nítrico. Nossos resultados mostram que ocorreu uma produção significativa $p < 0,05$ de NO em todas as faixas etárias em estudo: 20-39, 40-59 e 60-89 anos em ausência ou presença de zimosan opsonizado por C3b (figura 19). Estes resultados confirmaram aos encontrados na literatura onde verificamos a presença das isoformas constitutivas (avaliação basal) de induzidas (avaliação fagocítica) de NO sintase nos granulócitos.

Granulócitos humanos apresentam alterações metabólicas ocorrendo comprometimento do sistema imune, a partir dos 40 anos de idade e que estas encontra-se exponencialmente reduzidos na faixa etária 60 anos de idade (CHAVES, *et.al.*, 2005). Chaves *et. al.*, (2000) demonstraram ainda uma diferente produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio durante o processo de envelhecimento, demonstrando que as mudanças iniciavam a partir de 40 anos para a produção de (ROS) e a partir de 50 anos para a produção de (RNS). Em 2002, Chaves *et. al.*, demonstraram que a produção de radicais livres por granulócitos era diferenciada a partir dos 50 anos. Nesse contexto, avaliamos a produção de NO em granulócitos durante o processo de envelhecimento (tabela 8). Em ausência de estímulo verificamos que a produção de NO foi reduzindo significativamente, $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Withney, a partir de 40 anos de idade.

Como esse estudo, foi realizado em ausência de estímulo fagocítico, podemos inferir que possivelmente pode haver uma perda da capacidade de produção de NO constitutivo com a evolução da idade (tabela 8).

Alteração na produção de NO leva a ativação da NOSi levando a uma resposta pró-inflamatória que pode ser uma dos fatores que contribuem para envelhecimento e doenças neurodegenerativas (NAVARRO, *et.al.*, 2008).

Parece que durante o envelhecimento e a neurodegeneração ocorrem alterações em nível das isoformas de NO sintase. Existe uma diferença na expressão de NO no estado de ativação e distribuição celular e extra celular de isoenzimas de NO sintase, que determinam a

concentração e a duração da produção de NO (BOYD,*et.al.*,2002). A expressão de (NOSi) está aumentada durante a maturação neutrofílica durante esse estágio diferentes grânulos são sintetizados isso pode sugerir que o (NOSi) é continuamente sintetizado em grânulos azurófilos bem como gelatinosos. A grande produção de (NOSi) produz uma grande quantidade de NO que pode ser uma importante armadura contra agentes invasores durante a fagocitose, isso foi demonstrado quando neutrófilos foram estimulados com citocinas (KUMMAR, *et.al.*, 2010).

Neste contexto, os nossos resultados mostraram que durante o processo de envelhecimento ocorreu uma redução significativa $p < 0,05$, da produção de óxido nítrico quando granulócitos foram estimulados com ZC3b (tabela 8). Estes resultados demonstraram um possível comprometimento nas vias metabólicas que conduzem para a expressão da isoforma indutiva já que as mesmas somente são estimuladas quando células são ativadas durante o processo inflamatório. Estes resultados também sugerem que esta diminuição da produção de óxido nítrico durante o processo de envelhecimento poderia estar relacionada com a perda gradual da defesa imunológica inespecífica em indivíduos idosos.

Quando os neutrófilos são ativados, o óxido nítrico é produzido para que o agente patogênico possa ser destruído, podendo também provocar lesões em tecidos normais (ABBAS, *et.al.*, 2008).

Do ponto de vista biológico o NO tem um efeito duplo, dependendo de suas concentrações. Fisiologicamente ele funciona como mensageiro intra e intercelulares, por outro lado ele tem função citotóxica em alguns fenômenos patológicos e fisiopatológicos. Com relação ao envelhecimento algumas correntes incluem situações de hipo ou hiperprodução de NO (NAVARRO, *et.al.*, 2008).

Uma excessiva produção de NO, como consequência da neuroinflamação no cérebro, tem sido relacionada com o processo de envelhecimento bem como a doença de Alzheimer. Durante o envelhecimento e a neurodegeneração, alterações em nível de isoformas de NOS sugerem uma regulação fisiológica do funcionamento mitocondrial provocando um baixo nível fisiopatológico de NO (YAP, *et.al.*,2009).

Neste contexto, avaliamos comparativamente a produção de NO de granulócitos na faixa etária de 60-89 anos, de doadores com e sem a doença de Alzheimer (tabela 9). O nosso intuito nesta comparação foi o de verificar se a produção de NO por granulócitos de

portadores da doença de Alzheimer teriam uma produção diferenciada deste mediador em relação aos granulócitos da mesma faixa etária (idosos). Nossos resultados mostraram que a produção de NO tanto em ausência quanto em presença do estímulo fagocítico é significativamente menor do que doadores da mesma faixa etária sem DA ($p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney), o que nos leva a crer que talvez, possa existir um comprometimento da NO sintase constitutiva e indutiva, diminuindo a resposta imune nessa patologia (tabela 9).

Nessa patologia poucos são os relatos com relação à produção de NO em neutrófilos, porém podemos analisar esse comprometimento apresentando correlações que podem ser feitas com relação a doença de Alzheimer (DA), que também se identificam com alterações relacionadas ao NO. NO é um importante mensageiro molecular no cérebro e tem uma função importante no processo de aprendizado e memória e funciona também como agente neuro protetor (CALLABRESE, *et.al.*, 2007, THATCHER, *et.al.*, 2006).

Uma possível via que comprova o envolvimento do NO na DA foi proposta. Quando o NO é produzido a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase ela ativa (GMPc) que ativa a enzima solúvel guanilil ciclase (GCc) que por sua vez ativa proteína quinase (GKcs) levando a uma fosforilação de CREB, que interfere na via NO/GMPc/GKc/CREB diminuindo a produção de NO, alguns estudos revelaram que essa diminuição interfere na produção CREB a qual está envolvida no mecanismo de memória e aprendizado, funções essas que estão comprometidas na DA (PUZZO, *et.al.*, 2005). O NO estimula a produção de β -amilóide resultando em uma disfunção mitocondrial que contribui para dano sináptico (FERRER, *et.al.*, 2009).

Assim, os nossos resultados sobre as alterações no sistema imune e as alterações observadas na literatura em relação à produção de NO alterando funções do SNC, podem demonstrar a integração entre esses sistemas e o envolvimento do NO na doença de Alzheimer.

Sabe-se que o NO tem poder de influenciar na secreção de transmissores sinápticos como as catecolaminas. Ele é uma importante molécula sinalizadora que regula o eixo HPA. Os receptores adrenérgicos são envolvidos na modulação de L-arginina (YAN, *et.al.*, 2010). Assim, o nosso próximo passo foi verificar se como a adrenalina poderia interferir na produção de NO. Os nossos resultados mostraram uma produção significativa $p < 0,05$ de NO nas faixas etárias de 20-39 e 40-59 anos durante o processo fagocítico. Entretanto, granulócitos

de doadores na faixa etária de 60-89 anos não apresentaram uma produção significativa $p > 0,05$ de NO quando estimulados com ZC3b (tabela 10).

Além disso, verificamos também, uma produção decrescente ($p < 0,05$) de NO quando comparamos com a produção nas faixas etárias de 20-39 e 40-59 anos (tabela 10). Estes resultados confirmaram que existe uma relação entre NO e alterações no eixo HPA e adrenalina.

Não encontramos diferenças significativas $p > 0,05$, pelo teste de Mann-Whitney, entre as faixas etárias de 20-39 e 40-59 anos quando os granulócitos foram incubados com adrenalina ($1,7 \times 10^{-9} \text{M}$), demonstrando que até nesta faixa etária os granulócitos ainda reagem ao estímulo adrenérgico, em relação a produção de NO. Diferentemente da faixa etária de 60-89 anos que reduz esta capacidade em ausência ou presença de partículas de ZC3b. Estes resultados podem contribuir para explicar a alta vulnerabilidade nessa faixa etária o aparecimento de doenças por comprometimento imune como já havíamos discutido anteriormente, pois existe uma queda na produção NO, comprometendo a habilidade de eliminação de agentes agressores, bem como diminuição de um agente considerado neuroprotetor (tabela 10).

Quando comparamos doadores 60-89 anos com e sem a doença de Alzheimer, não observamos diferenças significativas $p > 0,05$ entre os grupos tanto durante o processo fagocítico quanto só estimulados por adrenalina na concentração de $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$, pelo teste de Mann-Whitney (tabela 11). Assim, verificamos que a produção de adrenalina na doença de Alzheimer é influenciada pelo processo de envelhecimento e não apresenta um comprometimento específico determinado pelas alterações metabólicas advindas da patologia (tabela 11).

Ao analisarmos os resultados da figura 20 e tabela 12, que nos mostram os resultados das análises da produção de NO em ausência ou presença de adrenalina na concentração de $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$, observamos o mesmo perfil dos resultados encontrados quando comparamos com a concentração de $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$ (tabelas 10). O que podemos observar de diferente foi que a concentração de $1,7 \times 10^{-8} \text{M}$ foi capaz de exacerbar as diferenças observadas com a dose de $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$ na faixa etária de 20-59 anos. Também observamos que esta concentração não foi capaz de reverter o padrão reduzido de produção de NO observado com o estímulo de adrenalina $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$ em ausência ou presença do processo fagocítico (figura 20). Estes

resultados são mais uma evidência da possível perda da função imunoneuroprotetora do NO durante o processo de envelhecimento.

No que tange a comparação da produção de NO por granulócitos de doadores sem e com a doença de Alzheimer verificamos que não existe diferença significativa $p > 0,05$ quando estes são estimulados com adrenalina $1,7 \times 10^{-8} M$ em ausência ou presença de ZC3b (tabela 13). Mais uma vez verificamos que as alterações observadas no metabolismo da doença de Alzheimer não influenciam o padrão observado durante o processo de envelhecimento. Assim, podemos inferir que os doadores com a doença de Alzheimer também apresentam uma possível perda da função imunoneuroprotetora do NO podendo levar ao aumento de danos oxidativos podendo a nosso ver, ser mais danoso para esta população, por estes apresentarem um estresse oxidativo metabólico exacerbado.

Assim, os nossos resultados corroboram para elucidar mais alguns caminhos metabólicos importantes que fazem parte desta intrincada regulação neuroimunoendócrina, pois sabe-se que o processo de envelhecimento envolve numerosas reações bioquímicas com alterações moleculares em cada célula como bem em todo o organismo.

O envelhecimento reflete o somatório de todas as mudanças que ocorrem no homem durante a vida podendo levar a um estado patológico. A associação da idade com a diminuição da função do sistema imune aumenta a suscetibilidade a doenças infecciosas, câncer e doenças degenerativas. Em todos estes contextos, o nosso trabalho levantou uma série de questionamentos nos quais demonstraram que há necessidade de um estudo mais aprofundado, nos mecanismos moleculares que estão envolvidos nos sistemas neuroimunoendócrino, principalmente no que se refere à via adrenérgica, pois a mesma demonstrou ser importante em manter a homeostase entre esses sistemas que é um fator fundamental para a potencialização do sistema imune, fator esse de suma importância para um envelhecimento saudável.

Outro valor que podemos agregar ao nosso estudo é que o conhecimento dessas vias, bem como o processo de fagocitose pelos granulócitos, se estende a um maior conhecimento do metabolismo da doença de Alzheimer, bem como, podendo funcionar para desencadear mais conhecimento sobre esta patologia e também como um agente agregador de parâmetros diferenciais para diagnóstico, conhecimento esse tão almejado atualmente pelos profissionais da área de saúde.

CONCLUSÃO

Concluímos que durante o processo de envelhecimento, ocorre uma diminuição da fagocitose, capacidade antioxidante e imunoprotetora. Na comparação da DA em relação a doadores da mesma faixa etária, esse grupo de doadores apresentaram um maior efeito redutor celular e diminuição da produção de NO e uma fagocitose semelhante. O desafio com adrenalina demonstrou que apresenta influência no circuito neuroimunoendócrino durante o envelhecimento e que pode ser um fator preponderante para o aparecimento de patologias como DA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564 p.
- AGUILERA, G. HPA axis responsiveness to stress implication for health aging. *Exp Gerontology*, v.46, p 90-95, Mar, 2010.
- ALBERT, S.M.; COSTA, R. Hospitalization and Alzheimer's disease: results from a community-based study. **Journal Gerontology a biological Sciences and Medical Sciences**, v.54, p 267-71, 1999.
- ALVES, G.J.; JOÃO, P. Neuroimunomodulação: sobre o diálogo entre o sistema nervoso e imune. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.29, n.4, Dez, 2007.
- American Psychiatric Association (APA). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV)*. Fourth ed. Washington (DC): American Psychiatric Association, p.143-7, 1994.
- ANSAR, M.M.; ANSARI, M. Nitric oxide involvement in pancreatic beta cell apoptosis by glibenclamide. **Nitric Oxide**, v.14 ,n.1, p.39-44, 2006.
- AVAGYAN, H.; GOLDENSON, B.; TSE, E.; MASOUMI, A.; PORTER, V.; et.al. Immune blood biomarkers of Alzheimer's disease patients. **Journal Neuroimmunology**, v.210, p 67-72, 2009.
- BABIOR, B.M. NADPH oxidase. **Current Opinion in Immunology**, v.16, p 42-47, 2004.
- BALOYANNIS, S.J. Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. **Journal Alzheimer Disease**, v.9, n.2, p119-26, 2006.
- BARSOUM, M.J.; YUAN, H.; GERENCSEK, A.; et.al. Nitric oxide induced mitochondrial fission is regulated by dynamim-related GTPases in neurons. **EMBO**, v.25, p 3900-11, 2006.
- BECKMAN, K.B; AMES, B.N. The free radical theory of aging matures. **Physiological Reviews**, v 78, n.2, p547-81, 1998.
- BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. *Bioquímica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1114 p.
- BERGMAN, M.; SAUTNER, T. Immunomodulatory effects of vasoactive catecholamines. **Wien Klin Wochenschr**, v.114, n.17-18, p 752-61, 2002.
- BERTOLUCCI, P.H.F.; OKAMOTO, I.H.; NETO, T. Desempenho da população brasileira na bateria neuropsicológica do Consortium to establish a registry for Alzheimer's diseased (CERAD). *Revista de psiquiatria clinica* ,v.25, p80-3, 1998.

BERTOLUCCI, P.H.F.; OKAMOTO, I.H.; BRUCKI, S.M.D.; *et.al.* Applicability of CERAD neurophysiological battery to brasilian elderly. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, v.59, p.532-36, sep, 2001.

BICALHO, H.M.S.; GONTIJO, M.C.; NOGUEIRA-MACHADO, J.A. A simple technique for simultaneous human leokocytes separation. **Journal of Immunology**, v.40, p115-116,1981.

BIANCA, V.D.; DUSI, S.; BIANCHINI, E. Beta- amyloide activates the o-2 forming NADPHoxidase in microglia, monocytes,neutrophils. A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in Alzheimer's disease.**Journal Biology Chemical.**, v.274, p.15493-99, 1999.

BISHOP, N.; LU, T.;YANKNER, B.A. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. **Nature**, v.454, p 529-535,2010.

BLOCK, M. NADPH oxidase as a therapeutic in Alzheimer's disease. **BMC Neuroscience**,v.9, n.2, p 1-8, 2008.

BOYD,C.S.; CADENAS, E. Nitric oxide and cell signalling pathways in mitochondrial dependents apoptosis. **Biological Chemistry**,v.383, p.411-23, 2002.

BUÉ E.;BUSSIE`RE, T.;BUÉ E, V.;DELACOURTE, P.Tauprotein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative, v.33,p 95-130,2000.

BURKE, W.J.; GALVIM, N.J. Degenerative changes in ephinephine tonic vasomotor neurons in Alzheimer's disease.**Brain Research**, v.661,n.(1-2), p.35-42, 1994.

BURKE, W.J.; CHUNG, H.D. .Evidence for decreased transport of PNMT protein in advanced Alzheimer's disease. **Journal American Geriatrics Society**, v.38, n.12, p.1275-82, 1990.

BUTCHER, S.K.; CHAHAL, H.; NAYAK, L.; SINCHAIR, A. Senescense in innate immune response:reduced neutrophil phagocytic capacity and CD 16 expression inelderly humans.**Journal of Leokocytes Biology**, v.70, p 881-886, 2001.

BUTTERFIELD, D.A.; REED, T.; NEWMAN, S.F.; SULTANA, R.. Roles of amyloid β -peptide-associated oxidative stress and brain protein modification in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment.**Free radical biology & medicine**, v. 43, p 658-677, 2007.

BRUCKI, S.M.D.; NITRINI, R.; CARAMELLI, P.; BERTOLUCCI, P.H.F.; OKAMOTO, I,H. Sugestões de uso do Mini-exame do estado mental no Brasil .Arquivo Neuropsiquiatria, v.61, p 777-81, sep, 2003.

BRUCE-KELLER,A.J.;WHITE, C.L.; GUPTA, S.; KNIGHT, A.G.; PISTELL, P.J.;INGRAN, D.K.; MORRISON, C.D.NOX activity in brain aging exacerbation by high fat diet. **Free Radicals Biology Medicine**, v.49, n.1, p 22-30, 2010.

CADENAS, A.Mitochondrial free radical production anda cell signaling .**MolecularAspect Med**, v.17, p.17-26, 2004.

CALABRESE, V.; MANCUSO, C.; CALVANI, M.; RIZZARELLI, E.; BUTTERFIELD, D.A.; STELLA, A.M.G. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. **Nature Review Neuroscience**, v.8, 2007..

CHAVES, M.M.; ROCHA-VIEIRA, E.; LIMA E SILVA, R.; REIS, A.P.; MACHADO-NOGUEIRA, J.A. Host defenses in aged :evaluation of the balance between oxidizing species generation and reducing power in phagocytosing human granulocytes. **Mechanisms of ageing an Development**, v.104, p.103-109, Aph,1998.

CHAVES, M.M.; ROCHA-VIEIRA, E.; REIS, A.P.; SILVA, R.L.;GERZSTEIN, N.C.; MACHADO-NOGUEIRA, J.A. Increase of reative oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species generated by phagocytosing granulocytes related to aged . **Mechanisms of Ageing an Development**, v.119, p.1-8,June , 2000.

CHRISTO, P.H.; WENISCH, BERNHAR, D.; PARSCHAK, A.; et.al. High-dose catecholamines treatment decreased polymorphonuclear leukocyte phagocytic capacity and reactive oxygen production. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**.p 423-428, 1996.

CIRCU, M.L.; AW, T.Y. Reactive oxygen species,cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radicals Biology & Medicine**, p 1-14, 2010.

COSTA, D.C. Adaptação metabólica em granulócitos humanos induzidas pelo processo de envelhecimento e diabetes Méllitus :papel das vias de sinalização c AMP/PKB,Akt/PKB ,p 38 MAPK e fosfoinositídeos. Belo Horizonte-MG,2006.f.179.tese (doutorado em bioquímica e imunologia) – Instituto de ciências biológicas,Universidade federal de Minas Gerais-UFGM.

CUMMINGS, S.R. The biology of aging.**Journal Muscule Skeletal Neuronal Interact**, v.7,n.4, p 340-1, 2007.

DE LA FUENTE, M.; GIMENEZ-LLORT, L. Models of aging of neuroimmunomodulation: strategies for its improvement. **Neuroimmunomodulation**, v.17, n.3, p.213-6, 2010.

DE LA FUENTE, M.; MIQUEL, J. Um update the oxidation-inflammation theory of aging:the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging, **Current Pharmacological Disease**, v.15, n.26, p.3003-26, 2009.

DE LA FUENTE, M.; HERMANS A.; VALLEJO ,M.C. The immune system in the oxidation stress condition of aging na hypertension .Favorable effects of antioxidants and physical exercise.**Antioxidant Redox Signal** , v.7, p. 1356-66, 2005.

DELL VALLE, L.G. Oxiative stress in aging:Theoretical outcomes and clinical evicences in humans. **Biomedicine&Pharmacology**, p.1-7, 2010.

DETMER, S.A.;CHAN, D.C.;Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.8, p.871-879, nov,2007.

ELENKOV,I.I.; WILDER,R.L.; CHROUSOS, G.P. The sympatetic nerve-An integrative interface between two supersystems:The brain and the immune system **.PharmacologicalReviews**, v.52, p.595-628, 2000.

EDIRIMANNE, V.E.; WOO, C.W.; SIOW, Y.L.; PIERCE, G.N.; XIE, J.Y. Homocysteine stimulates NADPH oxidase-mediated superoxide production leading to endothelial dysfunction in rats. **Canadian Journal Physiology Pharmacology**, v.85, n.12, p.1236-47, dec, 2007.

Estudos e pesquisas informação demográfica e sócio econômica. Projeção da população do Brasil por sexo e idade 1980-2050, Instituto brasileiro de geografia e estatística, Rio de Janeiro, v 28, 2008.

FERRER, I. Altered mitochondria, energy metabolism, voltage-dependent anion channel, and lipid rafts converge to exhaust neurons in Alzheimer's disease. **Journal Bioenerg Biomembr**, v 41, n.5, p.451-31, Oct, 2009.

FIALA, M.; ZHANG, L.; XIAOHU, G.; SHERRY, B.; TAUB, D.; GRAVES, C.M.; HAMA, S.; WAY, D.; WEINAND, M.; WITTE, M.; LORTON, D.; KUO, Y.; ROHER, A. E. Amyloid- β induces chemokine secretion and monocyte migration across a human blood-brain barrier model. **Molecular Medicine**, v.4, p.480-489, may, 1998.

FIALA, M.; LIU, P.T.; JEFREY-ESPINOSA, A.; ROSENTHAL, J.M.; BERNARD, G.; RINGMAN, J.M.; SAYRE, J.; ZHANG, L.; ZAGHI, J.; DEJBAKHS, S.; CHIANG, B.; HUI, J.; MAHANIAN, M.; BAGHAEE, A.; HONG, P.; CASHMAN, J. Innate immunity and transcription of MGAT III and toll-like receptors in Alzheimer's disease patients are improved by bisdemethoxycurcumin. **Pnas**, v.104, n.31, p.12849-12854, July 2007.

FORTIN, C.F.; MCDONALD, P.P.; LESUR, O.; FULOP, JR, T. Aging and Neutrophils: There is still much to do. **Rejuvenation Research**, v.11, n.5, p.873-882, 2008.

FORSTERMANN, U.; CLOSS, E.I.; POLLOCK, J.S.; NAKANE, P.S.; GATH, I.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase isoenzymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**, v.23, p 1121-31, 1994.

FOSSATI, G.; MOULDING, D.A.; SPILLER, D.G.; MOOTS, R.J.; WHITE, M.R.H.; EDWARDS, S.W. The mitochondrial network of human neutrophil: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis. **The Journal of Immunology**, v.170, p 1964-1972, 2003.

FOLSTEIN, M.F.; FOLSTEIN, S.E.; McHUGH, "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. **Journal Psychiatry Review**, v.12, p 189-198, 1975.

GIUNTA, B.; FERNADEZ, F.; NIKOLIC, W.V.; OBREGON, D.; RRAPO, E.; TOWN, T.; TAN, J. Inflammation as a prodrome to Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v.5, n.51, p 1-15, 2008.

GUZIK, T.J.; KORBUT, T.; GUZIK, A. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation, v. 54, n.4, p 469-87, 2003.

GRIESS, P. One a new of bodies in which nitrogen is substituted for hydrogen. **Philosophical Transaction Royale Society London**, v.154, p 667-723, 1864.

HARMAN, D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, v.11, p.298-300, 1956.

HARMAN, D. Free radical involvement in aging .Pathophysiology and therapeutic implications.**Drugs Aging**. v.3,n.1, p. 60-80, 1993.

HARMAN, D . Free-radical theory of aging .Increasing the functional life span **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.717, p.1-15.1994.

HARMAN, D .The aging process .**Proc . Natl. Sci.USA**, v.78, p 7124-7128, 1981.

HARMAN,D.. Alzheimer's disease pathogenesis role of aging.**Annual New York Academy of Sciences**, v.1067, p 454-460, 2006.

HARMAN,D.. The free radical theory of aging.**Antioxidants & Redox Signaling**, v.5, n.5, p 557-560, 2003.

JONES, D.P.; MODY, J.R.; CARLOSSON, J.L.; LYNN, M.J.; STERNBERG, J.R.P. Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidate events of aging from decline in antioxidant defenses. **Free Radicals Biology & Medicine**, v.33, n.9, p 1290-1300, 2002.

JUNGSU, K.; BASAK, J.A.; HOLTZMAN, D.M. The role of apolipoprotein E in Alzheimer disease .**Neuron**, n 63, p 287-303, aug, 2009.

KATZ, S.; FORD, A.B.; MOSKOWITZ, R.W.; JACKSON, B.A.; JAFFE, M.W. Studies of illness in the aged. The index of ADL: a standardized measure of biological and psychosocial function.**Jama**,v.185, p.914-919, 1963.

KNOTT, A.B.; BOSSY-WETZEL, E.. Impairing the mitochondrial fission and fusion balance :A new mechanism of neurodegeneration. **New York Academy of Sciences**, v.1147, p 283-292, 2008.

KALININ, S.; GAVRILYUK, V.; POLAK, P.E.; VASSER, R.; ZHAO, J.; HENERA, M.T.; FEINSTEIN, D.L. Noradrenaline deficiency in brain increases in animal model of Alzheimer's disease. **Neurobiology Aging**, v.28, n.8, p.1206-14, aug, 2007.

KENNEDY,B.P.;BOTTIGLIERI,T.;ARNING, E.;ZIEGLER, M.G.;HANSEN, L.A.;MASLIAH, E.Elevated S-adenosylhomocysteine in Alzheimer brain:influence on methyltransferases and cognitive function. **Journal Neural Transm**, v.111, p.547-67, 2004.

KNOTT, A.B.; PERKINS,G.; SCHWARZENBACHER, R.; BOSSY-ETZEL, E. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. **Nature Review Neuroscience**, v.9, p 505-518, july, 2009.

KOBAYASHI, S.D.; DELEO, F.R. Role of neutrophils in innate immunity:a systems biology-level approach. **WIREs Systems Biology and Medicine**. v.1,p.309-331, 2009.

KUMMAR, S.; JYOTI, A.; KESHARI, S.; SINGH, M.; BARTH WAL, M.K.; DIKSHIT, M. Functional and molecular characterization of NOS isoforms in rats neutrophil precursor cells. **Citometry**,v.77, p.467-77, 2010.

LAMBERT, A.J.; BRAND, M.D. Reactive oxygen species production by mitochondria. **Methods Mol Biol**, v.554, p.165-81, 2009..

LAWTON, M.P; BRODY, E.M. Assessment of older people : self –maintaining and instrumental activities of daily living .**Gerontologist**, v.9, p 179-86, 1969.

LIGHTERT, G.J.; CORBERAND, J.X.; FOURNIER, C.; GALANAUD, P.; HIJMANS, I.N.; KENNES, B.; MULLER-HERMELINK, H.K.; STREINMANN, G.G. Admission criteria for immunogerontological studies in man the senieur protocol. **Mechanisms Ageing Development**, v.28, n.1, p.47-55, nov, 1984.

LIU, P.; SMITH, P.F.; APPLETON, I.; DARLINGTON, C.L.; BILKEY, D.K. Nitric oxide synthase and arginase in the rat hippocampus and endorhinal, perirhinal, postrhinal, and temporal cortices: regional variations and age-related changes. **Hippocampus**, v.13, p.859-867, 2003.

LÓPEZ-LLUCH, G.; IRUSTA, P.M.; NAVAS, P.; DE CABO, R. Mitochondrial biogenesis and helth aging. **Exp Gerontology**, v.43, n. 9, p.813-9, 2008.

LORD, J.M.; BUTCHER, S.; KILLAMPALI, V.; LASCELLES, D.; SALMON, M. Neutrophil ageing and immunesenesence. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.122, p.1521-1535, 2001.

MACCIONE, R.B.; ROJO, L.E.; FERNANDEZ, J.A.; KULJIS, R.O. The role of neurimmunomodulation in Alzheimer's disease. **Annual New York Academy Science**, v.1153, p.240-6, fev, 2009.

MADDEN, K.S. Catecholamines , sympathetic innervation, and immunity , **Brain Behavior Immunity**, v.17 , n.1, p.5-10, 2003.

MALAQUIAS, L.C.C.; GOLBERG, S.S.; SILVA-PEREIRA, A.A. Role of trypanossoma cruzi lipopolysacaride on human granulocyte biological activities .**Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, p.469-480, 1991.

MATTHAY, M.A.; WARE, L.B. Can nicotine treat sepsis? **Nature Medicine**, v.10, n.11, p.11161-62, 2004.

MACCIONE, R.B.; ROJO, L.E.; FERNÁNDEZ, J.A.; KULJIS, R. The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease. **Annual of the New York Academy of Sciences**, v.1153, p.240-246, 2009.

MADDEN, K.S.; SANDERS, U.M.; FELTEN, D.L. Catecholamines influences and symphathetic neural modulation of immune responsiveness. **Annual Review Pharmacology Toxicology**, v.35, p.417-48, 1995.

MANCUSO, M.; ORSUCCI, D.; SICILIANO, G.; MURRI, L. Mitochondria DNA and Alzheimer's disease. What comes first. **Current Alzheimer Research**, v.5, n.5, p 457-68, 2008.

MONCADA, S. Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v.43, n.2, p.109-42, 1991.

MORAES, E.N.; MORAES, F.L. Coleção guia de bolso em geriatria e gerontologia .Incapacidade cognitive : Abordagens diagnósticas e terapêuticas das demências no idoso,v. 2, Folium editorial, Belo Horizonte,p 117, 2010.

MOREIRA, P.I.; CARVALHO, C.; ZHU, X.; SMITH, M.; PERRY, G. Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1802, p 2-10, 2010.

MORRIS, J.C.; ROE, C.M.; XIONG, C.; FAGAN, A.M.; GOATE, A.M.; HOLTZMAN, D.M.; MINTUN, M.A. APOE predicts amyloid-beta but not tau Alzheimer pathology in cognitively normal aging. **Annual Neurology**, v.67, p.122-131, 2010.

MORONI, F.; DIPAOLO, ML.; RIGO,A.; CAPRIANO,C.; GIACCONI, NA.; RECCHIONI, R.; MARCHESELLI, F.; MALAVOLTA, M.; MOCCHEGIANE, E. Interrelationship among neutrophil efficiency, inflammation, antioxidant , activity and zinc pool in very old age. **Biogerontology**, v.6, p.271-281, june, 2007.

NAVARRO, A.; BOVERIS, A. Mitochondrial nitric oxide synthase mitochondrial brain dysfunction in aging and mitochondrial-targeted antioxidants.**Advances Drug Delivery Reviews**, v.60, p 1534-1544, 2008.

NI, Y.; ZHAO, X.; BAO, G.; ZOU, L.; TENG, L.; WANG, Z.; SONG, M.; XIONG, J. Activation of β -adrenergic receptor stimulates γ -secretase activity and accelerates amyloid plaque formation. **Nature Medicine**, v.12, p 1390-1396, 2006.

NN, Y.; XX, W.; JT, Y.; ND, et.al. Blocking beta2-adrenergic receptor attenuates acute stress-induced amyloid beta peptides production. **Brain Research**, v.1317, p 305-10, 2010.

OLIVEIRA-LIMA, A.; DIAS DA SILVA, W. Imunologia, imunopatologia, alergia métodos, Rio de Janeiro:Guanabara Koogan , p 236, 1970.

OHTA, S.; OHSAWA, I. Dysfunction of mitochondria and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease:on defects in defects in the cytochrome c oxidase complex and aldehyde detoxification. **Journal Alzheimer's Disease**, v.9, n.2, p 155-66, 2006.

PARK,H. Y. ; PARK, J.I.. Modulation of neutrophil apoptosis by beta amyloid proteins .**International immunopharmacology**, v.61, p 1061-69, 2006.

PERILO, C.S. Mudanças no equilíbrio funcional metabólico em granulócitos humanos durante o processo de envelhecimento : alteração na sinalização mediada por IP3 e PKA durante esse processo. Belo Horizonte MG, 2005.f.109 (mestrado em Bioquímica e Imunologia)-Instituto de ciências biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG.

PICKRELL, A.M.; FUKUI, H.; MORAES, C.T.The role of cytochrome c oxidase deficiency in ROS and amyloid plaque formation.**Journal Bioenerg Biomembr**,v.41,n.5,p.453-6,2009.

PLACKETT, T.P.; BOEHMER, E.D.; FAUNCE, D.E.; KOVACS, E.J. Aging and innate immune cells.**Journal of Leukocytes Biology**, v. 26, p 291-299, 2004.

PODEROSO, J.J. The formation of peroxynitrite in the applied physiology of mitochondrial nitric oxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.484, p-214-220, 2009.

PUZZO, D.; VITOLO, O.; TRINCHESE, F.; JACOB, J.P.; PALMERI, A.; ARANCIO, O. Amyloid- β peptide inhibits activation of the nitric oxide/c GMP/c AMP-Responsive element-binding protein pathway during hippocampal synaptic plasticity, **The Journal of Neuroscience**, v.25, p-6887-6897, 2005.

RAFFAELLO, A.; RIZZUTO, R. Mitochondrial longevity pathways. **Biochimica et Biophysica Acta**, p 1-9, 2010.

REAGAN, L.P. Insulin signaling effects on memory and mood. **Current Opinion Pharmacology**, v.7, n.6, p.633-637, 2007.

RICHTER, C.; GOOVADZE, V.; LAFFRANCHI, R.; SCHLAPBACH, R.; SCHWEISER, M.; SUTER, M.; WALTER, P.; YAFFER, M. Oxidant in mitochondria: from physiology to diseases. **Bioquimical and Biophysical Acta**, v.1271, 1995.

RIVEST, S. Regulation of innate responses in the brain. **Nature Review Immunology**, v.9, n.6, p 429-39, 2009.

ROSAS-BALLINA, M.; TRACEY, K.J. The neurology of immune system: neural reflexes regulate immunity. **Neuron**, n.64, p.28-32, oct, 2009.

SAINI, R.; PATEL, S.; SALUJA, R.; SAHASABUDDHE, A.A.; SINGH, S.; HABIB, S.; BAIPAL, V.K.; DIKISHIT, M. **Journal Leukocytes Biology**, v.79, p.519-28, 2006.

SAGYAMA, K.; TSUCHIDA, M.; KAWAMURA, H.; WANG, S.; LI, C.; BAI, X.; NAGURA, T.; NOZORE, S. Age-related bias in function natural killer and granulocytes after stress: reciprocal association of steroid hormones and sympathetic nerves. **Clinical and Experimental Immunology**, v.135, p.56-63, 2004.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse noxious agents. **Nature**, v.138, p.22, 1936.

SCHRODER, A.K.; RINK, L. Neutrophil immunity of the elderly. **Mechanism of Ageing and Development**, v.124, n.1, p.19-24, 1999.

SHIMOHAMA, S.; TANINO, H.; KAWAKAMI, N.; OKAMURA, N. et al. Activation of NADPH oxidase in Alzheimer's disease brain. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v.273, p. 5-9, 2000.

STOZICKA, Z.; ZILKA, N.; MOVAK, M. Risk and protective factors for sporadic Alzheimer's disease. **Acta Virologica**, v.51, n.4, p.205-22, 2007.

SZOKE, D.; MOLNAR, B.; SOLYMOSI, K.R.; GERGICS, P.; BLASKO, B.; VASARHELVI, B.; VANNAY, A.; MANDAY, Y.; KLAUSZ, G.; GYULAI, Z.; GALAMB, O.; SPISAK, S.; HUTKAI, B.; SOMOGYI, A.; BERTA, K. Polymorphisms of the ApoE, HSD3B1, IL1 β and p53 genes are associated with the development of early uremic complications in diabetic patients: Results of DNA resequencing array study. **International Journal of Molecular Medicine**, v.23, n.2, p.217-27, 2009.

- SULTANA , R.; BUTTERFIELD, D.A. Role of oxidative stress in the progressive of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.19, p.341-353, 2010.
- TALAROVICOVA, A.; KRŠKOVA, L.; KISS, A. Some assessments of the amygdale role in suprahypothalamic neurendocrine regulation: a mine review. **Endocrine Regulation**, v.41, p. 155-62, 2007.M
- TERMAN, A. Catabolic insufficiency and aging. **Annal of New York Academy of Sciences**, v.1067, p 27-36, 2006.
- THATCHER, G.R.; BENNETT, B.M.; REYNOLDS, J.N. NO chimeras as therapeutic agents in Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Disease**, v 3, n 3, p.237-45, jun, 2006.
- THRUSH, M.A.; WILSON, M.E.; VAN DYKE, K. The geration of chemiluminescence by phagocytes cells. **Methods in Enzymology**, v.21, p.651-668, 1978.
- TRABOLD, B.; GRUBER, M.; FROHLICH, D. Functional and phenotypic changes in polymorphonuclear neutrophil induced by catecholamines. **Scand. Cardiovasc. Journal**, v.41, n.1, p.59-64, jan, 2007.
- TRACEY, K.A. Reflex control of immunity. **Nature Reviews Immunology**, v.9, p.418-428, june, 2009.
- TRIPATHI, P.; TRIPHATHI, P.; KASHYYAP, L.; SING, V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunology Medicine Microbiology**, v.51, p 443-52, 2007.
- TROY, C.M.; RABACCHI, S.A.; FRIEDMAN, W.J.; FRAPPIER, T.F.; BROWN, K.; SHELANSKI, M.L.. Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by β -amiloyd. **The Journal of Neuroscience**, v.20, n. 4, p.1386-92, fev, 2000.
- TYAGI, N.; GILLESPIE, W.; VACEK, J.C.; SEM, U.; TYAGI, S.C.; LOMINADZE, D. Activation of GABA-A receptor ameliorates homocysteine-induced MMP-9 by ERK pathway **Journal Cell Physiology**, v.220, p 257-266, 2009.
- VALLEBUONA, J.; RAITERI, M. Age-related changes in the NMDA receptor/nitric oxide/c GMP pathway in the hippocampus and cerebellum of freely moving rats subjects to transcerebral microdialysis. **The European Journal of Neuroscience**, v.7, p.694-701, 1995.
- VERHEY, F.R.J. Alois Alzheimer (1864-1915). **Journal Neurological**, v.25, n.6, p.502-3, 2009.
- VIÑA, J.; BORRAS, C.; MIQUEL, J. Critical reviews: theories of aging. **IUBMB Life**, v.59, p 249-54, 2007.
- VITTE, J.; MICHEL, B.F.; BONGRAND, P.; GASTALT, J. Oxidative stress level in circulating neutrophil is linked to neurodegenerative diseases. **Journal of Clinical Immunology**, v.24, p 683-691, 2004.
- YARIAN, C.S.; TOROSER, D.; SOHAL, R.S. Aconitase in the main functional targeted og aging in the citric acid cycle of kidney mitochondria from mice. **Mechanism of Ageing and Development**. v.127, p 79-84, 2006.

YAP, L.P.; GARCIA, J.V.; HAN, D.; CADENAS, E. The energy-redox in aging and age – related neurodegeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.61, p 1283-1298, 2009.

ZABLOCKA, A.; JANUSH, M. The two faces of reactive oxygen species. **Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej**, v.26, n.62, p.118-24, mar, 2008.

ZAWIA, N.H.; LAHIRI, D.K.; CARDOSO-PELAEZ, F. Epigenetic, oxidative stress, and Alzheimer's disease. *Free Radicals Biology Med.*, v.46, n.9, p.1241-9, may, 2009.

WANG, X.; SU, B.; ZHENG, L.; PERRY, G.; SMITH, M.A.; ZHU, X.; . The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, v.109, n.1, p.153-159, 2009.

WESSELS, J.; JANSEN, J.; RINK, L.; UCIECHOWSKI, P. Immunosenescence of polymorphonuclear neutrophils, v.10, p.145-160, 2010.

WENISCH, C.; PATRUTA, S.; DAYBOCK, F.; KRAUSE, R.; HORL, W. Effect age on human neutrophil function. *Journal Leukocytes Biol.*, v.67, n.1, p 40-45, 2000.

ANEXOS

Anexo I



CENTRO DE REFERÊNCIA DO IDOSO *PROF. CAIO BENJAMIN DIAS - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG*

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO MULTIDIMENSIONAL DO IDOSO

Data: ____ / ____ / ____

I. IDENTIFICAÇÃO

Nome:	
Número de Registro:	
Sexo:	
Profissão:	Aposentado: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Idade:	
Data de Nascimento:	
Naturalidade:	
Estado:	País:
Estado Civil: <input type="checkbox"/> Casado <input type="checkbox"/> Solteiro <input type="checkbox"/> Viúvo <input type="checkbox"/> Separdo <input type="checkbox"/> Outros	
Cor: <input type="checkbox"/> Leucoderma <input type="checkbox"/> Feoderma <input type="checkbox"/> Melanoderma	
Escolaridade:	
Endereço:	
Telefone:	
Informante (se for o caso):	Parentesco:
Cuidador:	Idade: Sexo:

II. QUEIXA PRINCIPAL DETALHADA

III. REVISÃO DOS SISTEMAS FISIOLÓGICOS PRINCIPAIS

1. Geral

Febre:	<input type="checkbox"/> Sim ____ °C	<input type="checkbox"/> Não
Mal-estar:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Astenia	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Aparência bem cuidada	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Cooperativo ao exame	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Tranquilo	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não

Palidez cutâneo-mucosa	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Especificar:		
Cianose de extremidades:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Icterícia:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Desidratação:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Especificar		
Tireóide aumentada:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Nódulo tireoideano:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Especificar		
Linfadenomegalias:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Especificar		

2. Órgãos dos Sentidos:

Deficiência visual:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Uso de lentes corretivas	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Teste Snellen (5 metros)	<input type="checkbox"/> < 0,3	<input type="checkbox"/> > 0,3
Dificuldade para ler jornais ou revistas	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Data da última visita ao Oftalmologista: _____ / _____ / _____		

Deficiência auditiva:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Uso de prótese auditiva	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Teste do sussuro (60cm de cada ouvido)	<input type="checkbox"/> Positivo	<input type="checkbox"/> Negativo
Dificuldade para conversação com 3 ou mais pessoas	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Data da última visita ao Otorrinolaringologista: _____ / _____ / _____		

Otoscopia

3. Pele e Anexos:

Ceratose actínica	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Ceratose Seborréica	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Purido: <input type="checkbox"/> Localizado <input type="checkbox"/> Generalizado	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Xerodermia	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Uso regular de creme hidratante	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Uso regular de protetor solar	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Neoplasia cutânea	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Úlcera de membros inferiores	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Úlcera de pressão	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Localização <input type="checkbox"/> sacral <input type="checkbox"/> trocântica <input type="checkbox"/> calcâneo <input type="checkbox"/> outros		
Gravidade: <input type="checkbox"/> Estágio 1: presença de vermelhidão e irritação local		
<input type="checkbox"/> Estágio 2: ulceração comprometendo epiderme/derme		
<input type="checkbox"/> Estágio 3: ulceração até subcutâneo e fáscia muscular		
<input type="checkbox"/> Estágio 4: ulceração comprometendo músculo e/ou osso		
Outras lesões:		

4. Aparelho Cardiovascular:

Dispnéia <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
<input type="checkbox"/> Habitual maior <input type="checkbox"/> Habitual <input type="checkbox"/> Habitual menor
<input type="checkbox"/> Independente do esforço
Dor torácica <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
<input type="checkbox"/> duração de 2 a 5 min. <input type="checkbox"/> desencadeada pelo esforço
<input type="checkbox"/> melhora com repouso ou nitrato
Especificar: _____
Palpitação <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
<input type="checkbox"/> início ou término súbito <input type="checkbox"/> ritmo irregular
<input type="checkbox"/> sensação de pausa <input type="checkbox"/> repercussão clínica
<input type="checkbox"/> freqüentemente <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> raramente
Fatores desencadeantes: _____

Perda da consciência <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
<input type="checkbox"/> síncope <input type="checkbox"/> lipotímia <input type="checkbox"/> sugestivo de hipoglicemia
<input type="checkbox"/> hipotensão ortostática <input type="checkbox"/> indeterminada
Claudicação mmii <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não

Pressão Arterial	mmHg	Fc (bpm)
Deitado 5 minutos		
Ortostatismo 0 min		
Ortostatismo 1 min		
Ortostatismo 3 min		
Ortostatismo 5 min		
Ectasia de aorta	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Sopro carotídeo	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Ingurgitamento jugular	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Ictus cordis palpável	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Especificar: _____		
Bulhas cardíacas		
Sopro cardíaco	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Especificar: _____		
Estalido	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Especificar: _____		
Pulso arterial periférico:		
Veias de mmii:		

5. Aparelho Genito-urinário:

Prostatismo () sim () não
 Incontinência Urinária () sim () não
 () recente <30 dias () crônica > 30 dias
 () urgência () esforço () sobrefluxo () funcional () mista
 () Limitante () Não limitante
 Urgência () sim () não
 Noctúria () sim () não
 Data da Menopausa _____
 Sangramento pós-menopáusico () sim () não
 Reposição estrogênica: () Sim Especificar: _____ () não
 () Nunca fez () Suspendeu () Faz regularmente
 História obstétrica: G _____ P _____ A _____
 Data da última visita ao Ginecologista: _____

Toque Retal

Palpação das Mamas

6. Aparelho Digestivo:

Disfagia () sim () não
 () orofaríngea () esofageana intermitente () progressiva
 () não progressiva () indeterminada
 Engasgo () sim () não
 1. Ocasionalmente 2. Dependendo da dieta
 3. Frequentemente
 Dispepsia () sim () não
 1. Queimação epigástrica que piora com a fome
 2. Empachamento pós-prandial
 3. Regurgitação 4. Indeterminada
 Náuseas/Vômitos () sim () não
 Constipação intestinal () sim () não
 () < 6 meses () > 6 meses
 () Necessita do uso regular de laxativo
 () Necessita de extração manual das fezes
 Frequência das evacuações _____
 Consistência das fezes _____
 Diarréia () sim () não
 () > 30 dias () disenteriforme () esteatorréia () indeterminada
 Hemorragia digestiva () sim () não
 () alta () baixa
 Incontinência fecal () sim () não
 () Recente <30 dias () Crônica > 30 dias
 () Sobrefluxo () Anorretal () Neurogênica () Secundária
 Dor abdominal () sim () não
 Doença Hemorroidária () sim () não
 Flatulência () sim () não

Icterícia () sim () não
 Parede abdominal
 Visceromegalias
 Massas
 Cicatrizes
 Dor
 Peristaltismo

9. Sistema Músculo-Esquelético:

Artralgia ()sim ()não
 ()poliartralgia ()monoartralgia ()artrite ()indeterminado
 ()pequenas articulações ()grandes articulações
 Localização →
 Rigidez matinal ()sim ()não
 Lombalgia ()sim () não
 1.Ocasional 2.Continua mas não limitante
 3.Continua e limitante
 Especificar: () comum/postural () radiculopatia
 () espondilite anquilosante () aguda
 Ombro doloroso ()sim () não
 Rigidez generalizada ()sim () não
 Peso ou fraqueza nos membros inferiores . ()sim () não
 Pés
 () Joanete ()Ceratose plantar ()Úlceras () Unha encravada
 () calcanealgia () Onicomicose ()Calçados inadequados

Deformidade:
 () cifose () torácica () lombar
 () mãos () pés () articular

10. Avaliação da Saúde Bucal

Nos últimos 3 meses o (a) senhor (a) ...		Nunca	Algumas vezes	Sempre
1	Diminuiu a quantidade de alimentos ou mudou o tipo de alimentação por causa dos seus dentes?			
2	Teve problemas para mastigar os alimentos?			
3	Teve dor ou desconforto para engolir os alimentos?			
4	Mudou o jeito de falar por causa dos problemas de sua boca?			
5	Teve algum desconforto ao comer algum alimento?			
6	Evitou encontrar com outras pessoas por causa de sua boca?			
7	Sentiu-se satisfeito (a) com a aparência da sua boca?			
8	Tomou remédio para dor ou o desconforto da sua boca?			
9	Algum problema bucal o deixou preocupado (a)?			
10	Chegou a se sentir nervoso por problemas na sua boca?			
11	Evitou comer com outras pessoas por problemas bucais?			
12	Teve dentes ou gengiva sensíveis a alimentos ou líquidos?			

Fonte: ATCHISON e DOLAN, 1990

Xerostomia () Sim () Não
 Halitose () Sim () Não
 Problemas de mastigação..... () Sim () Não
 Feridas ou lesões na mucosa oral ou língua..... () Sim () Não
 Sangramento gengival..... () Sim () Não
 Dor nos dentes, gengivas ou língua.. () Sim () Não
 Edentulismo..... () Sim () Não
 Prótese dentária () Sim () Não
 Prótese bem adaptada..... () Sim () Não
 Higiênização regular da boca ou prótese..... () Sim () Não
 Data da última visita ao dentista: _____

.Oroscopia:

IV. AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE GLOBAL

ATIVIDADES DE VIDA DIÁRIA BÁSICAS (AVD's básicas: AUTO-CUIDADO)

FUNÇÃO	INDEPENDÊNCIA Faz sozinho, totalmente, habitualmente e corretamente atividade considerada	DEPENDÊNCIA			
		PARCIAL		COMPLETA O idoso não faz a atividade considerada	
		Ajuda não humana	Ajuda humana		
BANHAR-SE Usa adequadamente chuveiro, sabão e/ou esponja	Independente para entrar e sair do banheiro.	Necessidade de ajuda através do uso de órtese ou algum apoio material para o banho.	Necessidade de ajuda humana para lavar algumas partes do corpo (costas ou pernas) ou supervisão	Recebe assistência no banho para mais de uma parte do corpo (ou não se banha)	
VESTIR-SE Apanha a roupa do armário ou gaveta, veste-se e consegue despir-se. Exclui- se calçados.	Independente para pegar a roupa e se vestir	Necessidade de apoio de algum objeto para se vestir.	Necessidade de ajuda humana para pegar a roupa.	Dependência total para vestir- se.	
USO DO BANHEIRO Locomove-se até o banheiro, despe-se e limpa-se e arruma a roupa.	Independente para ir ao banheiro e se limpar.	Necessidade de ajuda através do uso de órtese ou marreco, comadre e urinol para a higiene	Necessidade de ajuda humana para ir ao banheiro ou se limpar.	Não vai ao banheiro para o processo de eliminação	
TRANSFERIR-SE Locomove-se da cama para a cadeira e vice-versa	Independente para entrar ou sair do leito, sentar e levantar da cadeira.	Necessidade de ajuda através do uso de órtese ou de algum apoio material para realizar a transferência	Necessidade de ajuda humana parcial para entrar e sair do leito, sentar e levantar da cadeira.	Não sai da cama. Restrito ao leito	
CONTROLE ESFINCTE- RIANO	Micção	Independência para controlar a micção	Necessidade de ajuda através do uso regular de urinol, comadre ou marreco para controle da micção e defecação.	Necessidade de ajuda humana para controle da micção) ou usa fralda noturna somente (supervisão)	Dependência total através do uso constante de cateteres ou fraldas
	Evacuação	Independência para controlar os movimentos intestinais	Necessidade de ajuda através do uso regular de urinol, comadre ou marreco para controle da defecação.	Necessidade de ajuda humana para controle da defecação (supervisão) ou usa fralda noturna somente.	Dependência total através do uso constante de fraldas
ALIMENTAR-SE Consegue apanhar a comida do prato ou equivalente e levar à boca	Independente para pegar o alimento e levá-lo até a boca.	Necessidade de ajuda através do uso de adaptadores para a alimentação	Alimenta-se sozinho exceto pela assistência para cortar a carne e passar manteiga no pão.	Dependência total para a alimentação.	

ATIVIDADES INSTRUMENTAIS DE VIDA DIÁRIA (AVD's instrumentais)

Atividade de vida diária	Sem ajuda	Com ajuda parcial	Incapaz
Você é capaz de preparar as suas refeições?			
Você é capaz de tomar os seus remédios na dose certa e horário correto?			
Você é capaz de fazer compras?			
Você é capaz de controlar o seu dinheiro ou finanças?			
Você é capaz de usar o telefone?			
Você é capaz arrumar a sua casa ou fazer pequenos trabalhos domésticos ?			
Você é capaz de lavar e passar a sua roupa?			
Você é capaz de sair de casa sozinho para lugares mais distantes, usando algum transporte, sem necessidade de planejamento especiais?			

O que o senhor (a) gostaria de fazer e que não está fazendo?

O que o senhor (a) fazia e deixou de fazer ?

MOBILIDADE

MARCHA.....()

1. Sozinho 2. Ajuda ocasional 3. Ajuda frequente 4. Muleta ou bengala
5. andador 6. Cadeira de rodas 7. Imobilidade completa (acamado)

Subir escada (5 degraus).....()

- S. Sim N. Não 9. NA

“Get Up and Go” (Teste Qualitativo) e “Timed Up & Go”(Teste Quantitativo):

O paciente deve ser orientado a levantar-se de uma cadeira de braço, sem apoio de braços, caminhar 3 metros com passos seguros e confortáveis, girar 180 graus e retornar, sentando na cadeira.

Duração: () <10 seg () 10 a 20 seg () 20 a 30 seg () ≥ 30 Seg

AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DA MARCHA E EQUILÍBRIO <i>GET UP AND GO + TIMED UP AND GO</i>		
EQUILÍBRIO	Equilíbrio assentado	Firme, constante e estável
	Levantamento da cadeira	Capaz de levantar em um único movimento sem usar os braços
	Equilíbrio imediato ao levantar-se (3 a 5 seg)	Estável sem segurar em algum auxílio para a marcha ou outro objeto de suporte
	Rotação	Não segura ou cambaleia; não necessita segurar em qualquer objeto; os passos são contínuos
	Sentando-se	Movimento suave, seguro
LOCOMOÇÃO	Início da marcha	Inicia a caminhada imediatamente, sem nenhuma hesitação; o início da marcha é único suave
	Altura do passo	Oscila o pé completamente, mas não mais do que de 2,5 ou 5cm
	Comprimento do passo	O pé em oscilação ultrapassa o pé em apoio
	Desvio de curso ou trajeto	Os pés seguem próximo à linha reta, enquanto o paciente avança
	Estabilidade do tronco	O tronco não oscila, joelhos e tronco não estão fletidos; braços não são abduzidos num esforço para manter a estabilidade
	Distância dos tornozelos	Tornozelos quase se tocam enquanto anda
		DURAÇÃO (segundos)
Avaliação complementar do equilíbrio	Equilíbrio de pé: estável, capaz de ficar de pé com os pés bem juntos (base estreita), sem segurar em objetos de suporte	
	Equilíbrio com os olhos fechados (com os pés o mais próximo possível): estável, sem segurar algum objeto, com os pés unidos	
	<i>Nudge</i> test: paciente de pé com os pés o mais próximo possível, o examinador empurra com pressão uniforme 3x sobre o esterno (impulsão)	
	Equilíbrio unipodálico: capaz de manter-se estável sobre uma perna por 5 segundos sem apoiar-se	

QUEDAS

História de quedas no último ano.....sim não

Número de quedas..... 1 2 a 4 ≥ 5

Repercussão funcional..... sim não

Especificar:

Causas/circunstâncias:

Tropeção / escorregão

Ausência de motivo aparente

Perda da consciência

Doença aguda

Tempo de permanência no chão:

Necessidade de ajuda para levantar-se..... sim não

FRATURA.....() sim () não

() vértebra () fêmur () antebraço () outro Data:
() Espontânea () Acidental

COGNIÇÃO

Presença de esquecimento.....() sim () não () NA

Duração da sintomatologia:

O esquecimento vem piorando progressivamente?() sim () não () NA

Estado Mental.....()

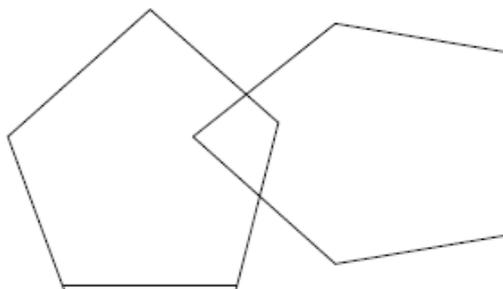
1. Orientado e obedece a instruções simples;
2. Desorientado, mas pode obedecer a instruções simples
3. Desorientado, não obedece a instruções simples;
4. Não mantém contato

Caracterização do esquecimento

MINI-MENTAL

ESCOLARIDADE (anos/escola): _____

Mini-Mental de Folstein (1975), adaptado por Brucki <i>et al</i> (2003)		DATA (score)				
Orientação Temporal (05 pontos) <i>Dê um ponto para cada item</i>	Ano					
	Mês					
	Dia do mês					
	Dia da semana					
	Semestre/Hora aproximada					
Orientação Espacial (05 pontos) <i>Dê um ponto para cada item</i>	Estado					
	Cidade					
	Bairro ou nome de rua próxima					
	<i>Local geral: que local é este aqui (apontando ao redor num sentido mais amplo: hospital, casa de repouso, própria casa)</i>					
Registro (3 pontos)	<i>Andar ou local específico: em que local nós estamos (consultório, dormitório, sala, apontando para o chão)</i>					
	<i>Repetir: GELO, LEÃO e PLANTA CARRO, VASO e TIJOLO</i>					
Atenção e Cálculo (5 pontos) Dê 1 ponto para cada acerto. Considere a tarefa com melhor aproveitamento.	<i>Subtrair 100 - 7 = 93 - 7 = 86 - 7 = 79 - 7 = 72 - 7 = 65</i>					
	<i>Soletrar inversamente a palavra MUNDO=ODNUM</i>					
Memória de Evocação (3 pontos)	Quais os três objetos perguntados anteriormente?					
Nomear dois objetos (2 pontos)	<i>Relógio e caneta</i>					
	<i>Repetir (1 ponto)</i>	<i>"NEM AQUI, NEM ALI, NEM LÁ"</i>				
Comando de estágios (3 pontos) Dê 1 ponto para cada ação correta)	<i>"Apanhe esta folha de papel com a mão direita, dobre-a ao meio e coloque-a no chão"</i>					
	<i>Escrever uma frase completa (1 ponto)</i>	<i>"Escreva alguma frase que tenha começo, meio e fim"</i>				
Ler e executar (1 ponto)	<i>FECHE SEUS OLHOS</i>					
Copiar diagrama (1 ponto)	<i>Copiar dois pentágonos com interseção</i>					
PONTUAÇÃO FINAL (escore = 0 a 30 pontos)						



FECHE SEUS OLHOS

TESTE DE LISTA DE PALAVRAS DO CERAD (MORRIS *et al*, 1989;
BERTOLUCCI *et al*, 1998)

LISTA DE PALAVRAS DO CERAD	DATA (score)			
	Tentativa 1			
Tentativa 2				
Tentativa 3				
Evocação de 5 minutos				
Reconhecimento de Palavras				

Lista de Palavras para Fixação e Recordação					
1ª tentativa	Ordem	2ª tentativa	Ordem	3ª tentativa	Ordem
Manteiga		Praia		Cabana	
Braço		Braço		Bilhete	
Praia		Cabana		Poste	
Carta		Manteiga		Rainha	
Rainha		Poste		Motor	
Cabana		Motor		Carta	
Poste		Erva		Erva	
Bilhete		Rainha		Braço	
Erva		Bilhete		Manteiga	
Motor		Carta		Praia	
Score					

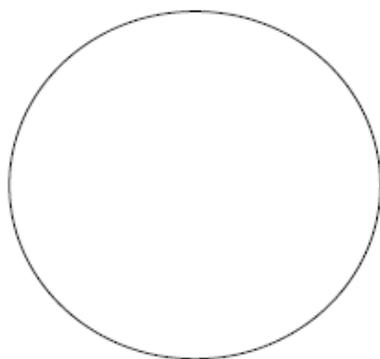
Lista de Reconhecimento de Palavras		
Igreja	Rainha	Café
Cabana	Manteiga	Chinelo
Dólar	Poste	Braço
Aldeia	Praia	Carta
Cinco	Bilhete	Erva
Tropa	Hotel	
Montanha	Motor	
Score:		

FAB –FRONTAL ASSESSMENT BATTERY

Item	Descrição	Pontuação
Similaridades (conceitualização)	banana-branja meus-cadete tulipa, rosa, margarida	3: três corretas 2: duas corretas 1: uma correta 0: nenhuma correta
Fluência lexical (flexibilidade mental)	fraseologia ortográfica: 5	3: mais de 9 palavras 2: 6 a 9 palavras 1: 3 a 5 palavras 0: menos de 3 palavras
Seqüências motoras (programação)	seqüências motoras de Luria: palma-punho-lado	3: 6 séries consecutivas sozinho 2: 3 séries consecutivas sozinho 1: 3 séries consecutivas imitação 0: não executa 3 séries imitação
Instruções conflitantes (sensibilidade à interferência)	*Bata uma vez quando eu bater duas e bata duas vezes quando eu bater uma*: 1-1-2-1-2-2-1-1-2	3: nenhum erro 2: um ou dois erros 1: mais de dois erros 0: ecopraxia quatro vezes
Vai-não vai (controle inibitório)	*Bata quando eu bater uma vez e não bat quando eu bater duas vezes*: 1-1-2-1-2-2-1-1-2	3: nenhum erro 2: um ou dois erros 1: mais de dois erros 0: ecopraxia quatro vezes
Prensão (autonomia ambiental)	*Não pegue minhas mãos*	3: não pega as mãos do examinador 2: hesita, e pergunta o que fazer 1: pega sem hesitação 0: continua pegando após advertência

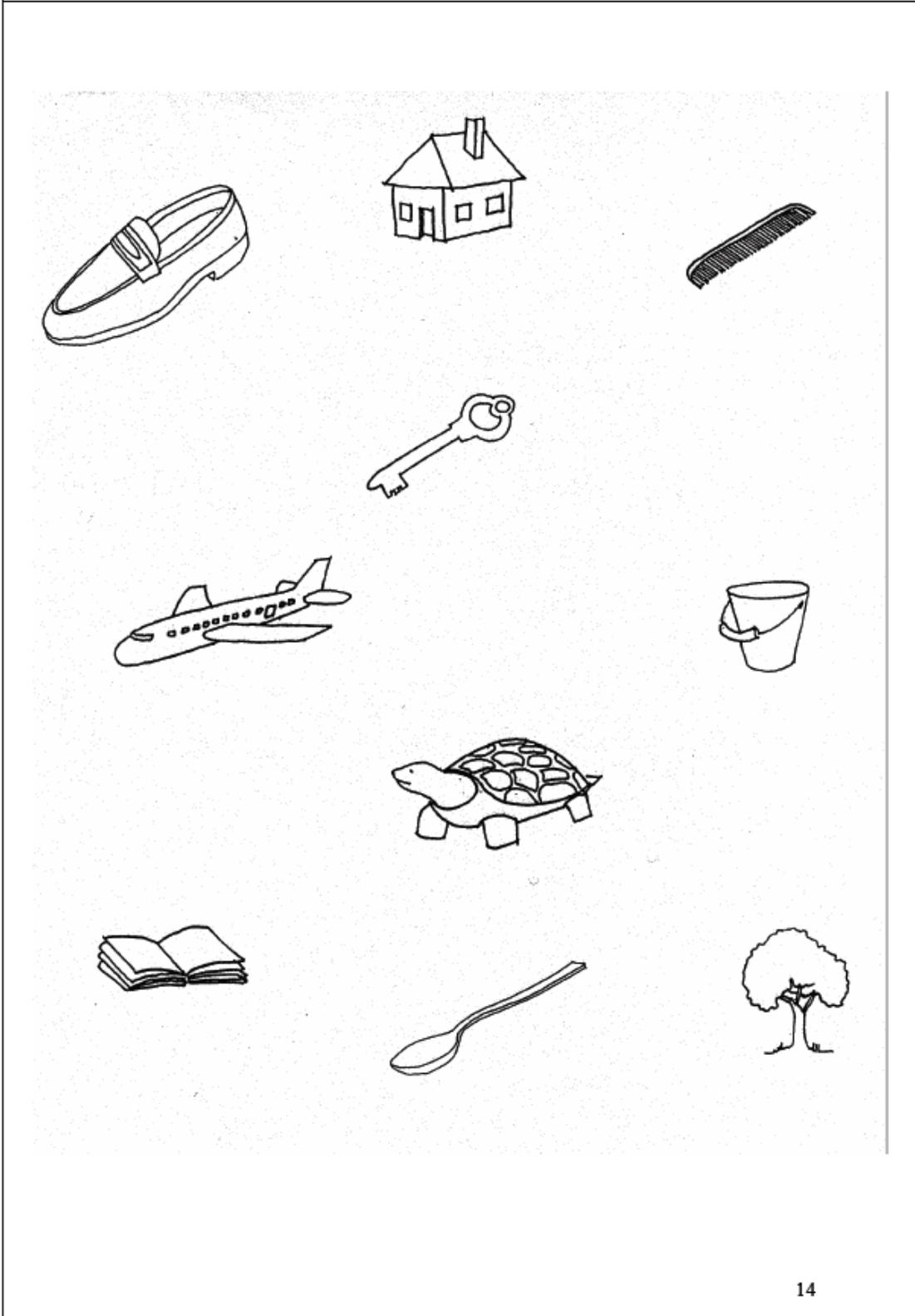
TESTE DO RELÓGIO

TESTE DO RELÓGIO (SCORE DE SHULMAN) <i>"Desenhe um relógio com todos os números e marcando 11:10"</i>		DATA				
0	Inabilidade absoluta para representar o relógio					
1	O desenho tem algo a ver com o relógio mas com desorganização visuo-espacial grave;					
2	Desorganização visuo-espacial moderada que leva a uma marcação de hora incorreta, perseveração, confusão esquerda-direita, números faltando, números repetidos, sem ponteiros, com ponteiros em excesso;					
3	Distribuição visuo-espacial correta com marcação errada da hora;					
4	Pequenos erros espaciais com dígitos e hora corretos;					
5	Relógio perfeito;					



TESTE DE RECONHECIMENTO DE FIGURAS

RECONHECIMENTO DE FIGURAS	DATA (score)				
Percepção Visual Correta					
Nomeação Correta					
Memória Incidental <i>Esconda as figuras e pergunte: "que figuras eu acabei de lhe mostrar?"</i>					
Memória Imediata 1 <i>Mostre as figuras novamente durante 30 segundos dizendo: "Olhe bem e procure memorizar esta figuras"</i>					
Memória Imediata 2 <i>Mostre a figuras novamente durante 30 segundos dizendo: "Olhe bem e procure memorizar esta figuras"</i>					
Evocação de 5 Minutos					



FLUÊNCIA VERBAL (1 minuto):

FLUÊNCIA VERBAL	DATA (score)			
ANIMAIS				
FRUTAS				

ESCALA ISQUÊMICA DE HACHINSKI

ESCALA ISQUÊMICA DE HACHINSKI		
	Original	Modificada por Loeb
<i>Início súbito</i>	2	1
<i>Antecedentes de AVC</i>	2	2
<i>Sintomas neurológicos focais</i>	2	2
<i>Sinais neurológicos focais</i>	2	2
<i>Áreas hipodensas na neuroimagem</i>	*	
<i>Únicas</i>	*	2
<i>Múltiplas</i>	*	3
<i>Deterioração cognitiva em graus</i>	1	
<i>Evolução flutuante</i>	2	*
<i>Confusão mental noturna</i>	1	*
<i>Preservação relativa da personalidade</i>	1	*
<i>Depressão</i>	1	*
<i>Queixas somáticas</i>	1	*
<i>Incontinência emocional</i>	1	*
<i>História de hipertensão</i>	1	*
<i>Evidência de aterosclerose associada</i>	1	*
SCORE		
Sugestivo de Demência Vascular	≥ 7	≥ 5
Sugestivo de Demência de Alzheimer	≤ 4	≤ 2

ÍNDICE DE PFEFFER

Avaliação das Atividades de Vida Diária, segundo Pfeffer						
0. Normal	0. Nunca o fez, mas poderia fazê-lo					
1. Faz, com dificuldade	1. Nunca o fez e agora teria dificuldade					
2. Necessita de ajuda						
3. Não é capaz						
	0	1	2	3	0	1
Ele (Ela) é capaz de preparar uma comida?						
Ele (Ela) manuseia seu próprio dinheiro?						
Ele (Ela) é capaz de manusear seus próprios remédios?						
Ele (Ela) é capaz de comprar roupas, comida, coisas para casa sozinho?						
Ele (Ela) é capaz de esquentar a água para o café e apagar o fogo?						
Ele (Ela) é capaz de manter-se em dia com as atualidades, com os acontecimentos da comunidade ou da vizinhança?						
Ele (Ela) é capaz de prestar atenção, entender e discutir um programa de rádio ou televisão, um jornal ou uma revista?						
Ele (Ela) é capaz de lembrar-se de compromissos, acontecimentos, familiares, feriados?						
Ele (Ela) é capaz de passear pela vizinhança e encontrar o caminho de volta para casa?						
Ele (Ela) é capaz de ser deixado (a) em casa sozinho (a) de forma segura?						
0. Normal	0. Nunca ficou, mas poderia ficar agora					
1. Sim, com precauções	1. Nunca ficou e agora teria dificuldade					
2. Sim, por curtos períodos						
3. Não poderia						
PONTUAÇÃO						

HUMOR

Você se sente freqüentemente triste ou deprimido.....Sim Não

Sintomas Maiores de Depressão:

Interesse ou prazer acentuadamente diminuídos.....	Sim	Não
Humor deprimido (sente-se triste ou vazio)	Sim	Não
Perda ou ganho significativo de peso, ou diminuição ou aumento do apetite.....	Sim	Não
Insônia ou hipersonia	Sim	Não
Agitação ou retardo psicomotor.....	Sim	Não
Fadiga ou perda de energia.....	Sim	Não
Sentimento de inutilidade ou culpa excessiva ou inadequada.....	Sim	Não
Capacidade diminuída de pensar ou concentrar-se.....	Sim	Não
Pensamento recorrentes de morte, ideação suicida recorrente.....	Sim	Não

SCORE: ()

Duração da sintomatologia:

A sintomatologia trouxe alteração do seu funcionamento anterior.....Sim Não

Escala Geriátrica de Depressão (GDS-15 e GDS-5)

(Para cada questão, escolha a opção que mais se assemelha ao que você está sentindo nas últimas semanas)
Validação: Almeida O.P. Arq Neuropsiquiat, v.57,p.421-428, 1999.

Você está basicamente satisfeito com sua vida?.....	Sim	NÃO
Você se aborrece com freqüência?.....	SIM	Não
Você se sente um inútil nas atuais circunstâncias?.....	SIM	Não
Você prefere ficar em casa a sair e fazer coisas novas?.....	SIM	Não
Você sente que sua situação não tem saída?.....	SIM	Não
Você tem medo que algum mal vá lhe acontecer?	SIM	Não
Você acha que sua situação é sem esperanças?.....	SIM	Não
Você acha maravilhoso estar vivo?.....	Sim	NÃO
Você sente que sua vida está vazia?.....	SIM	Não
Você sente que a maioria das pessoas está melhor que você?.....	SIM	Não
Você se sente com mais problemas de memória do que a maioria?.....	SIM	Não
Você deixou muitos de seus interesses e atividades?	SIM	Não
Você se sente de bom humor a maior parte do tempo?.....	Sim	NÃO
Você se sente cheio de energia?.....	Sim	NÃO
Você se sente feliz a maior parte do tempo?.....	Sim	NÃO

PONTUAÇÃO:

Alterações Comportamentais

INVENTÁRIO NEUROPSIQUIÁTRICO (NPI – CUMMINGS <i>et al.</i> , 1994)									
<i>Intensidade:</i> 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave;			<i>Frequência:</i> 1 = ocasionalmente, menos de uma vez por semana; 2 = pouco frequentemente, cerca de uma vez por semana; 3 = frequentemente, várias vezes por semana, mas não todo dia; 4 = Muito frequentemente, uma ou mais vezes por dia ou continuamente						
SINTOMATOLOGIA	NÃO	SIM							
		INTENSIDADE			FREQUÊNCIA				
		1	2	3	1	2	3	4	
Delusão: idéias de cunho persecutorio, de furto ou infidelidade.									
Alucinações: visuais/ auditivas/ táteis/ olfativas									
Agitação/inquietude, agressividade									
Disforia: baixa de humor, tristeza									
Ansiedade									
Euforia									
Apatia: comportamento passivo, falta de iniciativa.									
Desinibição									
Irritabilidade/Labilidade emocional									
Atividade motora aberrante: perambulação....									

Comentários:

História de doença psiquiátrica prévia..... () sim () não

Especificar:

Clinical Dementia Rating (CDR)..... ()

Função	Comprometimento Funcional				
	Nenhum 0	Questionável 0,5	Leve 1	Moderado 2	Grave 3
Memória	Não há perda de memória ou esquecimento leve e inconstante	Esquecimento leve mas consistente. Esquecimento "benigno". Lembrança parcial dos eventos.	Perda moderada da memória para eventos recentes, interferindo com as atividades do cotidiano.	Perda grave da memória. Apenas material altamente conhecido continua preservado. Informações novas são rapidamente perdidas.	Perda grave da memória. Apenas resquícios de memória estão presentes.
Orientação	Completamente orientado	Completamente orientado, exceto pela presença de discretas dificuldades nas relações temporais	Dificuldade moderada nas relações temporais. Orientado no espaço. Pode apresentar desorientação geográfica.	Dificuldade grave nas relações temporais. Usualmente desorientado no tempo e frequentemente no espaço.	Orientado somente quanto à pessoa.
Julgamento e resolução de problemas	Resolve problemas do dia-a-dia e lida bem com negócios e finanças. Julgamento é bom em relação ao seu desempenho anterior	Comprometimento discreto na capacidade de resolução de problemas, similaridades e diferenças	Dificuldade moderada na resolução de problemas, similaridades e diferenças. Julgamento social usualmente mantido	Comprometimento grave na resolução de problemas, similaridades e diferenças. Julgamento social usualmente comprometido.	Completamente incapaz de emitir julgamento e resolver problemas.
AVD's comunitárias	Independente para os níveis usuais de trabalho, compras e participação em grupos sociais e voluntários	Comprometimento leve	Incapaz de funcionar independente, embora ainda consiga realizar algumas. Apresenta-se normal no contato casual.	Completamente incapaz de funcionar adequadamente fora do domicílio, apesar de não aparentar.	Completamente incapaz de funcionar adequadamente fora do domicílio. Aparenta estar muito comprometido para tais funções.
AVD's domiciliares (tarefas domésticas)	Vida doméstica, hobbies e interesses intelectuais preservados	Comprometimento leve	Comprometimento leve mas já estabelecido. Incapaz de realizar tarefas, hobbies ou atividades mais difíceis.	Apenas tarefas simples estão preservadas. Interesses bastante restritos.	Completamente incapaz
AVD's básicas	Independente no auto-cuidado		Necessita de ajuda	Requer assistência para vestir-se, higiene pessoal e cuidado pessoal	Requer assistência completa no cuidado pessoal. Presença de incontinência.

NUTRIÇÃO			
MINI AVALIAÇÃO NUTRICIONAL (MAN)			
Peso (kg):	Altura (cm):	Altura do joelho (cm):	IMC:
TRIAGEM		Quantas refeições faz por dia? 0 = uma refeição 1 = duas refeições 2 = três refeições <input type="checkbox"/>	
Nos últimos três meses houve diminuição da ingestão alimentar devido a perda de apetite, problemas digestivos ou dificuldade para mastigar ou deglutir? 0 = diminuição severa da ingestão 1 = diminuição moderada da ingestão 2 = sem diminuição da ingestão <input type="checkbox"/>		O paciente consome: pelo menos uma porção diária de leite ou derivados (queijo, iogurte)? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> duas ou mais porções semanais de legumes ou ovos? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> carne, peixe ou aves todos os dias? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>	
Perda de peso nos últimos meses 0 = superior a três quilos 1 = não sabe informar 2 = entre um e três quilos 3 = sem perda de peso <input type="checkbox"/>		0,0 = nenhuma ou uma resposta <<sim>> 0,5 = duas respostas <<sim>> 1,0 = três respostas <<sim>> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Mobilidade 0 = restrito ao leito ou à cadeira de rodas 1 = deambula mas não é capaz de sair de casa 2 = normal <input type="checkbox"/>		O paciente consome duas ou mais porções diárias de frutas ou vegetais? 0 = não 1 = sim <input type="checkbox"/>	
Passou por algum estresse psicológico ou doença aguda nos últimos três meses? 0 = sim 2 = não <input type="checkbox"/>		Quantos copos de líquidos (água, suco, café, chá, leite) o paciente consome por dia? 0,0 = menos de três copos 0,5 = três a cinco copos 1,0 = mais de cinco copos <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Problemas neuropsicológicos 0 = demência ou depressão graves 1 = demência leve 2 = sem problemas psicológicos <input type="checkbox"/>		Modo de se alimentar 0 = não é capaz de se alimentar sozinho 1 = alimenta-se sozinho, porém com dificuldade 2 = alimenta-se sozinho sem dificuldade <input type="checkbox"/>	
Índice de massa corpórea (IMC = peso [kg] / estatura [m] ²) 0 = IMC < 19 1 = 19 ≤ IMC < 21 2 = 21 ≤ IMC < 23 3 = IMC ≥ 23 <input type="checkbox"/>		O paciente acredita ter algum problema nutricional? 0 = acredita estar desnutrido 1 = não sabe dizer 2 = acredita não ter problema nutricional <input type="checkbox"/>	
Escore de Triagem (subtotal, máximo de 14 pts) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		Em comparação a outras pessoas da mesma idade, como o paciente considera a sua própria saúde? 0,0 = não muito boa 0,5 = não sabe informar 2,0 = melhor <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
12 pontos ou mais normal; desnecessário continuar a avaliação		Circunferência do braço (CB) em cm 0,0 = CB < 21 0,5 = 21 ≤ CB ≤ 22 1,0 = CB > 22 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
11 pontos ou menos possibilidade de desnutrição continuar a avaliação		Circunferência da panturrilha (CP) em cm 0 = CP < 31 1 = CP ≥ 31 <input type="checkbox"/>	
Avaliação global			
O paciente vive em sua própria casa (não em casa geriátrica ou hospital) 0 = não 1 = sim <input type="checkbox"/>		Avaliação global (máximo 16 ponto) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Utiliza mais de três medicamentos diferentes por dia? 0 = sim 1 = não <input type="checkbox"/>		Escore da triagem <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Lesões de pele ou escaras? 0 = sim 1 = não <input type="checkbox"/>		Escore Total (máximo 30 pontos) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Avaliação do Estado Nutricional			
De 17 a 23,5 pontos risco de desnutrição <input type="checkbox"/>			
Menos de 17 pontos desnutrido <input type="checkbox"/>			

IMUNIZAÇÃO

Vacinação anti-tetânica () Completa () Incompleta () Ausente () Ignorado

Data da última dose:

Se negativo, especificar porque:

Vacinação anti-influenza no último ano.....() sim () não

Se negativo, especificar:

Vacinação anti-pneumocócica() sim () não

Ano: _____

Se negativo, especificar:

Vacinação anti-amarílica() sim () não

Ano: _____

Se negativo, especificar:

ÓRTESES/PRÓTESES() sim () não

Especificar:

HOSPITALIZAÇÕES CLÍNICAS (DIAGNÓSTICO/ANO)

- 1 _____
- 2 _____
- 3 _____
- 4 _____
- 5 _____

CIRURGIAS PRÉVIAS

- 1 _____
- 2 _____
- 3 _____

DIAGNÓSTICOS ANTERIORES RELATADOS:

	Diagnóstico		Diagnóstico
Doenças Cardiovasculares		Orgãos dos Sentidos	
Hipertensão arterial		Catarata	
Insuficiência Cardíaca		Glaucoma	
Insuficiência Coronariana		Degeneração macular	
Arritmia cardíaca		Outras:	
Doença vascular periférica			
Outras:		Sistema Músculo-Esquelético	
		Osteoartrite	
Doenças Respiratórias		Osteoporose	
DPOC		Outras:	
Asma			
Tuberculose		Doenças Hematológicas	
Pneumonia		Anemia	
Neoplasia		Linfoma/Leucemia/Mieloma	
Outras:		Discrasia sanguínea	
		Outras:	
Doenças Endócrino-Metabólicas			
Diabetes mellitus		Doenças do Tubo Digestivo	
Dislipidemia		DRGE	
Hipotireoidismo		Úlcera Péptica	
Hipertireoidismo		Colelitíase	
Outras:		Neoplasia	
		Outras:	
Doenças Neuro-Psiquiátricas			
Demência		Doenças Gêmito-urinárias	
Depressão		ITU	
Parkinsonismo		Neoplasia	
AVC		Outras:	
Confusão mental aguda			

HISTÓRIA FAMILIAR POSITIVA PARA:

- Doença cardiovascular prematura..... () sim () não
(IAM ou morte súbita antes dos 55 anos no pai ou parentes de 1º grau do sexo masculino, ou antes dos 65 anos na mãe ou parentes de 1º grau do sexo feminino)
- Hipertensão arterial sistêmica..... () sim () não
- Diabetes mellitus tipo II..... () sim () não
- Doença tireoidiana..... () sim () não
- Câncer de cólon..... () sim () não
- Câncer de mama..... () sim () não () não se aplica
- Câncer de próstata..... () sim () não () não se aplica
- Osteoporose/Fratura de fragilidade..... () sim () não
- Depressão..... () sim () não
- Demência..... () sim () não

VI. AVALIAÇÃO SÓCIO-FAMILIAR**A) IDOSO DE COMUNIDADE****Quadro da constituição familiar**

Nome	Parentesco	Sexo	Est.Civil	Reside com o idoso	
				Sim	Não

Risco Psico-social na esfera familiar

	SIM	NÃO
Se tem algum problema, sente que a família se preocupa o necessário?		
Sente que é escutado e que compartilham consigo problemas e preocupações familiares?		
Sente-se compreendido?		
Sente-se satisfeito com a maneira como é tratado na família?		
Viuvez recente		
Perda de filhos (recente)		
Vive sozinho		

Área profissional

Ocupação de habilitações profissionais:

Situação atual

Aposentado: () Sim () Não

Situação previdenciária: () Privada () Pública

Desenvolve alguma outra atividade produtiva? () Sim () Não

Área social/atividades/interesses:**Interesses sociais**

Grupos de convivência: () Sim () Não

Escolas abertas: () Sim () Não

Clubes: () Sim () Não

Trabalhos voluntários: () Sim () Não

Visitas a parentes: Quais?

Frequência: () diária () semanal () quinzenal () mensal () esporádica

Visitas a amigos: Quais?

Frequência:

Lazer:

Religião:

Qual?

Praticante?

Onde?

Frequência?

A religião/espiritualidade na velhice é:

Em geral, você diria que sua saúde é:

Atualmente	Há um ano atrás
Excelente	Muito melhor agora do que há um ano atrás
Muito boa	Um pouco melhor agora do que há um ano atrás
Boa	Quase a mesma coisa do que há um ano atrás
Ruim	Um pouco pior agora do que há um ano atrás
Muito ruim	Muito pior agora do que há um ano atrás

Na sua opinião qual problema que mais o atinge na vida diária:

() nenhum () econômico () saúde () pessoal () familiar

B. IDOSO INSTITUCIONALIZADO

- Tempo de institucionalização: _____
- Como chegou à instituição: () Vontade própria () Trazido por parentes
() Trazidos por outros
- Motivo da institucionalização:
- O que significa viver no asilo?
- Como é a sua rotina na instituição?
- Dinâmica das relações: Você considera a relação:
 - Idoso/idoso: () Ótima () Boa () Regular () Péssima
 - Idoso/funcionários: () Ótima () Boa () Regular () Péssima
 - Idoso/dirigente: () Ótima () Boa () Regular () Péssima
 - Idoso/familiares: () Ótima () Boa () Regular () Péssima

7. Família

7.1 Com quem residia antes de vir para a instituição?

7.2 Quadro da constituição familiar

Nome	Parentesco	Sexo	Est.Civil	Local da residência	Visita		Frequência
					Sim	Não	

8. Religião:

Qual? Praticante? Onde? Frequência?
 A religião/espiritualidade na velhice é:

9. Área profissional

Ocupação de habilitações profissionais:

Situação atual

Aposentado: () Sim () Não

Situação previdenciária: () Privada () Pública

Desenvolve alguma outra atividade produtiva? () Sim () Não

Recebe o Benefício de Prestação Continuada (BPC)? () Sim () Não

10. Interesses principais:

Antes da institucionalização:

Atuais:

11. Visão do idoso sobre o envelhecimento:

12. Em geral, você diria que sua saúde é:

Atualmente	Há um ano atrás
Excelente	Muito melhor agora do que há um ano atrás
Muito boa	Um pouco melhor agora do que há um ano atrás
Boa	Quase a mesma coisa do que há um ano atrás
Ruim	Um pouco pior agora do que há um ano atrás
Muito ruim	Muito pior agora do que há um ano atrás

13. Na sua opinião qual problema que mais o atinge na vida diária:

() nenhum () econômico () saúde () pessoal

14. Tem conhecimento sobre as Leis específicas para os idosos?

15. Citar um fato marcante da sua vida.

VII. AVALIACAO DO CUIDADOR

Nome

Sexo:

Data

Grau de parentesco:

Inventário de Sobrecarga de Zarit (SCAZUFCA M., Rev Bras Psiquiatr, v.24,p.12-7, 2002)

Instruções: a seguir encontra-se uma lista de afirmativas que reflete como as pessoas algumas vezes sentem-se quando cuidam de outra pessoa. Depois de cada afirmativa, indique com que frequência o Sr/Sra se sente daquela maneira (nunca = 0; raramente = 1; algumas vezes = 2; frequentemente = 3; ou sempre = 4). Não existem respostas certas ou erradas.

	0	1	2	3	4
O Sr/Sra sente que S* pede mais ajuda do que ele (ela) necessita?					
O Sr/Sra sente que por causa do tempo que o Sr/Sra gasta com S, o Sr/Sra não tem tempo suficiente para si mesmo?					
O Sr/Sra se sente estressado (a) entre cuidar de S e suas outras responsabilidades com a família e o trabalho?					
O Sr/Sra se sente envergonhado (a) com o comportamento de S?					
O Sr/Sra se sente irritado (a) quando S está por perto?					
O Sr/Sra sente que S afeta negativamente seus relacionamentos com outros membros da família ou amigos?					
O Sr/Sra sente receio pelo futuro de S?					
O Sr/Sra sente que S depende do Sr/Sra?					
O Sr/Sra se sente tenso (a) quando S está por perto?					
O Sr/Sra sente que a sua saúde foi afetada por causa do seu envolvimento com S?					
O Sr/Sra sente que o Sr/Sra não tem tanta privacidade como gostaria, por causa de S?					
O Sr/Sra sente que a sua vida social tem sido prejudicado por que o Sr/Sra está cuidando de S?					
O Sr/Sra não se sente a vontade de ter visitas em casa, por causa de S?					
O Sr/Sra sente que S espera que o Sr/Sra cuide dele/dela, como se o Sr/Sra fosse a única pessoa de ele/ela pode depender?					
O Sr/Sra sente que não tem dinheiro suficiente para cuidar de S, somando-se as suas outras despesas?					
O Sr/Sra sente que será incapaz de cuidar de S por muito mais tempo?					
O Sr/Sra sente que perdeu o controle da sua vida depois da doença de S?					
O Sr/Sra gostaria de simplesmente deixar que outra pessoa cuidasse de S?					
O Sr/Sra se sente em dúvida sobre o que fazer por S?					
O Sr/Sra sente que deveria estar fazendo mais por S?					
O Sr/Sra sente que poderia cuidar melhor de S?					
De uma maneira geral, quanto o Sr/Sra se sente sobrecarregado (a) por cuidar de S**?					

* No texto S refere-se a quem é cuidado pelo entrevistado. Durante a entrevista, o entrevistador usa o nome desta pessoa.

**Neste item as respostas são: nem um pouco = 0; um pouco = 1; moderadamente = 2; muito = 3, extremamente = 4.

VIII. AVALIAÇÃO AMBIENTAL

ESCALA AMBIENTAL DE RISCO DE QUEDAS

LOCAL	AVALIAÇÃO	SIM	NÃO
ÁREAS DE LOCOMOÇÃO	Áreas de locomoção desimpedidas		
	Barra de apoio		
	Revestimentos: uniformes ou tapetes bem fixos		
ILUMINAÇÃO	Suficiente para clarear toda a superfície de marcha no interior de cada cômodo, incluindo degraus		
	Interruptores: acessíveis na entrada dos cômodos		
	Sentinelas: iluminando o quarto, o corredor e o banheiro		
	Iluminação exterior: suficiente para iluminar toda a entrada exterior		
	Cama com luz indireta		
QUARTO DE DORMIR	Guarda-roupa: cabides facilmente acessíveis		
	Cadeira permitindo se assentar para se vestir		
	Cama de boa altura (45 cm)		
BANHEIRO	Lavabo: facilmente acessível e bem fixo		
	Área do chuveiro: antiderrapante		
	Box: abertura fácil, cortina bem firme		
COZINHA	Armários: baixos, sem necessidade de uso de escada		
	Pia sem vazamentos e que permite entrada de cadeira de roda se necessário		
ESCADA	Revestimento antiderrapante, marcação do primeiro e último degraus com faixa amarela		
	Corrimão bilateral		
	Corrimão sólido		
	Corrimão que se prolonga além do primeiro e do último degraus		
	Espelho do degrau fechado, com lixas antiderrapantes		
	Uniformidade dos degraus: altura dos espelhos e profundidade dos degraus constantes		

Local aonde passa a maior parte do tempo	Atividade desenvolvida	Problemas com o local

Existe algum local em sua residência que o senhor(a) não frequenta? Por qual motivo?

IX. EXAMES COMPLEMENTARES:

Rastreamento de câncer					
Mamografia					
Citologia cérvix uterino					
US pélvico					
Sangue oculto fecal					
Retossigmoidoscopia					
PSA total					
PSA livre					

Doenças Endócrino-Metabólicas					
T.S.H.					
Glicemia de jejum					
Colesterol total					
HDL-C					
LDL-C					
VLDL-C					
Triglicerídeos					
Sódio					
Potássio					
Cloro					
Cálcio					
Fósforo					
Fosfatase Alcalina					
Acido úrico					
Vitamina B12					
Acido Fólico					
Albumina					
Globulinas					

Função Renal					
Uréia					
Creatinina					
Clearance Creat					
Urina Rotina					

Radiologia/ Outros	
RX tórax	
ECG	

Densitometria óssea					
Score T	Fêmur				
	Vértebra				
Score Z	Fêmur				
	Vértebra				

Hemograma				
Hemoglobina				
Hemácias				
Hematócrito				
VCM				
CHCM				
RDW				
Leucócitos Global				
Neutrófilos				
Linfócitos				
Eosinófilos				
Monócitos				
Basófilos				
Plaquetas				
PTT				
RNI				
Outras:				

OUTROS

X. Estimativas Gerais

1. Risco de Framingham (*Risco de doença arterial coronariana em 10 anos*):

	HOMEM					MULHER					SCORE
Idade											
20-34 a	- 9					- 7					
35-39 a	- 4					- 3					
40-44 a	0					0					
45-49 a	3					3					
50-54 a	6					6					
55-59 a	8					8					
60-64 a	10					10					
65-69 a	11					12					
70-74 a	12					14					
75-79 a	13					16					
Colesterol Total (mg/ml)	20-39a	40-49a	50-59a	60-69a	70-79a	20-39a	40-49a	50-59a	60-69a	70-79a	
< 160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
160-199	4	3	2	1	0	4	3	2	1	1	1
200-239	7	5	3	1	0	8	6	4	2	1	1
240-279	9	6	4	2	1	11	8	5	3	2	2
≥ 280	11	8	5	3	1	13	10	7	4	2	2
Tabagismo											
Não-fumante	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fumante	8	5	3	1	1	9	7	4	2	1	1
HDL-Colesterol (mg/dl)											
≥ 60	- 1					- 1					
50-59	0					0					
40-49	1					1					
< 40	2					2					
Pressão Sistólica (mm Hg)	Se não tratada		Se tratada			Se não tratada		Se tratada			
< 120	0		0			0		0			
120-129	0		1			1		3			
130-139	1		2			2		4			
140-159	1		2			3		5			
≥ 160	2		3			4		6			
PONTUAÇÃO TOTAL	Risco de DAC em 10 a					PONTUAÇÃO TOTAL					Risco de DAC em 10 a
< 0	< 1					< 9					< 1
0	1					9					1
1	1					10					1
2	1					11					1
3	1					12					1
4	1					13					2
5	2					14					2
6	2					15					3
7	3					16					4
8	4					17					5
9	5					18					6
10	6					19					8
11	8					20					11
12	10					21					14
13	12					22					17
14	16					23					22
15	20					24					27
16	25					≥ 25					≥ 30
≥ 17	≥ 30										
RISCO EM 10 ANOS _____ %						RISCO EM 10 ANOS _____ %					

Framingham Point Scores- JAMA, v.286, p.180-187, 2001

2. Função Renal Estimada (Clearance de creatinina estimado pela fórmula de Cockcroft-Gault)
(140 – idade × peso(k) / 72 × creatinina sérica (mg%):

Clearance de creatinina estimado: _____ ml/plasma/minuto

XII. PLANO DE CUIDADOS

1. PREVENÇÃO

ESTRATÉGIAS DE PROMOÇÃO DA SAÚDE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS				
ATEROSCLEROSE	Categoria de risco: <input type="checkbox"/> Alto <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Baixo Risco de Framingham: /10 anos			
	Dislipidemia: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
	Anti-agregação plaquetária: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
IMUNIZAÇÃO	Anti-influenza	Anti-Pneumocócica	Dupla Tipo Adulto	Anti-Amarela
RASTREAMENTO DE CÂNCER	Colo-retal	Mama	Colo de útero	Próstata
PREVENÇÃO DE FRATURA	Cálcio / Vitamina D	Densitometria óssea	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
		Tratamento de osteoporose	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
ATIVIDADE FÍSICA	Indicação: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Especificar:			
	Tipo de Exercício: <input type="checkbox"/> Aeróbico <input type="checkbox"/> Resistido <input type="checkbox"/> Flexibilidade			
	Frequência:			
OUTRAS INTERVENÇÕES				

2. TRATAMENTO

3. REABILITAÇÃO

REABILITAÇÃO FÍSICA	Enfermagem
	Fisioterapia
	Terapia Ocupacional
	Fonoterapia
	Odontologia
REABILITAÇÃO AMBIENTAL	
REABILITAÇÃO NUTRICIONAL	
REABILITAÇÃO PSICO-SÓCIO-FAMILIAR	
Dispositivo de ajuda (ortese/prótese)	
Outra:	

Observações Finais:

