

Daniela Siqueira Veloso Starling

**Investigação de biomarcadores diagnósticos para a
doença de Alzheimer no líquido cefalorraquidiano, na
saliva e na mucosa oral.**

Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2012

Daniela Siqueira Veloso Starling

**Investigação de biomarcadores diagnósticos para a
doença de Alzheimer no líquido cefalorraquidiano, na
saliva e na mucosa oral.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, da Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção do título de Doutora em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Caramelli

Belo Horizonte
2012

Rio Caudaloso da História

A humanidade é formada por dois grupos de pessoas.

O primeiro grupo é daquelas que quando não tem uma opinião acerca de algo perguntam à pessoa mais próxima e, resignadas, adotam o que escutam como verdade.

*Esta maioria forma as águas do caudaloso rio da nossa história, seu legado é uma memória que dura até que também passem os seus filhos.
São felizes.*

O segundo grupo é formado por seres que têm alma inquieta e cultivam a dúvida como uma dádiva, que não suportam a ignorância e desconfiam das respostas vagas.

Purificam as informações recebidas e as conclusões tiradas em finos filtros da razão e da lógica, acrescentam ao conhecimento instilado uma porção de imaginação e concebem conceitos novos sobre velhos preceitos.

Essas pessoas formam as margens do rio da nossa história e determinam o quão longe alcança a humanidade.

Quem é só água feliz deste rio deve agradecê-los pela sua persistência e pela busca incessante do conhecimento que impulsiona e impede que o rio da história se transforme em uma grande lagoa de ignorância.

Trazem em si uma necessidade congênita da busca pela verdade e do entendimento das coisas além das percepções sensoriais, buscam enxergar com a alma o que com os olhos vê-se apenas fumaça.

Este é o trabalho dos poetas, sua maior recompensa é fazer da sua obra sua memória, sendo ambas tão eternas quanto o próprio rio da história que conduzem.

Feliz é quem passa...

Luiz Cássio Dias Lopes

*Dedico este trabalho ao meu esposo Luiz Fernando
e Maria Eduarda e Maria Clara, minhas adoráveis
filhas, que puderam entender que a minha ausência
era apenas passageira.*

*Obrigada pela compreensão, apoio, confiança e
amor ao longo desta caminhada. Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Caramelli, exemplo de pesquisador e pessoa, pela oportunidade de ser sua aluna e pelos seus ensinamentos que foram fundamentais para a execução deste trabalho. Além disto, por ser uma pessoa muito boa de coração.

À Profa. Lirlândia Pires de Sousa, por sua paciência em me ensinar uma, duas, três vezes os procedimentos realizados neste estudo. Obrigada também pela sua amizade.

Ao Prof. Mauro Martins Teixeira e aos colegas do laboratório de Imunologia, pela oportunidade de trabalhar e aprender as técnicas utilizadas em meu estudo.

Aos Profs Antônio Lúcio Teixeira Junior e Tarcília Aparecida da Silva pelo apoio e ensinamentos durante esta jornada.

Aos colegas do Departamento de Análises Clínicas e Farmacológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG, pelo companheirismo no final desta jornada.

À minha querida amiga Marina, que sempre esteve presente, me ajudando sempre que fosse possível, rindo e chorando ao meu lado. Esta tese tem uma grande participação sua.

A toda equipe de médicos e neuropsicólogas do Ambulatório de Neurologia Cognitiva do Hospital das Clínicas da UFMG por toda ajuda no esclarecimento de dúvidas sobre o diagnóstico de todos os pacientes, sempre que necessário.

Ao meu querido amigo Cássio, que sempre esteve presente e paciente, mesmo que a sua maneira, me dando apoio com atenção, quando algo acontecia e ainda por cima, com a parte de formatação do trabalho. Agora o “*muito obrigada*” oficial. Você foi a ponte nesta minha estrada.

Aos pacientes do Ambulatório Neurologia Cognitiva do Hospital das Clínicas da UFMG e seus familiares, por terem participado de nosso estudo de maneira espontânea e generosa.

À Flávia Komatzusaki, pelas análises estatísticas e a Prof. Maria das Graças da Faculdade de Farmácia pelo apoio.

À FAPEMIG, agência financiadora do projeto.

À minha mãe Teresinha e minha irmã Cristiana, que sempre tiveram orgulho de mim e da minha perseverança.

A toda minha família, agregados ou não, pelo apoio e pensamento positivo ao longo destes anos.

Aos amigos de durante semana, de fim de semana, por estarem sempre torcendo por mim.

Aos meus colegas e alunos da Faminas-BH, por sempre acreditarem na minha capacidade e no meu trabalho. Sempre me passando encorajamento e carinho.

À Deise, minha fiel ajudante, muito obrigada. Obrigada por cuidar tão bem das minhas filhas na minha ausência. Por dar a elas carinho, atenção quando elas precisavam de mim e eu não podia estar ao lado delas. Seu apoio durante este tempo foi crucial para que eu pudesse, principalmente, finalizar meu trabalho.

E principalmente a Deus, obrigada por me dar a oportunidade de realizar mais um de meus sonhos. Apesar de todos os tropeços, dificuldades, noite sem dormir, sempre me deu força, paciência, perseverança e não me deixou que me faltasse a fé.

RESUMO

O processo de envelhecimento populacional é um dos maiores triunfos da humanidade e também um dos nossos grandes desafios. No Brasil, o número de indivíduos idosos (65 anos de idade ou mais) passou de cerca de cinco milhões em 1980 para aproximadamente 10 milhões em 2000, sendo que em 2030 este número poderá atingir quase 30 milhões (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2008). Esses números alertam para a possibilidade de crescimento do número de pessoas acometidas pelas demências. Demência é uma síndrome clínica caracterizada por comprometimento cognitivo suficientemente intenso para produzir prejuízo funcional. A forma mais comum de demência em idosos é a doença de Alzheimer (DA). Vários estudos têm investigado biomarcadores que possibilitem diagnóstico da DA e de outras demências degenerativas em estágios ainda iniciais. Além do diagnóstico precoce, o emprego dos biomarcadores, como as proteínas beta-amiloide (β A-42), Tau-Total (Tau-T) e Tau fosforilada (P-Tau), traz novas informações a respeito dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas doenças, permite monitorar o curso clínico e contribui de modo significativo para o desenvolvimento de novas drogas e avaliação de sua eficácia e segurança. O objetivo de nosso trabalho foi investigar os níveis de proteínas Tau-T, P-tau e β A-42 no líquido cefalorraquidiano (LCR), saliva e mucosa oral de pacientes com DA (n=33), pacientes com demência não-DA (OD, n=22) e indivíduos controles saudáveis (CT, n=29), com o intuito de identificar biomarcadores adicionais para o diagnóstico da DA. Verificou-se que a expressão de proteína β A-42 no LCR do grupo DA estava significativamente aumentada quando comparada com o grupo CT. O mesmo perfil foi encontrado na saliva. Ao analisarmos a proteína Tau-T no LCR, verificamos que a mesma não apresentou diferença significativa quando comparamos o grupo DA com os grupos OD e CT. O mesmo foi observado nos resultados obtidos na saliva. Quanto à proteína P-Tau, observamos que os níveis foram significativamente elevados no grupo DA ao compararmos com o grupo OD, somente no LCR. Por meio do *Western blot* analisamos a expressão das proteínas Tau-T e P-Tau obtidas através das

células da mucosa oral. Tanto a Tau-T quanto a P-Tau apresentaram aumento significativos no grupo DA quando comparamos ao grupo CT. Os resultados obtidos sugerem que a dosagem da proteína β A na saliva e a análise da expressão das proteínas Tau-T e P-Tau na mucosa oral são biomarcadores diagnósticos promissores para a DA e que, portanto, merecem ser investigadas em estudos futuros.

ABSTRACT

Investigation of diagnostic biomarkers to Alzheimer's disease in cerebrospinal fluid, saliva and oral mucosa.

The population is getting older and this is one of the greatest triumphs of humanity and one of our greatest challenges. In Brazil, the number of elderly (65 years old or older) increased from about five million in 1980 to approximately 10 million in 2000, and in 2030 this number could reach nearly 30 million (Brazilian Institute of Geography and Statistics - IBGE, 2008). These numbers predict the possibility of increasing the number of people affected by dementia. Dementia is a clinical syndrome characterized by cognitive impairment sufficient to produce functional impairment. The most common form of dementia is Alzheimer's disease (AD). Several studies have investigated biomarkers in order to differentiate AD and other degenerative dementia in early stages. In addition in order to get an early diagnosis, the use of biomarkers such as proteins beta-amyloid (β A-42), Total-Tau (Tau-T) and phosphorylated tau (P-Tau), brings new information about the pathophysiological mechanisms involved in the disease, allows to monitor the clinical course and contributes significantly to the development of new drugs and evaluation of its efficacy and safety. The aim of our study was to investigate the levels of Tau-T, P-tau and β A-42 in cerebrospinal fluid (CSF), saliva and oral mucosa of patients with AD (n = 33), patients with non-AD dementia (OD, n = 22) and healthy control subjects (CT, n = 29), in order to identify additional biomarkers for the diagnosis of AD. It was observed that expression of β A-42 protein in CSF of AD group was significantly increased compared to CT group. The same profile was found in the saliva. Analyzing T-Tau protein in CSF, we found that it showed no significant values when comparing the AD group with the OD and CT groups. The same results were observed in the saliva. We observed that P-Tau, had levels significantly elevated in the AD group compared with the OD group, only in CSF. By *Western blot* analyzes the expression of the proteins Tau-T and P-Tau obtained by the oral mucosa. Both the T-Tau and P-Tau showed significant increase in the AD group when compared to the CT group. The results

suggest that β A protein determination in saliva and analysis of protein expression and P-T Tau-Tau in the oral mucosa are promising diagnostic biomarkers for AD and, therefore, deserve to be investigated in future studies.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Placas neuríticas descritas por Alois Alzheimer em 1906. Fonte: www.alzheimermed.com.br – acessado em 10/11/2010..... 3
- Figura 2** - Placas neuríticas descritas em 1914 em seu segundo paciente. Fonte: www.alzheimermed.com.br – acessado em 10/11/2010. 3
- Figura 3** - Atrofia cerebral na doença de Alzheimer, à direita em relação ao cérebro normal, à esquerda redução volumétrica do córtex e do hipocampo. Fonte: modificado www.rps.psu.edu/probing/alzheimers.html - acessado dia 25/06/2012 as 20:20h 8
- Figura 4** - Análise da Expressão da proteína Tau-T em amostras de células da mucosa oral. As células foram obtidas da mucosa oral dos três grupos estudados e submetidos à análise dos níveis de Tau-T por Western blot como descrito em Material e Métodos. (A) Autorradiografia representativa e (B) análise densitométrica da expressão de proteína Tau-T nos três grupos estudados: DA=doença de Alzheimer, OD = outras demências, CT = controles. Peso molecular da proteína – 65kDa. 64
- Figura 5** - Análise da Expressão da proteína P-Tau em amostras de células da mucosa oral. As células foram obtidas da mucosa oral dos três grupos estudados e submetidos à análise dos níveis de P-Tau por Western blot como descrito em Material e Métodos. (A) Autorradiografia representativa e (B) análise densitométrica da expressão de proteína P-Tau nos três grupos estudados: DA=doença de Alzheimer, OD = outras demências, CT = controles. Peso molecular da proteína – 65kDa. 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Elementos-chave dos critérios para doença de Alzheimer segundo o National Institute of Neurologic and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) NINCDS- ADRDA criteria. (Frota et al., 2011).....	8
Tabela 2 - Determinação e comparação das idades entre os pacientes dos grupos DA, OD e CT. Teste utilizado: Qui-Quadrado.	41
Tabela 3 - Médias e desvios-padrão obtidos a partir da variável idade entre os grupos: DA, OD e CT.....	42
Tabela 4 - Teste de comparação múltipla para a variável idade entre os grupos DA, OD e CT.....	43
Tabela 5 - Quadro com os valores de mediana, intervalo interquartil e valor p determinados entre os grupos DA, OD e CT com relação a variável escolaridade.	44
Tabela 6 - Valores da mediana, intervalo interquartil e valor p determinados entre os grupos DA, OD e CT com relação a variável MEEM..	46
Tabela 7 - Comparação entre os grupos estudados para determinar o valor p 46	
Tabela 8 - Valores da mediana, intervalo interquartil e valor p determinados entre os grupos DA, OD e CT com relação à variável β A no LCR.....	48
Tabela 9 - Comparação entre os grupos estudados para determinar o valor p 48	
Tabela 10 - Valores de mediana, intervalo interquartil e valor p determinados entre os grupos DA, OD e CT com relação à variável Tau-T no LCR.	50
Tabela 11 - Valores da mediana e intervalo interquartil obtidos a partir da análise da variável P-Tau, entre os grupos DA, OD e CT.....	51
Tabela 12 - Comparação entre os grupos para determinar o valor p Mann-Whitney com correção de Bonferroni com relação à variável P-Tau	52
Tabela 13 - Valores da mediana, intervalo interquartil e valor p com relação à variável β A na saliva nos grupos DA, OD e CT.	54
Tabela 14 - Comparação entre os grupos com relação à variável β A.	54
Tabela 15 - Valores de mediana, intervalo interquartil e valor p com relação a variável Tau-T nos grupos DA, OD e CT.	55

Tabela 16 – Quadro com os valores de mediana, intervalo interquartil e valor p com relação à variável P-Tau nos grupos DA, OD e CT.....	56
Tabela 17 - Quadro com os valores do coeficiente de relação (r) e valor p em relação a proteína β A presente no LCR e saliva ente os três grupos estudados.	57
Tabela 18 - Quadro com os valores do coeficiente de relação (r) e valor p em relação à proteína Tau-T presente no LCR e saliva ente os três grupos estudados.	57
Tabela 19 – Quadro com os valores do coeficiente de relação (r) e valor p em relação a proteína P-Tau presente no LCR e saliva ente os três grupos estudados.	57
Tabela 20 - Razão entre os três biomarcadores presentes no LCR nos grupos DA; OD e CT.....	58
Tabela 21 - Parâmetros utilizados para a determinação da curva ROC para o grupo DA <i>versus</i> CT no LCR	60
Tabela 22 - Parâmetros utilizados para a determinação da curva ROC para o grupo DA <i>versus</i> OD no LCR.....	61
Tabela 23 - Parâmetros utilizados para a determinação da curva ROC para o grupo DA <i>versus</i> CT na saliva	62
Tabela 24 - Parâmetros utilizados para a determinação da curva ROC para o grupo DA <i>versus</i> OD na saliva.....	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico demonstrativo da distribuição de idade entre os três grupos: DA, OD e CT.....	42
Gráfico 2 - Gráfico demonstrativo da distribuição da escolaridade entre os grupos: DA, OD e CT.....	44
Gráfico 3 - Gráfico demonstrando valores do MEEM existente entre os grupos: DA, OD e CT.....	45
Gráfico 4 - Concentração de β A no LCR em pg/ μ l entre os grupos DA, OD e CT.....	47
Gráfico 5 - Gráfico comparativo da expressão de Tau-T no LCR em pg/ μ l entre os grupos DA, OD e CT	49
Gráfico 6 - Gráfico comparativo da expressão de P-Tau no LCR em pg/ μ l entre os grupos DA, OD e CT	51
Gráfico 7 - Concentração de β A na saliva em pg/ μ l entre os grupos DA, OD e CT.....	53
Gráfico 8 - Gráfico comparativo da expressão de Tau-T na saliva em pg/ μ l entre os grupos DA, OD e CT.....	55
Gráfico 9 - Determinação da sensibilidade e especificidade dos três biomarcadores estudados no LCR (Tau-T, P-Tau e β A) nos grupos DA <i>versus</i> CT.	59
Gráfico 10 - Determinação da sensibilidade e especificidade dos três biomarcadores estudados (Tau-T, P-Tau e β A) nos grupos DA <i>versus</i> OD.	60
Gráfico 11 - Determinação da sensibilidade e especificidade dos três biomarcadores estudados (Tau-T, P-Tau e β A) nos grupos DA <i>versus</i> CT.	61
Gráfico 12 - Determinação da sensibilidade e especificidade dos três biomarcadores estudados (Tau-T, P-Tau e β A) nos grupos DA <i>versus</i> OD.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACHÉ	Acetilcolinesterase
APP	Proteína Precursora do Amiloide
AVDs	Atividades de Vida Diária
CCL	Comprometimento Cognitivo Leve
CID	Classificação Internacional de Doenças
	Comitê de Ética em Pesquisa em Pesquisa da Universidade Federal de
COEP/UFMG	Minas Gerais
CT	Controle
DA	Doença de Alzheimer
DCL	Demência com corpos de Lewy
DDP	Demência associada à doença Parkinsoriana
DFT	Doença Frontotemporal
DLET	Degeneração Lobar Frontotemporal
DP	Doença de Parkinson
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais
DTT	Ditiotreitól
DV	Demência Vascular
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EEG	Eletroencefalograma
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ENF	Emaranhados Neurofibrilares
FAST	<i>Functional Assessment Staging</i>
	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade
HC-UFMG	Federal de Minas Gerais
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
MAP	Proteína Associada a Microtúbulos
MEEM	Mini-Exame de Estado Mental
NIA	<i>National Institute of Aging</i>
NINCDS-ADRDA	<i>National Institute of Neurologic and Communicative Disorders and</i>

Stroke and the Alzheimer Disease and Related Disorders Association

OD	Outras Demências
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PET	Tomografia por Emissão de Prótons
PHFs	Filamentos Helicoidais Pareados
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
P-Tau	Proteína Tau hiperfosforilada
RPM	Rotações por Minuto
ROC	<i>Receiver Operating Characteristics</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
Tau-T	Proteína Tau Total
TC	Tomografia Computadorizada
β A	Proteína beta amiloide
β A-42	Proteína beta amiloide com cadeia de 42 aminoácidos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	DOENÇA DE ALZHEIMER.....	2
1.2	FATORES DE RISCO.....	5
1.3	GENÉTICA DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	5
1.4	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	6
1.5	DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	8
1.6	PATOGÊNESE DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	11
1.6.1	PLACAS NEURÍTICAS E A PROTEÍNA β A.....	11
1.6.2	EMARANHADOS NEUROFIBRILARES.....	14
1.6.2.1	PROTEÍNA TAU.....	15
1.6.2.2	TAU NO LCR.....	17
1.6.2.3	PROTEINA TAU NA MUCOSA ORAL.....	27
2	JUSTIFICATIVA.....	28
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	GERAL.....	29
3.2	ESPECÍFICOS.....	29
4	POPULAÇÃO E MÉTODOS.....	30
4.1	POPULAÇÃO.....	30
4.2	COLETA E PROCESSAMENTO DE MATERIAL.....	32
4.2.1	CÉLULAS DA MUCOSA.....	32
4.2.1.1	COLETA.....	32
4.2.1.2	PROCESSAMENTO.....	32
4.2.1.3	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TAU EM CÉLULAS EPITELIAIS DA MUCOSA BUCAL PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOT.....	32
4.2.1.4	EXTRATOS PROTÉICOS CELULARES.....	33
4.2.1.5	FRACIONAMENTO ELETROFORÉTICO E TRANSFERÊNCIA DAS PROTEÍNAS TOTAIS.....	33
4.2.1.5.1	REAÇÃO COM ANTICORPOS E REVELAÇÃO.....	34
4.3	SALIVA.....	35
4.3.1.1	COLETA.....	35
4.3.1.2	PROCESSAMENTO.....	35
4.4	LCR.....	36

4.4.1	COLETA	36
4.4.1.1	PROCESSAMENTO DO MATERIAL	36
4.4.1.2	ANÁLISE DO LCR.....	36
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4.6	ASPECTOS LEGAIS DE BIOÉTICA	39
5	RESULTADOS	41
5.1	ANÁLISE DOS GRUPOS DE ACORDO COM OS DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS.	41
5.1.1	GÊNERO.....	41
5.1.2	IDADE.....	42
5.1.3	ESCOLARIDADE	44
5.2	ANÁLISE DOS BIOMARCADORES PRESENTES NO LCR	47
5.2.1	β A no LCR.....	47
5.2.2	TAU-T NO LCR	49
5.2.3	P-TAU NO LCR	51
5.3	ANÁLISE DOS BIOMARCADORES PRESENTES NA SALIVA.....	53
5.3.1	β A NA SALIVA.....	53
5.3.2	TAU-T NA SALIVA	55
5.3.3	P-TAU NA SALIVA	56
5.4	CORRELAÇÃO ENTRE RESULTADOS OBTIDOS NO LCR E SALIVA	57
5.5	RAZÃO ENTRE OS TRÊS BIOMARCADORES NO LCR	58
5.6	ANÁLISE DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE.....	59
5.7	ANÁLISE DOS RESULTADOS OBTIDOS NO WESTERN BLOT.....	64
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÕES.....	73
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
9	ANEXOS.....	90
9.1	ANEXO 1.....	90
9.2	ANEXO 2.....	92
9.3	ANEXO 3.....	93

1 INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento populacional é um dos maiores triunfos da humanidade e também um dos nossos grandes desafios. Segundo o *National Institute on Aging* (NIA) dos Estados Unidos da América, em 2006 havia quase 500 milhões de pessoas no mundo com 65 anos de idade ou mais, e estima-se que até 2030 este número chegue a um bilhão de pessoas, representando um em cada oito habitantes (NIA, 2007). Este fenômeno foi observado inicialmente em países desenvolvidos; entretanto, mais recentemente, o envelhecimento da população tem ocorrido de forma mais acentuada nos países em desenvolvimento.

No Brasil, o número de indivíduos idosos (65 anos de idade ou mais) passou de cerca de cinco milhões em 1980 para aproximadamente 10 milhões em 2000, sendo que em 2030 este número poderá atingir quase 30 milhões (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2008). Em países como a França, por exemplo, foi necessário mais de um século para que a população idosa dobrasse de tamanho (NIA, 2007). Estes números são o reflexo de avanços médicos, sociais e econômicos, que resultaram em aumento expressivo da expectativa de vida da população. Contudo, eles também alertam para a possibilidade de crescimento do número de pessoas acometidas pelas demências.

Demência é uma síndrome clínica caracterizada por comprometimento cognitivo suficientemente intenso para produzir prejuízo funcional (Van Harten et al., 2011). A forma mais comum de demência em idosos é a doença de Alzheimer (DA), seguida pela demência vascular (DV) (Nitrini et al., 2009). Outras demências degenerativas que também podem ocorrer nesta faixa etária, embora com prevalência menor, é a demência com corpos de Lewy (DCL), a demência associada à doença de Parkinson (DDP) e a degeneração lobar frontotemporal (DLFT).

Estima-se que a prevalência global de pessoas com demência dobrará a cada 20 anos, durante a primeira metade deste século, aumentando de aproximadamente 35 milhões de casos em 2010 para quase 150 milhões em 2050 (*World Alzheimer Report*, 2009). Essa situação merece atenção e vários

esforços estão sendo realizados ao redor do mundo com o objetivo de diminuir o impacto destas condições no futuro.

Vários estudos têm investigado biomarcadores que possibilitem o diagnóstico da DA e de outras demências degenerativas em estágios ainda iniciais. Além do diagnóstico precoce, o emprego dos biomarcadores traz novas informações a respeito dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas doenças, permite monitorar o curso clínico e contribui de modo significativo para o desenvolvimento de novas drogas e avaliação de sua eficácia e segurança (Mattsson, 2011).

1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA foi descrita inicialmente pelo psiquiatra alemão Alois Alzheimer em 1906, durante o 37º congresso da Sociedade de Psiquiatras do Sudoeste Alemão, na cidade de Tübingen. Naquela ocasião, Alzheimer relatou o caso de Auguste D., uma paciente de 51 anos de idade que apresentava perda progressiva da memória, desorientação, alterações de comportamento e deterioração da linguagem. A paciente faleceu quatro anos e meio após a internação. Alzheimer descreveu ainda os aspectos anatomopatológicos da doença, sendo as principais características a perda neuronal e o acúmulo de placas senis e de emaranhados neurofibrilares (ENF) (Selkoe, 2001; Goedert e Spillantini, 2006), como observado nas Figuras 1 e 2. Em 1910, na oitava edição do *“Handbook of Psychiatry”*, Emil Kraepelin, após estudar casos semelhantes, propôs o nome de doença de Alzheimer em homenagem ao seu descobridor (Maurer et al., 1997, Moller e Graeber, 1998).

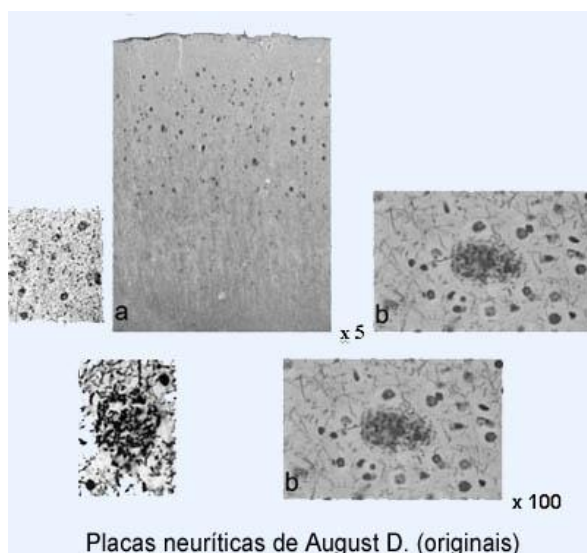
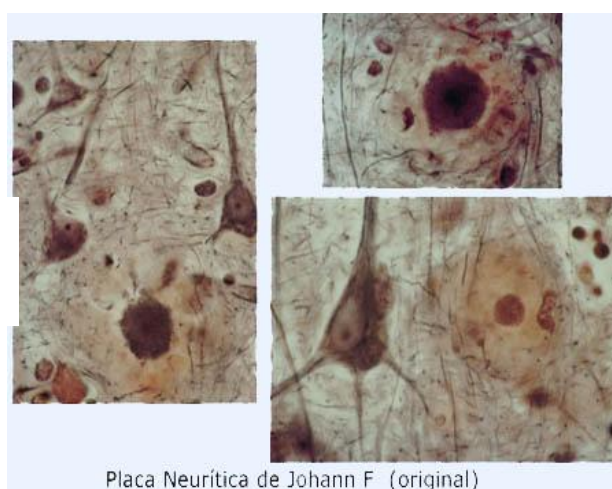


Figura 1 - Placas neuríticas descritas por Alois Alzheimer em 1906. Fonte: www.alzheimermed.com.br – acessado em 10/11/2010.

Figura 2 - Placas neuríticas descritas em 1914 em seu segundo paciente. Fonte: www.alzheimermed.com.br – acessado em 10/11/2010.



O termo “doença de Alzheimer” foi originalmente reservado para indivíduos que começavam a apresentar sintomas no período pré-senil, enquanto que a expressão demência senil era utilizada quando o início dos sintomas se dava a partir dos 65 anos de idade. No final da década de 60 do século passado, Blessed, Tomlinson e Roth publicaram importantes estudos demonstrando que os achados anatomopatológicos característicos da então denominada DA também estavam presentes em indivíduos com demência senil, representando assim uma única entidade patológica, e estabelecendo a DA como a principal causa de demência no período senil (Blessed et al., 1968; Tomlinson et al., 1970).

Estima-se que a doença represente entre 50 a 60% de todos os casos de demência no mundo (Blennow et al., 2006). Estudos mostram que na América Latina, a demência já é considerada um problema de saúde pública,

com prevalência semelhante à registrada nos países desenvolvidos (Nitrini et al., 2009). Neste mesmo estudo, observou-se que a prevalência de demência em idosos mais jovens (65 a 69 anos) é significativamente maior em comparação à prevalência nesta mesma faixa etária em países desenvolvidos.

A prevalência da DA apresenta aumento exponencial entre indivíduos idosos, passando de 1% aos 65 anos para aproximadamente 40–50% aos 95 anos de idade (Wang & Ding, 2008). A prevalência global da doença é estimada em 3,9% na faixa etária igual ou superior a 60 anos, com variação importante entre os continentes, de 1,6% na África a 6,4% na América do Norte (Lopes & Bottino, 2002). Na América Latina a taxa de prevalência de demência é de 7,1% e no Brasil varia entre 6,0% a 7,1%, sendo que a DA é o diagnóstico mais frequente entre as demências (Herrera et al., 2002). A incidência mundial anual é estimada em 7,5 casos para cada 1000 habitantes idosos (idade ≥ 60anos) (Herrera et al., 2002; Lopes et al., 2005; Qiu et al., 2007; Bottino et al., 2008; Nitrini et al., 2009). Dessa forma, como resultado de mudanças demográficas e do aumento da expectativa de vida, espera-se que o número de indivíduos afetados pela DA cresça ao longo das próximas décadas, passando dos atuais 27 milhões para cerca de 107 milhões no ano de 2050, o que demonstra a relevância clínica, social e econômica da doença (Mount e Downton, 2006; Brookmeyer et al., 2007).

Para a saúde pública, o custo do cuidado de pacientes nessa situação é elevado. Com isto, custos sociais, incluindo tanto os custos diretos e indiretos, são estimados em aproximadamente em \$100 bilhões de dólares anualmente nos Estados Unidos da América (Zhu & Sano, 2006). Neste país, a prevalência foi estimada em 5,3 milhões em 2010 e em até 2050 este número poderá atingir 14 milhões de pessoas (Biagioni & Galvin, 2011). Levando em consideração o fato de que a idade avançada é o principal fator de risco para a DA, a doença em breve poderá acarretar uma crise na saúde pública mundial. Portanto, esforços devem ser dirigidos para a busca de novas formas de tratamento e também de prevenção.

1.2 FATORES DE RISCO

O envelhecimento é o principal fator de risco relacionado à doença, sendo que 90% dos indivíduos diagnosticados estão na faixa etária senil e, como já descrito, a prevalência dobra a cada cinco anos após os 65 anos (Evans et al., 1989; Stozická et al., 2007).

Além do envelhecimento, que constitui o principal fator de risco relacionado à doença, outros fatores têm sido sugeridos com base em estudos epidemiológicos. Dentre estes, destacam-se baixa escolaridade, sedentarismo, traumatismo craniano, sexo feminino, depressão, hipercolesterolemia, hipertensão, aterosclerose, doença cardíaca coronariana, obesidade, diabetes, fumo e fatores genéticos (Ritchie e Lovestone, 2002; Mayeux, 2003; Gorelick, 2004).

O sedentarismo é um fator de risco adicional. Estudos recentes vêm associando a prática de exercícios físicos à maior plasticidade sináptica e, conseqüentemente, à menor incidência e atraso na idade de aparecimento de demência em idosos que o praticam (Laurin et al., 2001; Larson et al., 2006). De acordo com Wang et al. (2006), indivíduos que não praticam atividades físicas têm maior risco de desenvolver DA no futuro. Com relação ao gênero, Lindsay & Anderson (2004) afirmam que a doença afeta mais as mulheres do que os homens. No entanto, isto pode ser um viés, devido à maior sobrevivência das mulheres.

1.3 GENÉTICA DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Do ponto de vista genético, a DA apresenta caráter heterogêneo, com as formas familiar e esporádica descritas (Smith, 1999; Truzzi & Laks, 2005). A forma familiar da doença tem herança autossômica dominante e o início dos sintomas clínicos geralmente se dá antes dos 65 anos de idade, sendo considerada a forma mais rara, representando menos de 5% do total de casos (Ertekin-Taner, 2007).

Uma relação direta tem sido estabelecida entre a DA familiar e a ocorrência de mutações em genes localizados nos cromossomos 21 (gene codificador da proteína precursora amiloide (APP), 14 (gene da presenilina 1 – PS1) e 1 (gene da presenilina 2 – PS2), enquanto interações complexas entre diferentes variantes genéticas e fatores ambientais parecem modular o risco para a grande maioria dos casos de DA esporádica ou de início tardio (Kennedy et al., 2003; Pastor e Goate, 2004; Lambert e Amouyel, 2007). Dentre os fatores genéticos, a presença de polimorfismo do gene que codifica a apolipoproteína E, alelo $\epsilon 4$ (presente no cromossomo 19), tem sido descrita como o principal fator de risco para a forma esporádica da doença, embora não se descarte a relevância do polimorfismo de outros genes, como os localizados nos cromossomos 12 (codificador da proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade) e 10 (gene *CALHM1*, codificador de um componente de um canal de cálcio cerebral) (Corder et al., 1993; Strittmatter et al. 1993; Kang et al., 1997; Dreses-Werringloer et al., 2008).

1.4 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA é caracterizada por sua progressão ao longo do tempo. Os sintomas se instalam de forma insidiosa. A principal característica nos estágios iniciais é o déficit de memória episódica para eventos recentes, o que ajuda a distinguir a DA de outras condições neurodegenerativas. Pode ser observada ainda redução da linguagem espontânea, pela dificuldade de nomeação, especialmente de palavras de uso menos frequente. Apresentam ainda certa desorientação de espaço e de tempo. Pode ser observado também comprometimento das funções executivas (julgamento, *insights*, planejamento e abstração) e dificuldade para fazer cálculos (Caramelli e Carvalho, 2011).

À medida que a doença vai progredindo, o comprometimento funcional vai se tornando mais evidente, como, por exemplo, como preparar um almoço ou controlar o movimento da conta bancária, ou ainda, para tomar medicamentos de forma autônoma.

Alterações comportamentais como apatia, irritabilidade, instabilidade emocional, ataques inesperados de agressividade e alucinações são manifestações observadas especialmente nos estágios moderado a avançado da doença (Tatsch et al., 2006).

Em estágios mais avançados há comprometimento de múltiplos domínios cognitivos, como linguagem, habilidades visuais-espaciais, e também da função motora (Teri et al., 1989; Clark, 2000; Petrella et al., 2003; Walsh e Selkoe, 2004). Os pacientes podem não conseguir desempenhar as atividades de vida diária (AVDs) básicas sem ajuda, como higiene pessoal e autocuidado. Ocorre ainda, incapacidade de reconhecer membros da família, disfagia, incontinência fecal e urinária e, eventualmente, mioclonias. Este estágio é seguido pelo término da vida, causado não pela DA, mas por outro fator externo como pneumonia aspirativa, infecção do trato urinário com sepse ou doenças cardiovasculares. A sobrevida média dos pacientes após o diagnóstico inicial é de 7 a 15 anos, podendo chegar a 20 anos (Walsh et al., 1990; Caramelli e Carvalho, 2011).

Do ponto de vista neuropatológico, a DA é caracterizada por atrofia cortical difusa, perda massiva de células neuronais e sinapses (Figura 3), pela presença de áreas com degenerações grânulo-vacuolares e um grande número de placas amiloides e ENFs (Mirra et al., 1991; Dickson, 1997; Markesbery, 1997; Braak et al., 1998; Iwatsubo, 2000). Os ENFs e as placas amiloides (também denominadas placas neuríticas) são frequentemente observados em tecidos cerebrais de idosos cognitivamente saudáveis, mas em menor quantidade e com distribuição menos extensa quando comparado com o tecido cerebral dos indivíduos com DA. Acredita-se que a concentração das placas neuríticas esteja correlacionada ao grau de demência nos pacientes acometidos (Hardy e Higgins, 1992; Caramelli et al., 1998; Haass e Selkoe, 2007; Clark et al., 2008; Demarin et al. 2011), embora seja observada também correlação entre a densidade de emaranhados com o quadro clínico (Arriagada et al., 1991).

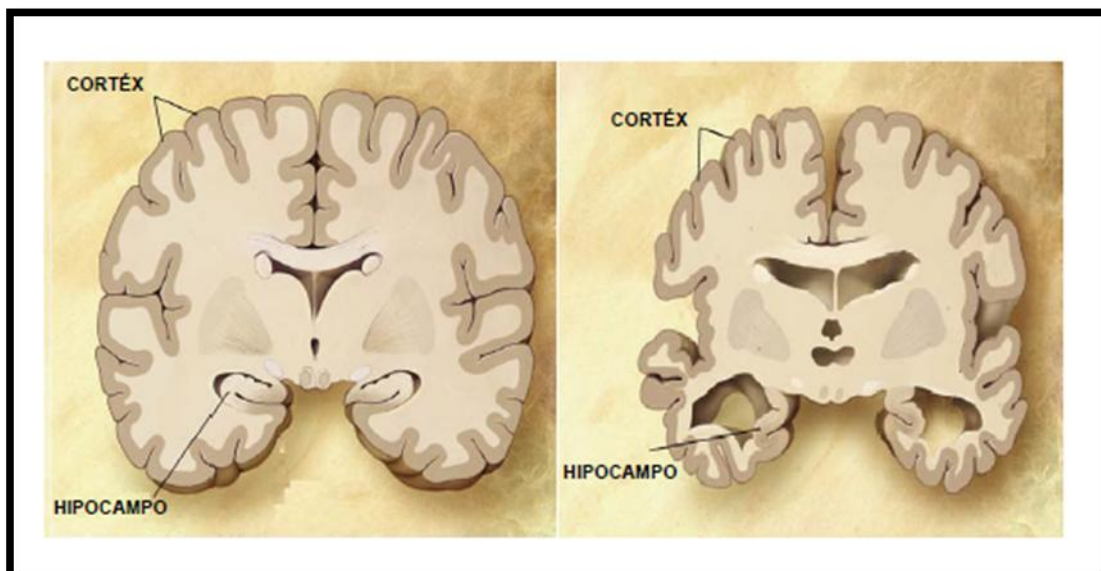


Figura 3 Atrofia cerebral na doença de Alzheimer, à direita em relação ao cérebro normal, à esquerda redução volumétrica do córtex e do hipocampo. Fonte: modificado www.rps.psu.edu/probing/alzheimers.html - acessado dia 25/06/2012 as 20:20h

1.5 DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

De acordo com McKhann et al., 2011 (Tabela 1), os critérios para a DA foram revisados, uma vez que os conhecimentos das manifestações clínicas e a biologia da doença aumentaram consideravelmente, nos últimos 27 anos.

Tabela 1 Elementos-chave dos critérios para doença de Alzheimer segundo o National Institute of Neurologic and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) NINCDS- ADRDA criteria. (Frota et al., 2011)

1. DIAGNÓSTICO DE DA PROVÁVEL

- 1.1 Início insidioso (meses ou anos).
- 1.2 Historia clara ou observação de piora cognitiva.
- 1.3 Déficits cognitivos iniciais e mais proeminentes em uma das seguintes categorias:
 - a) Apresentação amnésica (deve haver outro domínio afetado).
 - b) Apresentação não-amnésica (deve haver outro domínio afetado).
 - i) Linguagem (lembranças de palavras).
 - ii) Visual-espacial (cognição espacial, agnosia para objetos os faces, simultaneognosia, e alexia).
 - iii) Funções executivas (alteraçãodo raciocínio, julgamento e solução de problemas).
- 1.4 Tomografia, ou preferencialmente ressonância magnética do crânio deve ser realizada para excluir outras possibilidades diagnósticas ou co-morbidades, principalmente a doença vascular cerebra.
- 1.5 O diagnóstico da demência da DA provável não deve ser aplicado quando houver:
 - a) Evidência de doença cerebrovascular importante definida por história de AVC temporalmente relacionada ao início ou piora do comprometimento cognitivo; ou

- presença de infarto múltiplos ou extensos; ou lesões acentuadas na substância branca evidenciadas por exame de neuroimagem; ou
- b) Características centrais de demência com corpos de Lewy (alucinações visuais, parkinsonismo e flutuação cognitiva); ou
 - c) Características proeminentes da variante comportamental da Demência Frontotemporal – DFT (hiperoralidade, hipersexualidade, perseveração); ou
 - d) Características proeminentes de afasia progressiva primária manifestando-se como a variante semântica (também chamada demência semântica, com discurso fluente, anomia e dificuldades de memória semântica) ou como a variante não fluente, com agramatismo importante; ou
 - e) Evidência de outra doença concomitante e ativa, neurológica ou não-neurológica, ou de uso de medicação que pode ter efeito substancial sobre a cognição.

Os seguintes itens, quando presentes, aumentam o grau de confiabilidade do diagnóstico clínico da demência da DA provável:

- a) Evidência de declínio cognitivo progressivo, constatado em avaliações sucessivas;
- b) Comprovação da presença de mutação genética causadora de DA (genes da APP e preselininas 1 e 2);
- c) Positividade de biomarcadores que reflitam o processo patogênico da DA (marcadores moleculares através de PET ou LCR; ou neuroimagem estrutural e funcional).

A ocorrência de item a confirma a existência de um mecanismo degenerativo, apesar de não ser específico da DA.

2. DIAGNÓSTICO DE DA POSSÍVEL

O diagnóstico da demência da DA possível deve ser feito quando o paciente preenche os critérios diagnósticos clínicos para a demência da DA, porém apresenta algumas das circunstâncias abaixo:

2.1 Curso atípico: início abrupto e/ou padrão evolutivo distinto daquele observado usualmente, isto é, lentamente progressivo.

2.2 Apresentação mista: tem evidência de outras etiologias (doença cerebrovascular concomitante; características de demência com corpos de Lewy; outra doença neurológica ou uma co-morbidade não-neurológica ou uso de medicação as quais possam ter efeito substancial sobre a cognição).

2.3 Detalhes de história insuficientes sobre a instalação e evolução da doença.

3. DIAGNÓSTICO DE DA DEFINIDA

Preenche critérios clínicos e cognitivos para demência de DA e exame neuropatológico demonstra a presença de patologia da DA segundo os critérios da *NIA* e do *Reagan Institute Working Group*.

A precisão do diagnóstico clínico da DA depende do estágio da doença e pode ultrapassar 90% em ambientes acadêmicos, especialmente nas fases intermediárias e avançadas. Critérios diagnósticos para a DA já foram propostos, tanto no sistema de classificação do DSM (Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais) quanto na CID (Classificação Internacional de Doenças). Contudo, os critérios seguidos na maioria dos estudos são os propostos pelo NINCDS-ADRDA de 1984 e substituídos pelos critérios do NIA

e da *Alzheimer's Association* para definição de DA provável (McKhann et al., 2011).

Um período prodrômico variável de até cinco anos de declínio cognitivo caracteriza-se por disfunção relativamente isolada da memória de longo prazo que pode também ser acompanhada por déficits de memória operacional, conhecido como comprometimento cognitivo leve (CCL), que geralmente precede o diagnóstico formal de DA (Small et al., 2007). Estes déficits presumivelmente estão relacionados a danos no lobo temporal medial ou em circuitos específicos pré-frontais. Cerca de 10 a 15% dos indivíduos com este diagnóstico evoluem posteriormente para DA, satisfazendo todos os critérios, num período de um ano (Petersen et al., 2001).

Há mais de uma década vários trabalhos vêm sendo publicados indicando a importância do diagnóstico clínico precoce. Várias pesquisas confirmam o papel da proteína beta-amiloide (β A) como potencial biomarcador para a DA. Do mesmo modo, é reconhecida a importância da proteína Tau como biomarcador desta doença, inclusive em suas fases iniciais (Blennow & Zetterberg, 2009; Demarin et al., 2011; Mattsson, 2011).

O diagnóstico definitivo da DA se caracteriza pelo achado histopatológico de deposição de placas neuríticas no neurópilo, na microvasculatura do córtex superficial e leptomeninges de praticamente todos os pacientes, bem como pelo acúmulo de ENFs nos corpos celulares dos neurônios (Selkoe, 1989; Maliash et al., 1993; Braak & Braak, 1996). Este processo degenerativo acomete principalmente a formação hipocampal e as áreas corticais associativas (Braak & Braak, 1996; Caramelli et al., 1998; Geula, 1998).

Portanto, com o objetivo de encontrar um modelo diagnóstico preciso, específico e precoce para a DA, as pesquisas vêm reforçando o estudo de biomarcadores que possibilitem a detecção precoce e também diferenciar a DA de outras formas de demência.

1.6 PATOGÊNESE DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Placas extracelulares, compostas principalmente de proteínas β A e inclusões intraneuronais de proteína Tau hiperfosforilada (P-Tau) são as características patológicas da DA. A exata via pelas quais estas proteínas se acumulam e interagem, e como elas se relacionam com as características clínicas da DA, continuam sendo objeto de intensa investigação.

1.6.1 PLACAS NEURÍTICAS E A PROTEÍNA β A

A APP é uma proteína transmembrana cuja função normal é ainda desconhecida e que pode ser clivada por três diferentes enzimas α , β e γ -secretases. Normalmente, a maioria das transformações da APP ocorre pela clivagem sequencial da α e γ -secretases, levando à produção de produtos não amiloidogênicos da proteína. Com base em evidências obtidas a partir de casos de DA familiar, a hipótese da cascata amiloide proposta há mais de uma década sugere que a clivagem sequencial da APP por β e γ -secretases leva à superprodução de proteína β A-40 e β A-42, peptídeos com 40 e 42 aminoácidos, respectivamente, sendo a β A-42 a isoforma mais longa da β A (Demarin, 2011). Estes peptídeos, especialmente β A-42, são neurotóxicos, e seu acúmulo resulta na formação de fibras amiloides e posterior acúmulo, formando as placas senis (Geula et al., 1998; Parihar & Hemnani, 2004).

As placas neuríticas são estruturas extracelulares corticais, formadas de um núcleo de peptídeo β A, circundado por áreas de gliose, contendo sinapses em degeneração. Sua densidade é maior no córtex hipocampal e no córtex têmporo-parietal posterior. Também são abundantes no córtex frontal, no córtex entorrinal e em outras áreas do sistema límbico, como a amígdala, e no núcleo basal de Meynert. O peptídeo β A também se deposita nas meninges e nos vasos cerebrais, sendo isso causa importante de hemorragias cerebrais (Verbeek et al., 2003).

A β A-42 é o principal peptídeo envolvido na formação das placas neuríticas, processo que ocorre em duas etapas: (i) formação de um núcleo de agregados de fibrilas de β A-42; (ii) deposição, a longo prazo, de novas fibrilas

de β A sobre este núcleo, causando uma reação astrocitária e microglial ao seu redor. Esse processo é iniciado provavelmente pelo aumento da produção de β A-42 no córtex cerebral (Andreasen et al., 1999). Ele pode formar placas difusas, também encontradas na DA, e que, ao contrário das anteriores, são compostas por β A em forma não filamentosa e não possuem áreas de gliose e sinapses em degeneração ao seu redor. Este acúmulo é especialmente do fragmento com 42 aminoácidos, que se deposita no espaço extracelular, inicialmente sobre a forma de oligômeros solúveis de amiloide e, posteriormente, de placas difusas que contêm formas insolúveis do peptídeo. Os oligômeros têm efeito neurotóxico e promovem uma cascata de eventos (inclusive com a participação de mediadores inflamatórios) que culminam na formação das placas neuríticas. Estas representam lesões maduras, em que densos depósitos do peptídeo β A acumulam-se na região central da placa circundada por terminações nervosas (axônios e dendritos) degeneradas (Caramelli e Carvalho, 2011).

A atividade da β -secretase tem origem a partir da proteína integral de membrana, a aspartil, codificada pela β -secretase 1 (BACE1). Em contraste, a γ -secretase é um complexo de membrana integral composto de pelo menos quatro subunidades essenciais com presenilina (PS1 e PS2). Estudos em amostras obtidas *post-mortem* mostram que existe relação inversa entre a concentração de proteína β A-42 no LCR e o número de placas amiloides (Andreasen et al., 1999; Blennow et al., 1995; Vigo-Pelfrey et al., 1995; Motter et al., 1995; Galasko et al., 1998). Paralelamente, o exame de tomografia por emissão de prótons (PET) com marcador de amiloide (por exemplo, o composto Pittsburg B) apresenta concordância de quase 100% dos resultados quando comparado aos resultados obtidos no LCR (Demarin et al., 2011). Estudos clínicos com 20.000 pacientes com demência e controles mostraram uma redução de 50% de β A-42 presente no LCR de pacientes com DA, comparados com controles saudáveis, sendo que a sensibilidade diagnóstica e especificidade variaram entre 80% e 90% (Sjögren et al., 2001; Fagan et al., 2006). Comparado com outros tipos de demência, no entanto, a especificidade é de apenas 60% (Demarin et al., 2011). β - e γ -secretases são os alvos principais para o desenvolvimento de terapêuticas para a DA, tendo o foco na inibição da produção e agregação de β A, assim como o aumento de *clearence*

da β A no cérebro (β A40 é a isoforma mais abundante e β A-42 a mais propícia à agregação). Várias drogas candidatas ao tratamento da doença, incluindo inibidores de β - e γ -secretases, bem como imunoterapia β A estão sendo avaliados em ensaios clínicos (Bateman et al., 2007).

É provável que estes fatores atuem todos sinergicamente, levando à degeneração neuronal e diminuição da concentração de sinapses nas áreas em que este peptídeo se deposita. A densidade das placas neuríticas e a concentração de β A (dos dois tipos) no córtex cerebral não eram reconhecidos como fatores importantes na correlação entre a gravidade clínica da DA e os achados neuropatológicos desta doença. Porém, foi demonstrado que o aumento destes dois fatores está fortemente relacionado à gravidade dos sintomas da doença: mesmo naqueles indivíduos com DA ainda questionável, os níveis de β A-40 e β A-42 já se encontram aumentados em relação a idosos não dementes e estes níveis continuavam a se elevar, significativamente, com o avançar da doença (Andreasen et al, 1999; Andreasen et al., 2003). Estes achados indicam que a presença do β A no córtex cerebral constitui fator fundamental na etiopatogenia da doença. No entanto, é importante salientar que as placas neuríticas não são específicas da DA, sendo encontradas também no cérebro de idosos saudáveis, embora em menor densidade (Katzman, et al., 1988; Harman, 1996).

Além do depósito da proteína β A no cérebro, ela também é encontrada em regiões periféricas, incluindo pele (Gasparini et al. 1998), mucosa nasal (Attems et al. 2005), glândulas lacrimais (Frederiksen et al., 1996) e salivares (Fukuchi et al., 2000). O uso de biópsia de glândulas salivares humanas tem sido descrito como ferramenta na pesquisa de DA (Oh & Turner, 2006), pois tanto APP quanto proteína β A são expressas nas células epiteliais salivares humanas. A saliva é produzida pelas glândulas salivares e membranas mucosas e por ser um fluido biológico, é simples de ser obtida. Ainda, níveis salivares podem refletir em alterações no LCR (Scheber et al., 1980; Bermejo-Pareja et al., 2010). Estudo recente demonstrou uma associação entre atividade e níveis de acetilcolinesterase (AChE) salivar e o diagnóstico de DA (Sayer et al., 2004). Esses achados podem indicar que a saliva seja um

marcador útil da atividade colinérgica central, elemento chave da bioquímica da DA (Bermejo-Pareja et al., 2010).

Com relação a presença de proteína β A na mucosa oral, não foi verificado nenhum estudo que pudesse comprovar a presença desta proteína neste material.

1.6.2 EMARANHADOS NEUROFIBRILARES

Os ENFs são estruturas intraneuronais compostas de filamentos helicoidais pareados (PHFs), formados pelas proteínas P-Tau e ubiquitina. A Tau é uma proteína associada à microtúbulos (MAP) e está envolvida na associação e na estabilização destes no interior de neurônios (Lindwall & Cole, 1984; Goedert et al., 1991), sendo que a estabilidade depende do estado de fosforilação da proteína (Kapaki et al., 2003). Sua fosforilação anormal é um dos eventos que geram as lesões neurofibrilares, com alterações no metabolismo neuronal e, conseqüentemente, sua degeneração. Os ENFs são encontrados principalmente no córtex entorrinal e no hipocampo, desde o início da DA. Não se sabe se sua formação precede ou decorre da deposição de β A. Estudos sugerem que ENFs se desenvolvem em resposta à deposição de β A no córtex frontal de indivíduos com demência, secundariamente aos efeitos tóxicos deste peptídeo (Andreasen et al., 1999). Devido ao aumento de β A solúvel mesmo sem a formação de placas neuríticas nas fases iniciais da DA e aos seus efeitos neurotóxicos em sua forma solúvel, é possível que a formação de ENF seja secundária ao aumento de β A na DA, mesmo em outras regiões do córtex frontal (Kuperstein et al., 2010).

Os ENFs não são específicos da DA, sendo encontrados também na panencefalite subaguda esclerosante, na demência pugilística, na intoxicação pelo alumínio, na degeneração corticobasal e no próprio processo fisiológico de envelhecimento cerebral (Diniz & Tavares, 2001).

A Tau é uma fosfoproteína primariamente neuronal encontrada no sistema nervoso central (SNC) e periférico (Kosik, 1993). O gene humano que codifica a proteína Tau é único e localiza-se no braço longo do cromossomo 17, na banda 17q21, e contendo 16 exons. Mutações do gene codificador da

Tau estão associadas a certas formas de DFT (Goedert et al., 1998), em especial à demência frontotemporal com parkinsonismo relacionada ao cromossomo 17 (DLFT-17) (Hutton et al., 1998; Spillantini et al., 1998), e estudos *in vitro* relacionaram-nas à menor capacidade de promover a polimerização da tubulina (Goedert et al., 1999). Defeitos no *splicing* alternativo do gene codificador causam dano e morte celular, apesar de não haver evidências de que pacientes com DA possuam alguma mutação no gene da proteína Tau (Kwon et al., 2000; Vogel, 1998).

Na tentativa de se buscar novos métodos de diagnóstico para a doença, demonstrou-se elevada expressão da proteína P-Tau no LCR de pacientes com DA (Kapaki et al., 2003; Hartmann et al., 2004; Galvin, 2010; Demarin et al., 2011; Mattsson, 2011;), sendo que este exame apresenta sensibilidade e especificidade elevadas para diagnóstico da doença, além de ser empregado em alguns casos de demência como parte da propedêutica (por exemplo, nas demências de início pré-senil).

1.6.2.1 PROTEÍNA TAU

A proteína P-Tau tem demonstrado ser mais específica e menos influenciada pela idade ou pelo grau de declínio cognitivo quando comparada à proteína Tau-T total e β A-42 (Hampel et al., 2004a). Além disso, embora com menor especificidade, a proteína P-Tau pode ser utilizada para diferenciar a DA da DCL (sensibilidade 85% e especificidade 68%) e da DFT (sensibilidade 85% e especificidade 79%) (Hampel et al., 2004a).

Em células nervosas saudáveis, a proteína Tau é normalmente encontrada nos axônios, ao contrário dos achados descritos nas taupatias, em que a proteína encontra-se distribuída no corpo celular e nos dendritos. A proteína Tau pode ser encontrada na forma solúvel ou insolúvel. Esta última é identificada nos PHF, que é o principal componente dos emaranhados neurofibrilares. Os PHFs apresentam de seis a oito grupos fosfato por molécula de proteína Tau, o que, em comparação com o grau de fosforilação usual da proteína Tau em cérebros saudáveis (em torno de dois grupos fosfato por molécula), permite afirmar que a proteína Tau identificada nos PHFs encontra-

se em estado hiperfosforilado (Arai et al., 1995). A proteína Tau controla a dinâmica dos microtúbulos durante a maturação e o crescimento dos neuritos. Sendo a maior proteína do citoesqueleto, a hiperfosforilação da Tau afeta funções biológicas e morfológicas nos neurônios (Brandt et al., 2005).

A fosforilação da Tau *in vitro* se dá pela ação de mais de dez quinases dirigidas aos seus sítios de serina e/ou treonina. Essas quinases são divididas em dois grandes grupos de proteína: proteína-quinase dirigida por prolina (*proline-directed kinase*) e proteína-quinase não dirigida por prolina. Nos tecidos cerebrais, o estado de fosforilação da Tau resulta da ação conjunta de várias quinases e fosfatases, muitas das quais operam coordenadamente para regular sua fosforilação (Wang et al., 2012)

A proteína Tau também promove a interação entre a actina e os neurofilamentos, o que sugere uma interrelação dos microtúbulos com outros componentes do citoesqueleto. A proteína Tau interage com outras organelas citoplasmáticas, permitindo a ligação entre microtúbulos e mitocôndrias. Os domínios de projeção N-terminal da proteína Tau permitem uma interação com a membrana plasmática neuronal (Arendt et al., 1998).

A hiperfosforilação anormal da proteína Tau pode ser o resultado do aumento da atividade das tauquinases, da subsensibilização das suas fosfatases ou de ambos os mecanismos. O estado de fosforilação da proteína Tau é modificado dinamicamente ao longo do desenvolvimento. A Tau fetal mantém-se usualmente hiperfosforilada, sendo essa característica atenuada à medida que ocorre a maturação do SNC, com a progressiva ativação das fosfatases (Brion et al., 1993).

Vários estudos demonstraram que a hiperfosforilação reduz a capacidade da Tau estabilizar os microtúbulos. Isso compromete a dinâmica microtubular, afetando o transporte intraneuronal e 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, e resultando em perda ou declínio no transporte axonal ou dendrítico nos neurônios (Buee et al., 2000).

O aumento da expressão da Tau também causa mudanças na morfologia celular, retarda o crescimento e provoca alterações importantes na distribuição de organelas transportadas por proteínas motoras dependentes de microtúbulos. A hiperfosforilação da Tau, presente no citosol durante estágios iniciais de degeneração neurofibrilar, induz mudanças conformacionais que precedem sua agregação. Existem algumas controvérsias sobre a polimerização da Tau e sua toxicidade. Estudos mostram que essa agregação da Tau é tóxica para as células, e sua polimerização está associada à perda da atividade biológica essencial para promover a estabilidade e coesão dos microtúbulos (Paula et al., 2009). No entanto, a desfosforilação da Tau hiperfosforilada e dos PHFs faz com que a proteína recupere suas atividades biológicas normais (Arai et al., 1997).

1.6.2.2 TAU NO LCR

Uma vez que a proteína Tau é intracelular, a quantidade encontrada no LCR é baixa. Entretanto, na DA um lento processo neurodegenerativo leva à crescente perda neuronal, o que pode determinar níveis aumentados de proteína Tau no LCR. A presença de proteína Tau no LCR não é específica para a DA, mas apresenta correlação com a gravidade da doença no exame clínico (Demarin et al., 2011). O desenvolvimento de anticorpos monoclonais com alta afinidade e altamente específicos para Tau levou ao desenvolvimento de testes simples para a detecção da proteína no LCR. A análise de um número de pacientes com DA e controles mostrou que a expressão elevada da proteína Tau em neurônios afetados deveria se refletir no LCR (Vandermeeren et al., 1993; Hock et al., 1995; Jensen et al., 1995; Hasegawa, 2006; Buerger et al., 2006).

Em 1993, Vandermeeren et al. relataram a presença da proteína Tau no LCR de pacientes com demência e não-dementes e descreveram um ensaio

imunoenzimático capaz de quantificá-la através do desenvolvimento do anticorpo monoclonal AT120. Trabalhos subsequentes concluíram que os níveis da proteína eram significativamente maiores em pacientes com DA se comparados a pacientes com outras doenças neurológicas e também a controles normais (Arai et al., 1995; Tato et al., 1995; Vigo-Pelfrey et al., 1995; Arai et al., 1998; Kimura et al., 1999).

Devido ao fato de a P-Tau ser o maior constituinte dos PHFs e a correlação entre gravidade da demência e a quantidade de ENFs no cérebro de pacientes com DA (Samuel et al., 1994), foi sugerida a hipótese de que a elevação de proteína Tau no LCR de pacientes com DA refletiria o processo patológico que ocorre no cérebro desses pacientes (Galasko et al., 1995).

Em 1995, Arai et al. observaram níveis significativamente elevados de proteína Tau no LCR de 70 pacientes com DA, em comparação a 96 pacientes com outras doenças neurológicas e 19 controles, independentemente da gravidade da doença, da idade de início ou do genótipo da apolipoproteína E. Utilizando como valor de corte a concentração de 22,6 pg/ml, os autores obtiveram sensibilidade de 98,6% e especificidade de 100% para a detecção de DA. Em 1995, Vigo-Pelfrey et al. avaliaram 181 pacientes, dos quais 71 tinham DA provável e os outros 110 eram controles (25 com demência do tipo não Alzheimer, 59 com outras doenças neurológicas e 26 com outros diagnósticos), onde se notou que o título médio de proteína Tau no LCR de pacientes com DA era 50% maior que em pacientes sem DA e que essa diferença era estatisticamente significativa.

Durante o seguimento dos pacientes no estudo de Arai et al., iniciado em 1995, dois dos pacientes que possuíam altos níveis de proteína no LCR e apresentavam déficit de memória muito leve, subsequentemente preencheram critérios diagnósticos para DA, sugerindo que a dosagem da proteína no LCR possa ser útil clinicamente para a detecção precoce da doença.

No mesmo ano, Galasko et al. desenvolveram estudo mostrando que os níveis de proteína Tau são elevados no LCR de indivíduos já na fase inicial da DA. Foram analisados 36 indivíduos com DA provável leve, através do Mini Exame de Estado Mental (MEEM \geq 20), 14 controles normais, 10 indivíduos com outras doenças neurológicas e nove indivíduos com outros tipos de

demência. Houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de proteína no LCR, que se mostraram elevados nos pacientes com DA. Notou-se, ainda que, nove de 12 indivíduos com MEEM ≥ 25 apresentavam níveis elevados de proteína no LCR quando comparados com os controles desse estudo. Posteriormente, outros estudos dedicaram-se à questão do uso da quantificação da proteína Tau no LCR de pacientes com DA em estágio inicial (Kurs et al., 1998, Maruyama et al., 2001) obtendo resultados animadores. O estudo realizado por Maruyama et al. (2001) demonstrou, inclusive, elevação significativa da proteína Tau no LCR de pacientes com CCL.

Em 1998, Arai et al. avaliaram 97 pacientes com DA, 12 com doença de Parkinson, 10 com acidente vascular cerebral não agudo, 39 com outras doenças neurológicas e 15 controles e obtiveram sensibilidade de 93,8% e especificidade de 75,0% para o diagnóstico de DA. Ao fazer a combinação de ensaios Tau e β A, obtiveram sensibilidade de 94,8% e especificidade de 86,8%, sugerindo, com estes valores, o refinamento da técnica de ELISA mais específica para DA, a utilização da Tau associada a β A para diagnóstico precoce e o valor das medidas para o seguimento longitudinal dos pacientes para avaliar a progressão da doença.

Em 1999, Andreasen et al., realizaram seguimento longitudinal com grande amostra de pacientes com DA, controles normais e pacientes com depressão. Foram avaliados inicialmente 407 pacientes com DA, dos quais 192 participaram do seguimento com uma nova amostra de LCR, 65 controles normais e 28 pacientes com depressão. Através da análise ROC (*Receiver Operating Characteristics*) foi obtido o valor de corte de 302 pg/ml, com sensibilidade de 93% e especificidade de 86% e uma área sob a curva de 0,95. Como em outros trabalhos (Kurz et al., 1998; Sunderland et al., 1999), não houve diferença significativa entre os níveis de Tau, conforme a duração, idade de início (Arai et al., 1995; Molina et al., 1999), progressão e gravidade (Arriagada et al., 1992; Arai et al., 1995; Blenow et al., 1995; Vigo-Pelfrey et al., 1995; Mecocci et al., 1998; Kahle et al., 2000) da doença. Deve-se ter o cuidado de observar que nesse, como em alguns dos outros estudos, não foram incluídos pacientes com outras doenças neurológicas, o que superestimaria os valores de sensibilidade e especificidade do método. Além

disso, nenhum caso teve confirmação anatomopatológica. Quanto aos valores de Tau obtidos durante o seguimento, não houve alteração em relação aos obtidos no início do estudo, semelhante a outro trabalho (Sunderland et al., 1999), o que indica que a dosagem de proteína Tau no LCR é um bom marcador para a avaliação de tratamentos que inibam a degeneração neuronal ou que alterem a expressão do gene que a codifica, de maneira mais eficaz que a avaliação clínica, que é extensa.

A quantidade de Tau no LCR é baixa por ser uma proteína intracelular. Entretanto, na DA, um lento processo neurodegenerativo leva à crescente perda neuronal, o que pode determinar níveis aumentados de proteína Tau no LCR. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais com alta afinidade e altamente específicos para Tau levou ao recente desenvolvimento de testes simples para a detecção da proteína no LCR. A análise de um número de pacientes com DA e controles mostrou que a expressão elevada da proteína Tau em neurônios afetados deveria se refletir no LCR (Hock et al., 1995; Jensen et al., 1995; Vandermeeren, 1993).

Nos estudos clínicos, o nível de Tau no LCR de pacientes com DA é significativamente mais elevado que o encontrado em outros grupos. Sabe-se que a proteína Tau também se encontra elevada em outras condições neurológicas agudas como meningoencefalite, isquemia por hipóxia, deficiência de vitamina B₁₂, aids e doença de Creutzfeldt-Jakob (Vandermeeren et al., 1993; Arai et al., 1995; Ohrui et al., 1997; Otto et al., 1997). Além disso, alguns pacientes com DA mostram níveis de Tau baixos, enquanto pacientes com outras formas de demência, em particular as secundárias a outras doenças neurodegenerativas, apresentam níveis elevados de Tau, o que determina a não-especificidade desta proteína (Tato et al., 1995; Galasko et al., 1996; Molina et al., 1996; Andreasen et al., 1997; Arai et al., 1997; Green et al., 1999). Isto pode ser explicado pelo fato de existirem diferenças individuais entre os pacientes quanto ao nível original de Tau, à história e à progressão da doença. Além disso, a maioria dos ensaios utiliza métodos que detectam a Tau, isto é, as formas normal e hiperfosforilada da proteína.

Outro dado que se observa em alguns estudos é o fato de que a quantidade de Tau no LCR de pacientes com depressão e controles, mas não

em pacientes com DA, aumenta com a idade. Isso mostra que o processo neurodegenerativo da DA domina o potencial efeito da idade, além de suscitar a questão se não estariam sendo incluídos nos estudos indivíduos nas fases pré-clínicas da DA, já que o maior fator de risco para a ocorrência da doença é a idade (Burgernee et al., 1999).

Buscando contornar o problema da sobreposição que existe nos ensaios que se utilizam da dosagem da Tau-T, um grupo de pesquisadores (Ishiguro et al., 1999) desenvolveu um método capaz de detectar a P-Tau separadamente da Tau normal no LCR e o testou em 36 pacientes com DA e 20 controles. Obtiveram valores de P-Tau aumentados nos pacientes, mas ainda assim a quantidade de P-Tau era menor que a Tau-T, indicando que a fosforilação era parcial. Ainda houve sobreposição entre os resultados de pacientes com DA e não-DA, mas foi menor que se utilizando os ensaios de Tau-T. Portanto, a dosagem de P-Tau no LCR é um marcador mais específico da DA que a Tau-T. Outros estudos reproduzem o mesmo resultado mostrando que a P-Tau é mais específica e que o grau de fosforilação da Tau varia nas diferentes condições clínicas (Kurs et al., 1998; Vanmechelen et al., 2000).

Nos primeiros anos de 2000, vários trabalhos continuaram mostrando a relevância da proteína Tau no LCR para o diagnóstico da DA. Sjogren et al., em 2001, observaram em um estudo com 127 pacientes, dos quais 60 diagnosticados com DA provável e possível, que a expressão de Tau-T e P-Tau foi significativamente aumentada nestes pacientes quando comparados com os de outras demências e os controles. A maioria de mais de 50 estudos realizados com pacientes com DA e controles, demonstraram haver aumento da proteína P-Tau de aproximadamente 300%, com sensibilidade e especificidade de 80-90% (Blennow and Hampel, 2003; Hampel et al., 2008; Blennow and Zetterberg, 2009; Shaw et al., 2009, Hampel et al., 2010). Usando os dois marcadores juntos, Tau e β A, o grupo DA foi diferenciado dos controles, de mesma idade, com uma sensibilidade de 85% e especificidade de 86%. O diagnóstico diferencial entre a DA e outras doenças neurodegenerativas foi insatisfatório (Hasegawa, 2006; Buerger et al., 2006).

Vanmechelen et al. (2000) desenvolveram um ensaio ELISA específico para o fosfo-sítio prolina-direcionado, Thr-181 e mostraram sua

aplicação no LCR de pacientes com duas diferentes taupatias: DA e demência frontotemporal (DFT). Os resultados obtidos mostraram níveis significativamente mais elevados da P-Tau no LCR de pacientes com DA, e níveis significativamente diminuídos em pacientes com DFT, comparados com controles. Neste mesmo trabalho, os autores evidenciaram íntima correlação entre os níveis líquóricos de Tau-T e P-Tau, sugerindo que o grau de fosforilação difere entre as doenças, como observado anteriormente. A seleção deste sítio em particular tem as seguintes justificativas: 1) é um sítio de fosforilação relativamente isolado na região rica em prolina; 2) é fosforilado preferencialmente por quinases prolina-direcionadas; e 3) o peptídeo sintético usado para a padronização é de pequeno tamanho. O desenho deste peptídeo foi baseado no mapeamento detalhado da P-Tau e dos anticorpos Tau, reconhecendo todas as isoformas Tau. O mesmo padrão foi observado em estudo (Buerger et al., 2002a) com P-Tau-Thr-231 obtendo sensibilidade 90,2% e especificidade de 92,3% em diferenciar DA de DFT.

No ano seguinte, outro grupo (Sjogren et al., 2001) avaliou a P-Tau, fosforilada em Thr-181 e a Tau-T no LCR de pacientes com DA provável e possível, com DV, com DFT, com DDP e controles normais. Os resultados obtidos foram os seguintes: Tau-T e P-Tau encontravam-se aumentadas em 2/3 dos pacientes com DA provável, em metade dos pacientes com DA possível, mas normais em pacientes com DV, DFT, doença de Parkinson e em controles normais.

Outros grupos realizaram trabalhos utilizando imunoensaios para proteína P-Tau em outros sítios de fosforilação, como a P-Tau-Thr-231. Buerger et al. (2002) avaliaram longitudinalmente 77 pacientes com CCL quanto aos níveis líquóricos de P-Tau-Thr-231 e Tau-T, além de 55 pacientes com DA provável e 30 controles normais. Dos 77 pacientes com CCL, 39 apresentaram declínio nos escores de MEEM e 26 converteram para DA provável. A análise dos resultados obtidos mostrou que os níveis de P-Tau 231 foram elevados nos pacientes com CCL quando comparados aos controles. Níveis elevados de P-Tau, mas não de Tau-T, no início do estudo, correlacionaram-se com a perda anual de pontos no MEEM dos pacientes com CCL, bem como com a conversão para DA. Esta conclusão corrobora recentes trabalhos que evidenciaram que lesões DA-relacionadas afetam a estrutura e

função cerebral antes mesmo do início da demência. Entretanto, a confirmação desses achados é necessária antes de se determinar níveis de corte válidos para o diagnóstico da DA em fase de CCL.

Em um estudo comparando Tau-T e P-Tau (Thr 181) como marcadores biológicos para o diagnóstico de doença de Creutzfeldt-Jakob (Van Everbroeck et al., 2002) observou-se que níveis elevados de Tau-T possuem sensibilidade diagnóstica de 92% e especificidade de 97%. Os níveis de P-Tau também se encontram elevados, quando comparados com DA, DV, DFT, CCL e outras doenças neurológicas, mas distingue-se um subgrupo onde níveis mais elevados de P-Tau correlacionam-se clinicamente com importante aumento na velocidade de progressão da doença, início precoce de mutismo acinético e maior taxa de eletroencefalogramas típicos.

É muito importante que o diagnóstico da DA seja estabelecido da maneira mais precisa possível. Para isso deve-se excluir outras causas de demência como é o caso da DV, a segunda maior causa de demência em países ocidentais (Qiu et al., 2007; 2009). Tal fato implica em maior dificuldade no diagnóstico da DA, pois a prevalência de ambas as causas de demência aumenta com a idade e estas podem ser co-existentes. Não é suficiente um exame de imagem que mostre alterações isquêmicas antigas no cérebro do paciente demente para incluí-lo no grupo de pacientes com DV, pois se sabe que isquemias silenciosas ou isquemias na profundidade da substância branca também podem ser encontradas nos exames de imagem de pacientes com DA típica. Com o objetivo de melhorar a acurácia diagnóstica desses dois tipos de demência, alguns trabalhos concentram-se em estudar as possíveis diferenças entre a proteína Tau no LCR de pacientes com DA e DV e, apesar dos resultados controversos obtidos pelos mesmos, a maioria reconhece não haver aumento da proteína Tau no LCR de pacientes com DV (Andreasen et al., 1996; Arai et al., 1998; Sjogren et al., 2001; Wallin et al., 1999; Alafuzoff et al., 2000; Andreasen et al., 2001).

Já foram desenvolvidos diferentes imunoenaios capazes de detectar a P-Tau em diferentes sítios de fosforilação no LCR. Níveis de P-Tau ao nível da treonina 181 (fosfotau-Thr 181) são elevados em pacientes com DA quando comparados a pacientes com outras demências e controles normais (Parnetti et

al., 2001; Sjogren et al., 2001). Itoh et al. (2001) demonstraram no LCR que a P-Tau ao nível da serina 199 (fosfotau-Ser 199) discrimina entre indivíduos com DA e outras demências com sensibilidade e especificidade de 85%. Outro grupo, utilizando um bioensaio para P-Tau na Thr-231 obteve sensibilidade de 87% e especificidade de 97% em distinguir DA de outras doenças neurológicas (Kohnken et al., 2000), o que foi confirmado por outro estudo (Buerger et al., 2002b) obtendo sensibilidade de 90,2% e especificidade de 80% na diferenciação de pacientes com DA de indivíduos com outras doenças neurológicas.

Em 2002 outro trabalho publicado (Hu et al., 2002) desenvolveu um ensaio capaz de detectar a P-Tau fosforilada ao nível da Ser396/Ser404 e mensurou seus níveis no LCR de pacientes e controles obtendo, através da razão P-Tau Ser 396/ Ser 404 e Tau-T, sensibilidade de 96% e especificidade de 95%, 86%, 100% e 94%, comparando-se os níveis na DA com controles normais, outras doenças neurológicas, DV e com os três grupos controle combinados, respectivamente. Neste estudo, foram avaliados pacientes com diversos graus de demência e as frações Tau encontravam-se aumentadas inclusive nos estágios iniciais, o que já havia sido observado em outros trabalhos (Hulstaert et al., 1999; Hampel et al., 2001).

Elevação dos níveis das proteínas Tau-T e P-Tau no LCR e a redução dos níveis de proteína β A-42 são características de DA. Estudos evidenciaram que a redução na taxa entre β A-42/P-Tau pode ajudar a distinguir os pacientes com DA inicial daqueles com DFT (Schoonenboom et al., 2004) e identificar aqueles pacientes com CCL que mais tarde desenvolverão DA (Hansson et al., 2006; Ewers et al., 2007). No entanto, qualquer diagnóstico por biomarcador precisa ser biologicamente plausível. Na ausência de um único diagnóstico adequado, a combinação de biomarcadores pode vir a aumentar a precisão do teste diagnóstico.

Em 2003, Sunderland et al. em um estudo com 208 participantes, dos quais 136 com diagnóstico de DA e 72 controles cognitivamente saudáveis, realizaram a análise do LCR quanto a dosagem de proteínas Tau-T e P-Tau e observaram um aumento na expressão destas proteínas e paralelamente a diminuição da proteína β A no grupo DA em comparação com o grupo controle.

Hampel et al., (2004b) realizaram um estudo com 161 pacientes, entre eles pacientes com diagnóstico de DA e outras demências, além de controles cognitivamente saudáveis. Ao realizar a quantificação da proteína P-Tau observaram elevação na expressão desta proteína no grupo DA quando comparado aos demais grupos de outras demências (outras desordens neurológicas, DFT, CCL). Essa diferença foi observada nos três epítomos de P-Tau (P-Tau-181, P-Tau-199 e P-Tau-231) usados no estudo. O mesmo resultado foi observado, quando comparou o grupo DA com o controles. Portanto, eles concluíram que a presença da proteína P-Tau no LCR, se aproxima aos critérios requeridos para o uso desta proteína como um importante e diferencial biomarcador para DA, principalmente para distingui-la de outras demências.

Em 2006, Ibach et al., realizaram um estudo prospectivo para avaliar a acurácia das proteínas P-Tau, Tau-T e β A no LCR através do método de ELISA. Foram incluídos neste estudo, indivíduos com DA, controles saudáveis, e com OD (demências não-DA e psiquiátricas). No total foram avaliados 219 indivíduos. Ao comparar pacientes com DA e controles saudáveis, verificou sensibilidade e especificidade da ordem de 88% e 80%, respectivamente, para P-Tau e Tau-T. Com este estudo eles verificaram que apesar de uma sobreposição residual significativa entre os grupos estudados, os biomarcadores presentes no LCR são adequados para o diagnóstico da DA na clínica.

Em 2007, Fargan et al., com o objetivo de determinar a utilização da P-Tau, Tau-T e β A como biomarcadores diferenciais para DA, quando comparada a outras demências, realizaram um estudo longitudinal, composto de 139 indivíduos com diagnóstico de DA, DFT, DCL, DV e controle sem demência. Foram analisados tanto o LCR quanto o plasma destes indivíduos durante um período de um a oito anos. Depois das análises, eles concluíram que há um perfil semelhante na expressão destes biomarcadores tanto no estágio inicial da doença quando em estágios mais avançados. Ainda, neste mesmo trabalho, foi sugerido que as razões entre Tau-T / β A-42 e P-Tau/ β A são medidas promissoras para predizer demência em idosos cognitivamente normais (> 60 anos de idade).

Andreasen et al (2008) a partir de um estudo com 241 pacientes, sendo 105 com DA provável, 58 DA possível, 23 com DV, 20 com CCL, 9 com DCL, 3 com outras disordens neurológicas, 5 com disordens psiquiátricas e 18 indivíduos não dementes, verificaram um aumento nos níveis de proteína Tau e decréscimo de proteína β A no LCR na DA possível e provável quando comparados ao grupo não demente.

Em 2009, Tapiola et. al., em estudo de confirmação neuropatológica, obtiveram, a partir da razão entre a proteína P-Tau e β A, sensibilidade de 91,6% e especificidade de 85,7%, com uma acurácia de 90,2%, em relação à presença de placas neuríticas no cérebro, concluindo que essa combinação entre os dois biomarcadores pode ser útil no diagnóstico de DA.

Forlenza et al. em 2010 realizaram revisão sistemática de vários estudos, observando aumento consistente da concentração de proteína Tau-T e P-Tau nos pacientes com DA nos diferentes trabalhos publicados.

A quantificação da Tau-T no LCR foi extensamente demonstrada como sendo um marcador sensível em diferenciar pacientes com DA de controles normais (Hampel et al., 2010). Entretanto, ela é menos específica no contexto de outras doenças neurológicas e outras demências, provavelmente por refletir a liberação da Tau após a morte neuronal que ocorre nestas doenças bem como na DA (Arai et al., 1997; Hampel et al., 2010).

1.6.2.3 PROTEINA TAU NA MUCOSA ORAL

Com o avanço dos estudos sobre as alterações patológicas no tecido não neuronal da DA, a aplicabilidade de outros marcadores diagnósticos, com diversidade biológica, foi expandida.

Em contraste com a biópsia da pele para o estudo de fibroblastos, o epitélio oral é composto de um único tipo de epitélio escamoso estratificado. Usando este epitélio, Hattori et al. (2002) estabeleceram um método para a determinação de proteínas epiteliais e testaram a sua aplicabilidade para o diagnóstico da DA. O epitélio oral foi esfoliado de 34 pacientes com DA e 29 pacientes com DV e 33 jovens e 34 controles emparelhados por idade. A técnica de *Western blot* foi utilizada para determinar o peso molecular da proteína Tau oral. O nível de proteína foi determinado por ensaio imunoenzimático (ELISA) no LCR, sendo posteriormente feita a comparação com os dados obtidos pelo *Western blot*. Como resultado, foram observadas duas bandas, uma de 65 Kd outra de 110 Kd. O nível de proteína no epitélio oral mostrou correlação positiva significativa com os do LCR. Os pacientes com DA tinham níveis significativamente mais elevados de proteína Tau-T do que os pacientes com DV e controles. Pacientes com DA com idade mais baixa ao início do estudo apresentaram níveis mais elevados de proteína Tau-T que os pacientes com idade mais avançada no início da doença.

2 JUSTIFICATIVA

Com o aumento na expectativa de vida da população mundial, as doenças que causam demência são importante foco em saúde pública. Considerando a elevada prevalência e incidência da DA, é necessário que se desenvolvam técnicas diagnósticas específicas e de aplicação precoce no curso da doença, possibilitando o surgimento de novas formas de tratamento, ou mesmo de prevenção da doença para que se possa combater a epidemia que se anuncia para as próximas décadas.

Nesse sentido, o biomarcador ideal para a DA é aquele que permite detectar características fundamentais da neuropatologia e que seja validado em casos com diagnóstico confirmado por exame anatopatológico. Deve ter sensibilidade diagnóstica superior a 80% na detecção da DA e especificidade maior que 80%, a fim de distinguir os casos da doença de outras demências. Deve ser confiável, reproduzível, não-invasivo, simples de ser trabalhado e de custo baixo (Aging Working Group, 1998).

A maioria dos estudos publicados se refere aos continentes da América do Norte, Europa e Ásia, especificamente o Japão. São poucos os estudos realizados publicados na América do Sul, em especial no Brasil. Sendo assim, se faz necessária uma investigação sistemática em nosso território, onde a população brasileira está envelhecendo e doenças relacionadas ao envelhecimento estão se tornando cada vez mais frequentes. Além disto, a investigação de biomarcadores em novos materiais biológicos, como saliva e mucosa pode representar grande contribuição, uma vez que não existem trabalhos publicados com estes materiais.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Investigar os níveis de proteínas Tau-T, P-Tau e β A no LCR, saliva e mucosa oral de pacientes com DA, pacientes com demência não-DA e indivíduos controles cognitivamente saudáveis, com o intuito de identificar biomarcadores adicionais para o diagnóstico da DA.

3.2 ESPECÍFICOS

- Comparar os níveis de proteína Tau-T, P-Tau e β A no LCR de pacientes com DA, pacientes com demência não-DA e controles cognitivamente saudáveis;
- Comparar os níveis de proteína Tau-T, P-Tau e β A na saliva de pacientes com DA, pacientes com demência não-DA e controles cognitivamente saudáveis;
- Correlacionar os níveis da proteína Tau-T, P-Tau e β A no LCR e na saliva de pacientes com DA, pacientes com demência não-DA e controles cognitivamente saudáveis;
- Avaliar a expressão da proteína Tau no epitélio bucal de pacientes com DA, com outras demências não-DA e controles cognitivamente saudáveis.

4 POPULAÇÃO E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO

Foram incluídos no estudo 84 indivíduos divididos entre três grupos amostrais:

- Grupo 1: 33 pacientes com diagnóstico de DA provável.
- Grupo 2: 22 pacientes com diagnóstico de demência não Alzheimer;
- Grupo 3: 29 indivíduos cognitivamente saudáveis (controles);

Todos os participantes eram oriundos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG). Os pacientes dos Grupos 1 e 2 foram recrutados no Ambulatório de Neurologia Cognitiva do HC-UFMG. Já os controles (Grupo 3) foram recrutados no bloco cirúrgico do HC-UFMG.

O recrutamento e a coleta do material para análise foram realizados no período de Março de 2007 a Setembro de 2011.

Os critérios de inclusão foram:

- No Grupo 1 - foram incluídos pacientes com diagnóstico de DA provável de acordo com os critérios do NINCDS-ADRDA (McKhann et al., 2011), submetidos ao MEEM (Folstein et al., 1975; Brucki et al., 2003) (anexo 1) e à escala FAST (Functional Assessment Staging) (Reisberg, 1988), independentemente de idade e gênero.

- No Grupo 2 - foram incluídos pacientes com outras demências degenerativas, como DFT (Neary et al., 1998), degeneração corticobasal (Gibb et al., 1992), afasia progressiva primária (Gorno-Tempini, 2011), CCL (Winblad et al., 2004), DDP (Emre et al., 2007), atrofia cortical posterior (Kirshner e Lavin, 2006), ou DV (Roman et al., 1993). Todos os pacientes deste grupo foram submetidos ao exame do MEEM.

- O grupo 3 - foi constituído por indivíduos sem queixas de comprometimento cognitivo e com desempenho considerado normal no MEEM para a sua faixa de escolaridade, submetidos a cirurgias com raquianestesia,

com diferentes diagnósticos não neurológicos: nefrolitíase, câncer de próstata, hiperplasia de próstata e osteoatrose de joelho.

Pacientes e controles não podiam apresentar lesões da mucosa bucal, de modo a permitir adequada coleta de esfregaços da mucosa e amostras de saliva.

Como critérios de elegibilidade para inclusão de casos no estudo foram selecionados pacientes tanto do sexo masculino quanto feminino, sem distinção de grupo social, raça e nível de alfabetização. Pacientes do quais tínhamos tanto o LCR, quanto o raspado da mucosa oral. A falta de obtenção do material saliva, não foi objeto de exclusão em nosso trabalho. Nove pacientes do grupo DA, 10 do grupo OD e 08 do grupo CT, foram incluídos no estudo, mas a saliva não foi analisada, por não ter sido obtida no dia dos exames.

Os critérios de exclusão, para os três grupos, foram: tabagismo, etilismo, hipertensão arterial, *diabetes mellitus* ou tireoidopatias sem o devido tratamento, e tratamentos quimioterápicos e radioterápicos prévios. Foram excluídos também, aqueles indivíduos que não foi possível a coleta do LCR.

Com relação aos dados epidemiológicos temos:

- SEXO: Dos 84 participantes, 50 eram mulheres e 34, homens. Entre as mulheres, 25 pertenciam ao grupo DA, 8 ao grupo OD e 17 ao grupo CT. Quanto aos homens, 8 estavam no grupo DA, 14 no grupo OD e 12 no grupo CT.

- IDADE: A idade média dos participantes do estudo foi de $65,5 \pm 14,7$ anos, com idade mínima de 46 anos e máxima de 91 anos.

- ESCOLARIDADE: A escolaridade média de nosso grupo foi de $5,6 \pm 3,8$ anos, variando de 0 a 16 anos.

Os dados citados aqui, estão listados no anexo

Todos os participantes foram submetidos à punção lombar com coleta de LCR, além de coleta de amostra de saliva e de células da mucosa oral do assoalho bucal, dorso de língua e mucosa jugal.

4.2 COLETA E PROCESSAMENTO DE MATERIAL

4.2.1 CÉLULAS DA MUCOSA

4.2.1.1 COLETA

Para coleta das células da mucosa bucal foram usadas escovas cervicais descartáveis, uma para cada sítio de coleta. As células coletadas foram preparadas para a técnica de *Western blot*. A coleta consistia em passar a escova na mucosa, fazendo movimentos rotacionais com força moderada. Para o *Western blot* a escova cervical era introduzida num frasco tipo Eppendorf® contendo meio de cultura *Dulbecco's Eagle Medium* contendo suspensão antifúngica e antimicótica. Para armazenamento das células, a escova era girada até que células contidas na escova fossem transferidas para o frasco. Essas manobras foram realizadas para cada um dos três sítios de coleta.

4.2.1.2 PROCESSAMENTO

O processamento das células da mucosa consistia em, após a coleta, centrifugar o material a 1500rpm por 10 minutos, descartar o sobrenadante e depois lavar com 1 ml de iodo povidona a 2%, colocar no vórtex até homogeneizar. Logo após, centrifugar a 1500rpm por 5 minutos, descartar o sobrenadante e lavar com 1 ml de PBS estéril (10 mmol/l, pH 7,4). Este procedimento foi realizado mais uma vez, com o congelamento do pellet, para posterior uso no *Western blot*.

4.2.1.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TAU EM CÉLULAS EPITELIAIS DA MUCOSA BUCAL PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOT

4.2.1.4 EXTRATOS PROTÉICOS CELULARES

Os extratos de proteínas totais das células epiteliais foram preparados de acordo com o método previamente descrito por Sousa e colaboradores (2005). Após a lavagem das células com PBS 1x o sobrenadante foi completamente descartado. Em seguida as células foram lisadas pela adição de 1mL da solução de lise (SDS 1% , 1% Triton X-100, 100 mM Tris/HCl, pH 8.0, 10% glicerol, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 25mM NaF, 2.5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml aprotinina, and 1 mM sódio ortovanato de sódio), vortexadas e deixado em banho de gelo por 15 minutos. Posteriormente o lisado foi transferido para tubos de 1,6 mL e centrifugado a 13.000 rpm em microcentrífuga Eppendorf® modelo 5417R por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, aliquotado em tubos Eppendorf® de 0,6 mL e guardados a -20°C até o momento de uso. A concentração das proteínas totais foi determinada utilizando o reagente de Bradford, e depois espectrofotometria a 595nm, através do “Kit Bio-Rad Assay” (Bio-Rad Hercules, CA).

4.2.1.5 FRACIONAMENTO ELETROFORÉTICO E TRANSFERÊNCIA DAS PROTEÍNAS TOTAIS

Foram misturadas 40-50µg das proteínas totais com tampão de amostra 5 vezes concentrado [Tris-HCl 150 mM (pH 6,8), β-mercaptoetanol 15%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 6%, azul de bromofenol 0,3%, glicerol 25%, fervidas por 5 min e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (PAGE) 10% a 100 V por 1,5 h e transferidos para membrana de nitrocelulose (Hybond™ ECL™, GE, Healthcare) conforme protocolo do “Kit Bio-Rad Transference” (Bio-Rad Laboratories, USA). A transferência foi efetuada durante 1h e 30 minutos a 350 mA em tampão Tris-base 48 mM (pH 8,4), glicina 39 mM, SDS 0,037% e metanol 20%. Após transferência, as membranas foram coradas com “ponceau” para visualização da eficiência da mesma, além da informação prévia sobre a equivalência das quantidades de proteínas aplicadas nas diferentes canaletas. As membranas foram bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente utilizando-se 0,1% de Tween-20 contendo

4% de leite em pó desnatado (Sousa *et al.*, 2005). Após este tempo, foi lavada três vezes com PBS contendo 0.1% Tween-20, e então incubada com os anticorpos específicos (1:1000).

4.2.1.5.1 REAÇÃO COM ANTICORPOS E REVELAÇÃO

Foram utilizados os anticorpos monoclonais (Pierce Biotechnology, USA) Tau anti-humano (clone BT2) e/ou anti-humano PHF-Tau (clone AT8), os quais reconhecem a forma total e fosforilada da proteína Tau, respectivamente. As membranas foram incubadas com os anticorpos a 4°C por 18 – 20 horas em solução de PBS/Tween contendo 5% de BSA (albumina bovina sérica) na diluição de 1:1000 e foram lavadas novamente em PBS/Tween por três vezes e incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo secundário ligado à peroxidase na diluição de 1:3000 (anti-camundongo - Santa Cruz Biotechnology) em solução PBS/Tween contendo 5% de leite em pó desnatado. Após nova sessão de lavagens por três vezes em PBS/Tween as membranas foram incubadas em solução reveladora “ECL-Plus” (GE, Healthcare), expostas contra filme de raio X em intervalos de 30 seg. a 20 min. (Hyperfilm ECL, GE, Healthcare) e reveladas utilizando-se revelador e fixador (Kodak), segundo recomendações do fabricante. Os níveis de expressão da Tau-T e P-Tau foram quantificados através de análise de densitometria utilizando o programa ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*). Alterações nos níveis de expressão foram expressos como unidade arbitrária.

4.3 SALIVA

4.3.1.1 COLETA

A saliva foi coletada com a utilização de frascos do tipo Salivette®, que consistem de tubo plástico contendo um rolo de algodão e um filtro plástico. O rolo de algodão era introduzido na boca do indivíduo, após o que se aguardava de dois a três minutos. Caso o participante fosse capaz, podia-se pedir para que movimentasse gentilmente o algodão na boca a fim de estimular o fluxo salivar. Após a coleta o algodão era devolvido ao frasco.

4.3.1.2 PROCESSAMENTO

No laboratório a saliva, era submetida à centrifugação, durante cinco minutos a 1500 rotações por minuto (rpm). Após a centrifugação o algodão do Salivette® era descartado, o material era diluído de 1:1 em solução tampão de citocinas e a saliva separada em alíquotas de 200 µL e armazenada em tubos do tipo Eppendorf® para serem quantificadas as proteínas β A, Tau-T e P-Tau através do método de ELISA, mesmo método utilizado na quantificação destas proteínas no LCR .

4.4 LCR

4.4.1 COLETA

A punção lombar para coleta do LCR foi realizada por um médico previamente treinado, em ambiente hospitalar. Para a coleta o paciente era posicionado em decúbito lateral, com anteflexão forçada da cabeça e dos membros inferiores. Após o paciente posicionado, o médico determinava o ponto de introdução da agulha, que consiste no espaço vertebral existente entre a terceira e a quarta vértebras lombares. Após a determinação do local da punção o médico calçava luvas estéreis e realizava antissepsia com solução iodada degermante, seguida de solução alcoólica iodada. Logo depois da antissepsia era feito um botão anestésico com lidocaína 1% no local de introdução da agulha. Quando o espaço subaracnóideo era alcançado o mandril era retirado e podia-se observar o fluxo de LCR. Neste momento o líquido era coletado em dois tubos estéreis do tipo Eppendorf®, num volume total de 1,5mL que seriam posteriormente identificados. O volume de LCR é inferior ao proposto na literatura – 10ml, porém devido às dificuldades no ato da coleta, padronizou-se este volume. O local da antissepsia era limpo com gaze úmida para remoção de resíduos da solução iodada e um curativo adesivo era colocado no local.

4.4.1.1 PROCESSAMENTO DO MATERIAL

As amostras de LCR foram armazenadas em tubos do tipo Eppendorf® e então congeladas em freezer -20°C, até serem processadas para a quantificação das três proteínas em questão pelo método de ELISA.

4.4.1.2 ANÁLISE DO LCR

Todas as amostras foram obtidas através de punção lombar. Foram colhidos 1,5 ml em tubos de polipropileno e submetidos à análise de rotina (citologia, bioquímica e eletroforese de proteínas, além de reações

imunológicas para sífilis), em um período sempre menor do que seis horas do momento da coleta. Foram excluídas as amostras com mais de 500 hemácias /campo, para não comprometer as amostras. Após análise de rotina e centrifugação do material a 1500 rpm por 10 minutos, as alíquotas destinadas à dosagem da P-Tau, Tau-T e β A foram identificadas e armazenadas a -20°C em freezer específico no Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas - ICB, UFMG.

As concentrações de P-Tau, Tau-T e β A (1-42) foram determinadas através de reação de ELISA padronizada nos kits INNOTEST[®] PHOSPHO-TAU (181P) INNOTEST[®] h-TAU Ag, e INNOTEST[®] β -amiloide (1-42) (Innogenetics, Ghent, Belgium), respectivamente.

O INNOTEST[®] PHOSPHO-TAU (181P) é um imunoenensaio enzimático em fase sólida para a determinação quantitativa de Tau fosforilada no LCR, no qual a proteína P-Tau ou fragmentos são capturados por um primeiro anticorpo monoclonal, HT7. As amostras de LCR são adicionadas e incubadas com um anticorpo marcado com biotina, AT270bio. Este complexo antígeno-anticorpo é então detectado por peroxidase marcada com estreptavidina.

Após a adição do substrato, as amostras positivas desenvolveram cor e foram lidas na absorvância de 450 nm e 690 nm. As absorvâncias médias foram, então, calculadas para as soluções-padrão e para as amostras desconhecidas. Nenhum valor individual diferiu em mais de 20% de seu par feito em duplicata, não sendo necessária, assim, a repetição de nenhum teste. O valor de corte foi de 550pg/ml.

O INNOTEST[®] hTAUAg é um imunoenensaio enzimático em fase sólida, no qual a proteína Tau humana é capturada pelo primeiro anticorpo monoclonal (AT120) ligado na fase sólida. As amostras de LCR são adicionadas em volumes de 25 μ l e incubadas subsequentemente com dois anticorpos monoclonais específicos da Tau marcados com biotina (HT7 e BT2). Os três anticorpos monoclonais reconhecem diferentes determinantes antigênicos na proteína Tau. Estes anticorpos são detectados por uma peroxidase marcada com estreptavidina. Depois de adicionar este substrato, as amostras positivas desenvolvem uma coloração azul. A reação é interrompida pela adição de

ácido sulfúrico que produz uma cor amarela. A absorbância é medida a 450nm. O valor de corte foi de 375pg/ml.

O INNOTEST[®] β -amiloide₍₁₋₄₂₎ também é um imunoenensaio enzimático em fase sólida para a determinação quantitativa da proteína β A₍₁₋₄₂₎ no LCR. A β A é capturada primeiro por um anticorpo monoclonal (21F12) ligado na fase sólida. As amostras de LCR são adicionadas em volumes de 25 μ l e incubadas subsequentemente com um anticorpo marcado com biotina (3D6). Este anticorpo é detectado por uma peroxidase marcada com estreptavidina. Depois de adicionar o substrato, as amostras positivas desenvolvem uma coloração azul. A reação é interrompida pela adição de ácido sulfúrico que produz uma cor amarela. A absorbância é medida a 450nm e o valor de corte de 52pg/ml.

Uma curva-padrão foi construída colocando os valores médios de absorbância obtidos para cada solução padrão no eixo vertical (y) e as correspondentes concentrações no eixo horizontal em pg/ml (x). Obteve-se, assim, uma curva sigmoidal em concordância com a curva-padrão sugerida pelo kit.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos resultados obtidos no LCR e saliva foram efetuadas pelos testes de Kruskal-Wallis e Mann Whitney, adequadas ao protocolo experimental. Foram utilizados os testes não paramétricos, pois os valores de todas as variáveis, com exceção da variável idade, não tiveram distribuição normal de acordo com Shapiro-Wilk.

Para a variável idade, foi utilizado o teste One Way Anova e teste *post-hoc* o teste de comparação múltipla – LDS (*Least Significant Difference*). Valores de p menores do que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância.

Posteriormente, os grupos foram comparados entre si empregando-se o teste *post-hoc* correção de Bonferroni. Valores de p menores do que 0,05 ($p < 0,017$) foram considerados como indicativos de significância.

Correlações entre as variáveis foram calculadas utilizando os testes de correlação de Spearman, uma vez que também não foi observada uma distribuição normal entre os resultados. Os resultados das análises foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Para a aferição da sensibilidade e especificidade de nossos resultados, foi utilizada a curva ROC.

Para verificar a significância entre os achados na mucosa utilizou-se o teste One Way Anova com *post-hoc* correção de Bonferroni. Valores p menores que 0,05 ($p < 0,017$) foram considerados indicativos de significância.

Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando-se o pacote estatístico SPSS for Windows, release 11.5.1; SPSS Inc, Chicago, Illinois.

4.6 ASPECTOS LEGAIS DE BIOÉTICA

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG) (Protocolo CAAE – 0221.0.203.000-06 em 05/07/2006), obedecendo ao exigido pela legislação brasileira, conforme as resoluções CNS nº 196/96 e 304/00 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (Anexo 2). Após aprovação do COEP/UFMG e antes do início da realização do projeto, o mesmo foi ainda submetido à aprovação da DEPE-Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do HC/UFMG, conforme a Norma 01/98.

O participante e/ou seu responsável foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e foi solicitada a assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 3) pelo paciente – bem como de um familiar nos casos de demência – para a participação no estudo. A participação só ocorreu após leitura e assinatura, de livre e espontânea vontade, desse documento. Os indivíduos não foram identificados pelo nome e sim por códigos para identificação das amostras, de forma a manter o sigilo em relação aos dados pessoais.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DOS GRUPOS DE ACORDO COM OS DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS.

5.1.1 GÊNERO

Com relação ao gênero, observa-se predominância de mulheres no grupo DA e de homens no grupo OD, como mostrado na Tabela 2. Na análise de resíduos que foi feita observou então que no grupo DA a maioria do grupo é de mulheres, que estão em número menor no grupo OD, enquanto que para o sexo masculino, a maioria dos homens está agrupada no grupo OD e a minoria, no grupo DA.

Tabela 2 - Determinação e comparação do gênero entre os pacientes dos grupos DA, OD e CT. Teste utilizado: Qui-Quadrado.

Diagnóstico	Feminino	Masculino	Valor p
DA	25** (50%)	8* (23,5%)	p = 0,014
OD	8* (16,0%)	14** (41,2%)	
CT	17 (34,0%)	12 (35,3%)	

* o resíduo ajustado foi menor que -1,96.

** o resíduo ajustado foi maior que +1,96.

5.1.2 IDADE

A única variável que tem distribuição normal de acordo com Shapiro-Wilk em nosso estudo é a variável idade. Ao compararmos as médias das idades entre os grupos utilizamos o método ANOVA, sendo observada diferença significativa entre os grupos diagnósticos (Gráfico 1).

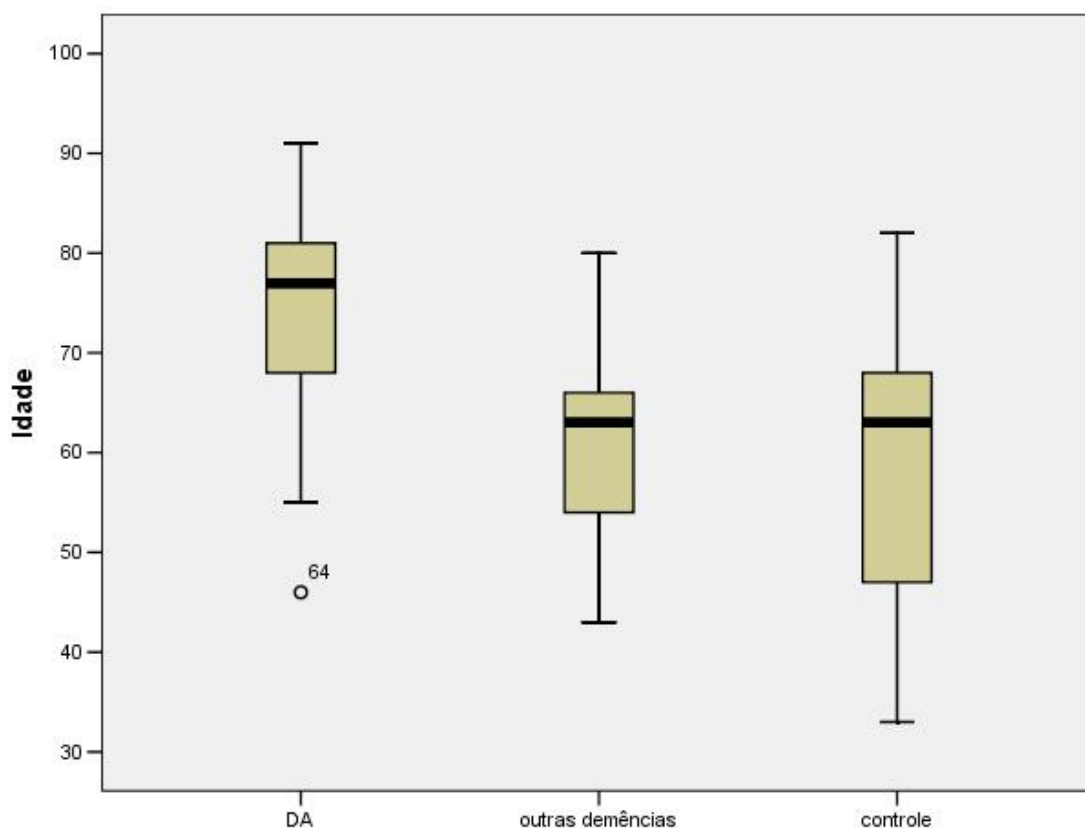


Gráfico 1 - Gráfico demonstrativo da distribuição de idade entre os três grupos: DA, OD e CT

Tabela 3 - Médias e desvios-padrão obtidos a partir da variável idade entre os grupos DA OD e CT

Diagnóstico	Média (anos)	Desvio Padrão	Valor de p
DA	74,30	10,22	
OD	60,50	9,99	
CT	59,28	13,68	p < 0,0001

Quando comparamos os três grupos para verificarmos em quais deles havia diferença significativa, utilizamos o teste de comparação múltipla, LSD e obtivemos os seguintes resultados (Tabela 3).

Tabela 4 - Teste de comparação múltipla para a variável idade entre os grupos DA, OD e CT

Comparação entre os grupos	Valor de p
DA x OD	$p \leq 0,0001$
DA x CT	$p \leq 0,0001$
OD x CT	$p = 0,707$

De acordo com a Tabela 4, observamos que a diferença significativa referente à variável idade é encontrada entre os grupos DA *versus* OD e DA *versus* CT ($p \leq 0,0001$).

5.1.3 ESCOLARIDADE

Ao analisarmos a escolaridade dos três grupos de nosso estudo não foi observada diferença significativa entre eles, como observado na Tabela 5. A mediana tem valores muito semelhantes entre os três grupos estudados (Gráfico 2).

Tabela 5 - Quadro com os valores de mediana, intervalo interquartil e valor p determinados entre os grupos DA, OD e CT com relação a variável escolaridade.

Diagnóstico	Mediana (anos)	Intervalo Interquartil (anos)	Valor de p
DA	4	4	p=0,159
OD	6,5	7	
CT	4	3	

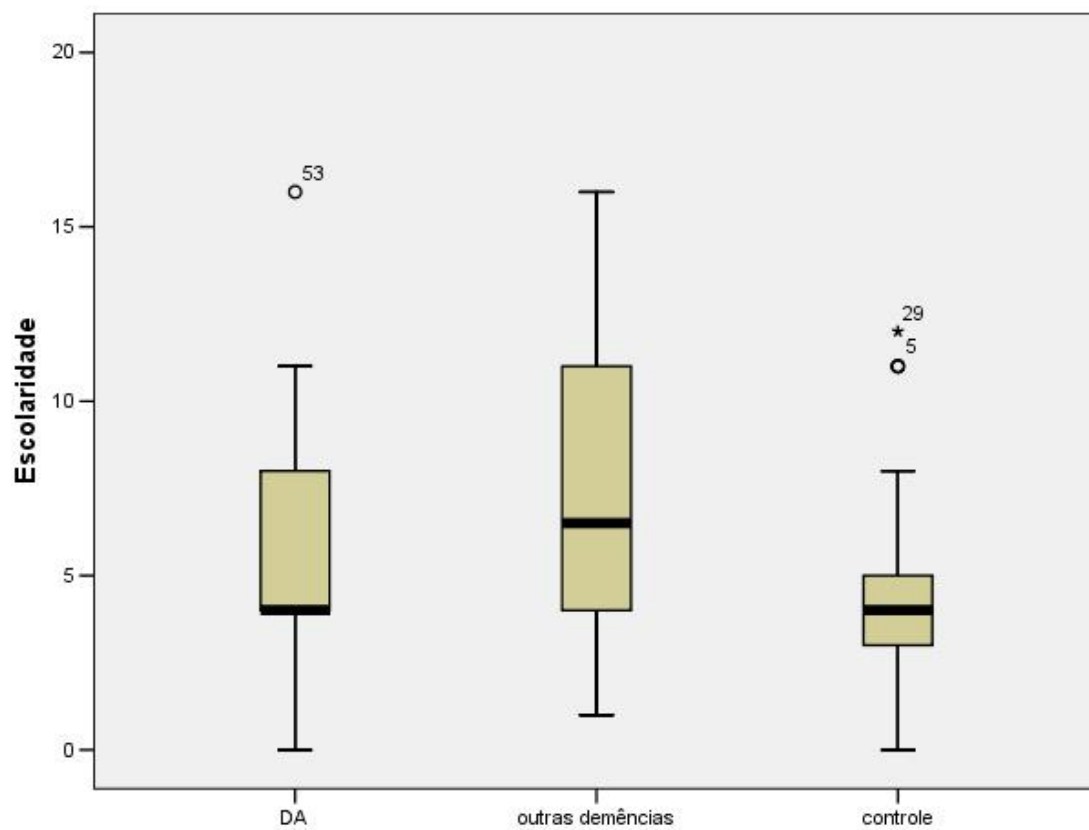


Gráfico 2 - Gráfico demonstrativo da distribuição da escolaridade entre os grupos: DA, OD e CT.

5.1.4 MEEM

Realizamos a análise comparativa entre os três grupos de acordo com os valores obtidos no MEEM (Gráfico 3).

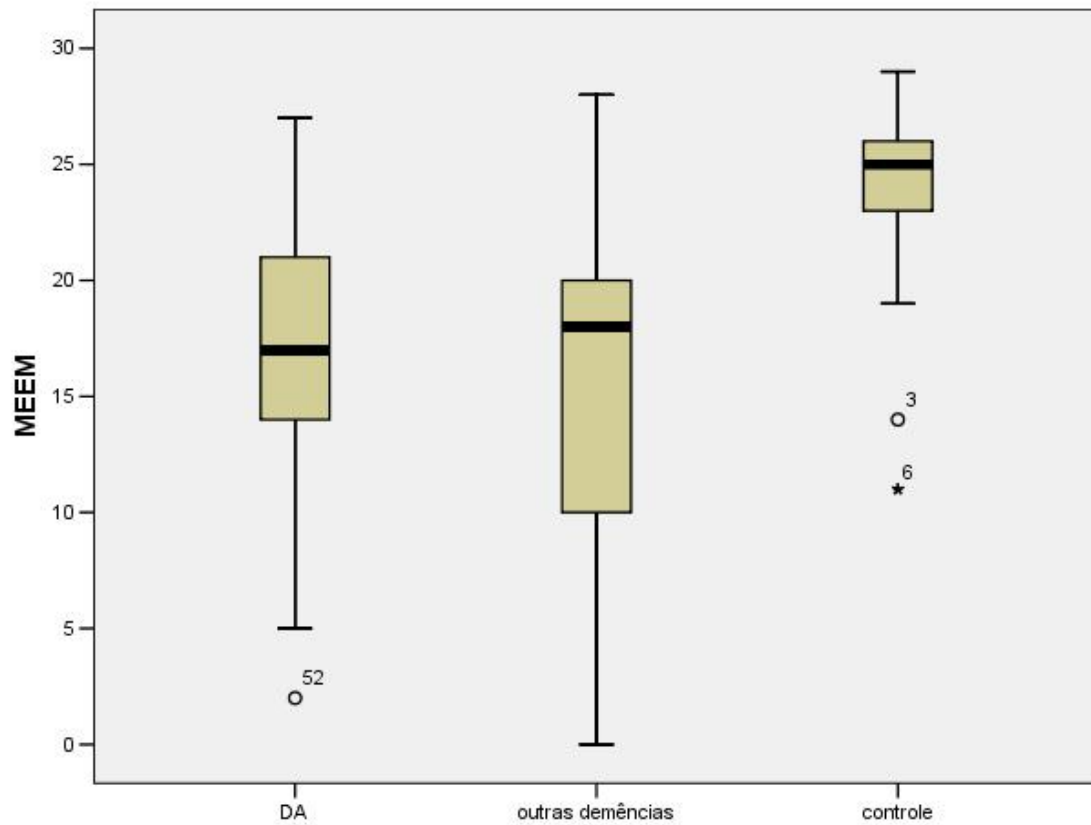


Gráfico 3 - Gráfico demonstrando valores do MEEM existente entre os grupos: DA, OD e CT.

Ao realizarmos o teste de Kruskal-Wallis observamos que existe uma diferença significativa entre os grupos quanto a variável MEEM (Tabela 6).

Tabela 6- Valores da mediana, intervalo interquartil e valor p determinados entre os grupos DA, OD e CT com relação a variável MEEM..

Diagnóstico	Mediana (pontos)	Intervalo Interquartil (pontos)	Valor de p
DA	17	8	p<0,0001
OD	18	13	
CT	25	4	

Ao compararmos os resultados entre os grupos, observamos que esta diferença está presente nos grupos DA *versus* CT e OD *versus* CT (Tabela 7).

Tabela 7 - Comparação entre os grupos estudados para determinar o valor p

Comparação entre os grupos	Valor de p
DA x OD	p=0,845
DA x CT	p < 0,0001*
OD x CT	p =0,001*

* Valor significativo usado na correção de Bonferroni p<0,017

Ao correlacionarmos o tempo de evolução da doença e o MEEM, observamos que existe uma correlação entre estas variáveis no grupo DA, sendo que $r=-0,507$ e $p=0,003$ sendo um indicativo de que quanto maior o tempo de evolução da doença menor o valor obtido no MEEM. Já no grupo OD, não foi observada significância na correlação destas duas variáveis.

5.2 ANÁLISE DOS BIOMARCADORES PRESENTES NO LCR

Analizamos e quantificamos a presença das proteínas β A, Tau-T e P-Tau no LCR dos pacientes dos três grupos pesquisados: grupo de pacientes com DA, pacientes OD e pacientes cognitivamente saudáveis (CT).

5.2.1 β A no LCR

No Gráfico 4, verifica-se a concentração da proteína β A no LCR nos três grupos estudados. Observa-se que os níveis de β A estão significativamente diminuídos nos pacientes DA quando comparados com os indivíduos do grupo CT e no grupo OD quando comparado com os pacientes do grupo controle observa-se também uma diminuição significativa, (Tabela 8). Não se observa diferença significativa para esta proteína entre os grupos DA *versus* OD (Tabela 9).

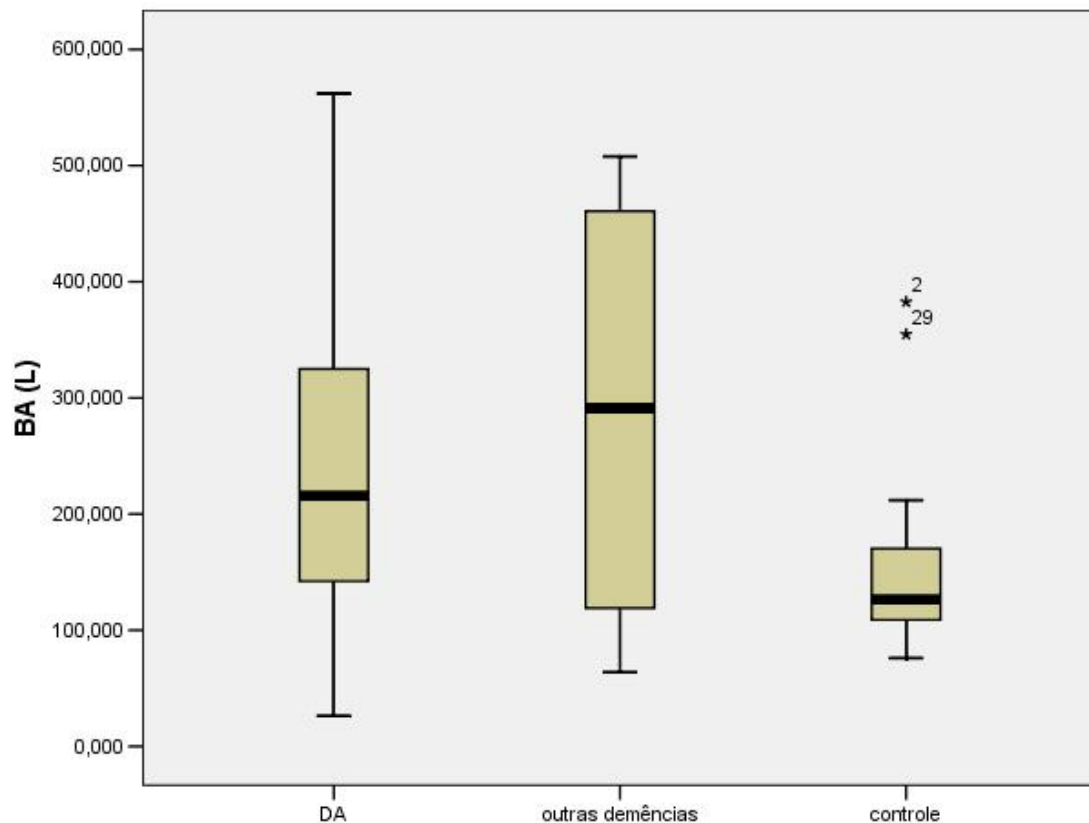


Gráfico 4 - Concentração de β A no LCR em pg/ μ l entre os grupos DA, OD e CT.

Tabela 8 - Valores da mediana, intervalo interquartil e valor p determinados entre os grupos DA, OD e CT com relação à variável βA no LCR

Diagnóstico	Mediana	Intervalo Interquartil	Valor de p
DA	215,48	201,02	p=0,010*
OD	291,48	346,68	
CT	126,27	64,47	

Tabela 9 - Comparação entre os grupos estudados para determinar o valor p

Comparação entre os grupos	Valor de p
DA x OD	p=0,460
DA x CT	p=0,007*
OD x CT	p=0,015*

* Valor significativo usado na correção de Bonferroni $p < 0,017$

5.2.2 TAU-T NO LCR

Foi realizada a dosagem da proteína Tau-T no LCR dos pacientes dos três grupos, através do teste diagnóstico de ELISA obtendo o perfil demonstrado no Gráfico 5.

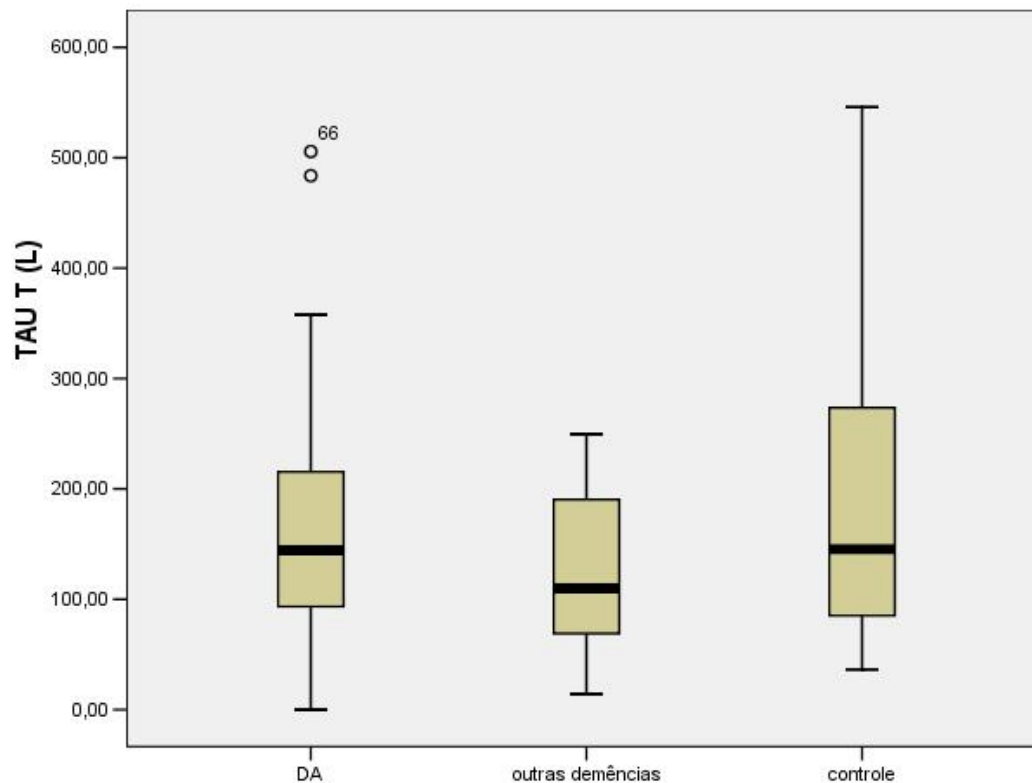


Gráfico 5 - Gráfico comparativo da expressão de Tau-T no LCR em pg/μl entre os grupos DA, OD e CT.

Ao compararmos os três grupos observamos que não há diferença significativa entre eles com relação aos valores das medianas referentes à concentração de Tau-T (Tabela 10).

Tabela 10 - Valores de mediana, intervalo interquartil e valor p determinados entre os grupos DA, OD e CT com relação à variável Tau-T no LCR.

Diagnóstico	Mediana	Intervalo Interquartil	Valor de p
DA	144,16	135,42	p=0,322
OD	109,75	133,77	
CT	145,33	208,85	

5.2.3 P-TAU NO LCR

Os níveis de P-Tau no LCR foram significativamente diferentes entre os três grupos estudados, como pode ser observado no Gráfico 6 e na Tabela 11.

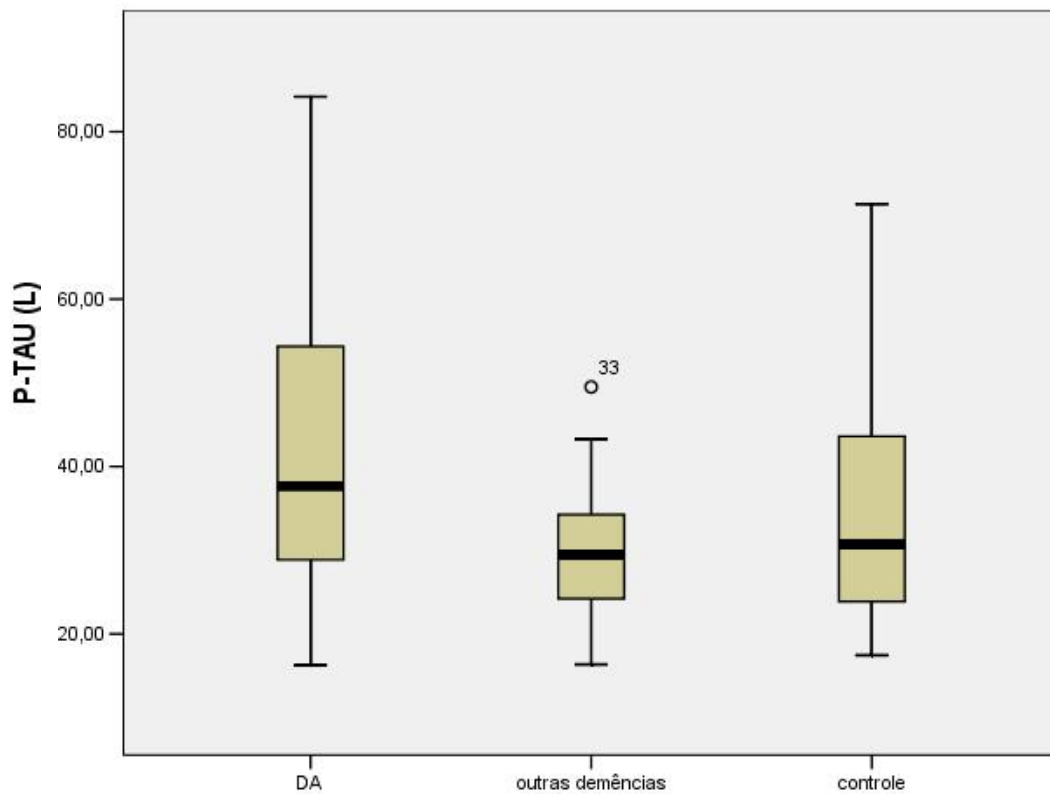


Gráfico 6 - Gráfico comparativo da expressão de P-Tau no LCR em pg/μl entre os grupos DA, OD e CT.

Tabela 11- Valores da mediana e intervalo interquartil obtidos a partir da análise da variável P-Tau, entre os grupos DA, OD e CT.

Diagnóstico	Mediana	Intervalo Interquartil	Valor de p
DA	37,70	27,22	p=0,015*
OD	29,44	10,46	
CT	30,74	21,07	

Como foi verificada diferença significativa, foi feita comparação 2x2 entre os grupos. Para isto foi utilizado o teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni para determinarmos em qual ou quais grupos verificamos essa diferença significativa. Como mostrado na Tabela 12, verificamos uma diferença significativa entre o grupo DA *versus* OD.

Tabela 12 - Comparação entre os grupos para determinar o valor p Mann-Whitney com correção de Bonferroni com relação à variável P-Tau no LCR.

Comparação entre os grupos	Valor de p
DA x OD	p=0,005*
DA x CT	p=0,43
OD x CT	p=0,447

* Valor significativo usado na correção de Bonferroni $p < 0,017$

5.3 ANÁLISE DOS BIOMARCADORES PRESENTES NA SALIVA

5.3.1 β A NA SALIVA

Foi realizada a dosagem da proteína β A na saliva dos pacientes dos três grupos. Os resultados obtidos para esta proteína podem ser observados no Gráfico 7.

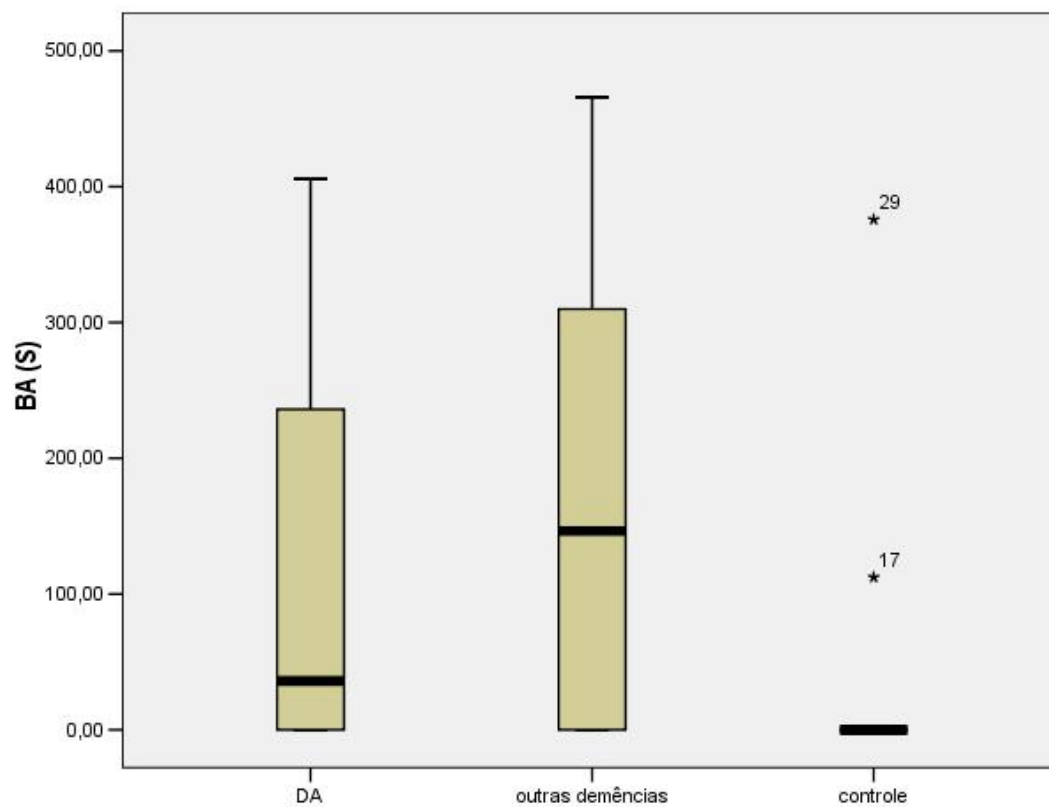


Gráfico 7 - Concentração de β A na saliva em pg/ μ l entre os grupos DA, OD e CT.

Ao analisarmos as medianas obtidas entre os grupos, observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 13).

Tabela 13 - Valores da mediana, intervalo interquartil e valor p com relação à variável βA na saliva n os grupos DA, OD e CT.

Diagnóstico	Mediana	Intervalo Interquartil	Valor de p p = 0,031*
DA	35,92	240,71	
OD	146,55	319,41	
CT	0	0	

Ao realizarmos o teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni, observamos que a diferença significativa se encontra entre o grupo DA *versus* CT (Tabela 14).

Tabela 14 - Comparação entre os grupos com relação à variável βA .

Comparação entre os grupos	Valor de p
DA x OD	p = 0,031
DA x CT	p=0,009*
OD x CT	p=0,040

* Valor significativo usado na correção de Bonferroni p<0,017

5.3.2 TAU-T NA SALIVA

No Gráfico 8, observamos a expressão da proteína Tau-T na saliva dos pacientes dos três grupos. Ao compararmos os resultados obtidos na saliva com relação à variável Tau-T não observamos nenhuma diferença significativa entre os grupos (Tabela 15).

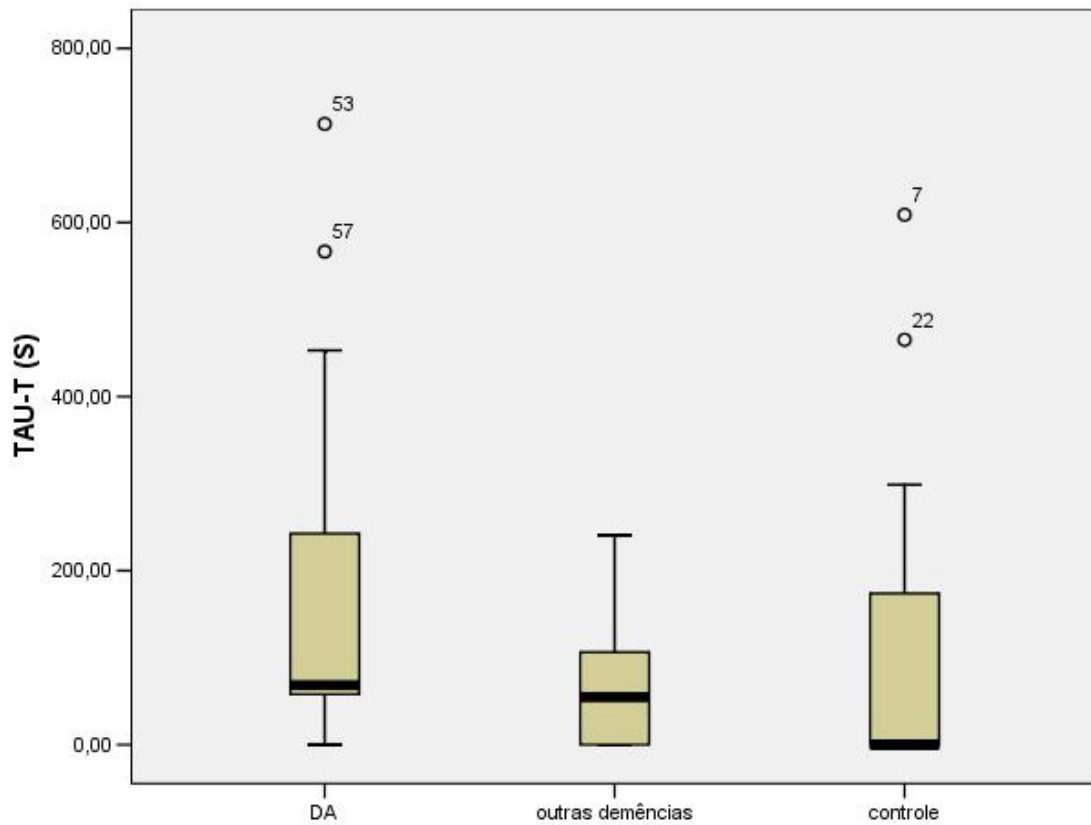


Gráfico 8 - Gráfico comparativo da expressão de Tau-T na saliva em pg/μl entre os grupos DA, OD e CT.

Tabela 15 - Valores de mediana, intervalo interquartil e valor p com relação a variável Tau-T nos grupos DA, OD e CT.

Diagnóstico	Mediana	Intervalo Interquartil	Valor de p
DA	68,26	191,63	
OD	55,06	110,20	
CT	0	298,43	p=0,097

5.3.3 P-TAU NA SALIVA

Foi feita a dosagem da proteína P-Tau na saliva dos pacientes dos três grupos não sendo observados níveis de significância na expressão desta proteína como pode ser visualizado na Tabela 16.

Tabela 16 – Quadro com os valores de mediana, intervalo interquartil e valor p com relação à variável P-Tau nos grupos DA, OD e CT.

Diagnóstico	Mediana	Intervalo Interquartil	Valor de p
DA	64,38	124,38	p=0,4572
OD	116,88	106,87	
CT	78,75	67,5	

5.4 CORRELAÇÃO ENTRE RESULTADOS OBTIDOS NO LCR E SALIVA

Para verificarmos se existe correlação entre a expressão das proteínas analisadas no estudo, foi realizado o teste de correlação de Spearman.

Para β A observou-se que uma relação direta e significativa, de forma que se a quantidade de β A aumenta no LCR o mesmo será observado na saliva, significância essa encontrada na saliva dos grupos DA e CT (Tabela 17).

Tabela 17 - Quadro com os valores do coeficiente de relação (r) e valor p em relação a proteína β A presente no LCR e saliva ente os três grupos estudados.

Diagnóstico	Coeficiente de correlação (r)	Valor de p
DA	0,650	p=0,003*
OD	0,323	p=0,435
CT	0,701	p=0,024*

Com relação às proteínas Tau-T e P-Tau não houve correlação entre a concentração das proteínas no LCR e na saliva (Tabelas 18 e 19).

Tabela 18 - Quadro com os valores do coeficiente de relação (r) e valor p em relação à proteína Tau-T presente no LCR e saliva ente os três grupos estudados.

Diagnóstico	Coeficiente de correlação (r)	Valor de p
DA	-0,314	p=0,166
OD	0,458	p=0,215
CT	0,143	p=0,693

Tabela 19 – Quadro com os valores do coeficiente de relação (r) e valor p em relação a proteína P-Tau presente no LCR e saliva ente os três grupos estudados.

Diagnóstico	Coeficiente de correlação (r)	Valor de p
DA	0,003	p=0,166
OD	0,483	p=0,215
CT	0,396	p=0,693

5.5 RAZÃO ENTRE OS TRÊS BIOMARCADORES NO LCR

Ao analisarmos a razão entre os três biomarcadores observamos os seguintes resultados (Tabela 20).

Tabela 20 - Razão entre os três biomarcadores presentes no LCR nos grupos DA; OD e CT

Características	Tau-T/βA	PTau/βA	Tau-T+PTau/βA
DA x CT	P= 0,194	P=0,595	P=0,05
DA x OD	P= 0,060	P=0,048	P=0,175
OD x CT	P=0,005**	P=0,013**	P=0,004**

5.6 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

Ao analisarmos os resultados obtidos no LCR para as três proteínas Tau-T, P-Tau e β A, através da curva ROC, observamos as seguintes curvas para o grupo DA *versus* CT (Gráfico 9)

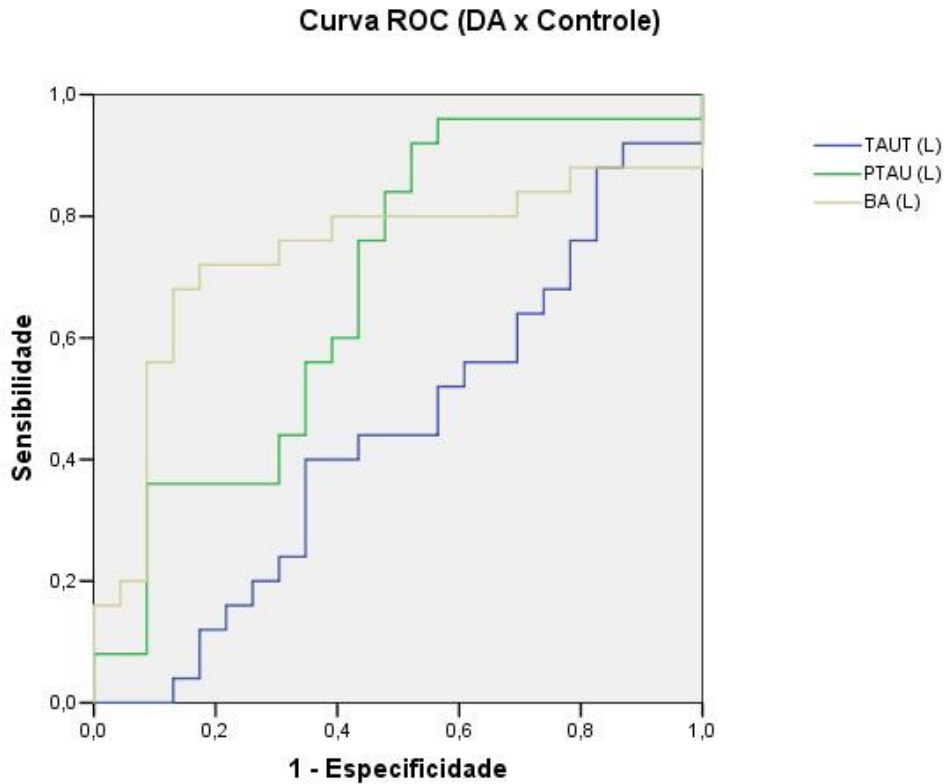


Gráfico 9- Determinação da sensibilidade e especificidade dos três biomarcadores estudados no LCR (Tau-T, P-Tau e β A) nos grupos DA *versus* CT.

Na Tabela 21, verificamos os valores obtidos, onde P-Tau e β A obtiveram resultados significativos. Para P-Tau o ponto de corte de 28,9910pg/ μ l apresenta sensibilidade de 76% e especificidade de 60%. Já para a β A o ponto de corte de 153,723pg/ μ l apresenta sensibilidade de 76% e especificidade de 70%.

Tabela 21 - Parâmetros utilizados para a determinação da curva ROC para o grupo DA versus CT no LCR.

Características	Área	Valor p (a)	Intervalo de confiança 95%	
			Limite mínimo	Limite máximo
Tau-T	0,445	0,516	0,280	0,610
P-Tau	0,682	0,031**	0,526	0,838
β A	0,737	0,005**	0,585	0,890

a Hipótese nula = 0.05

Ao analisarmos o grupo DA versus OD, obtivemos a curva ROC como mostrada no Gráfico 10 e resultados na Tabela 22.

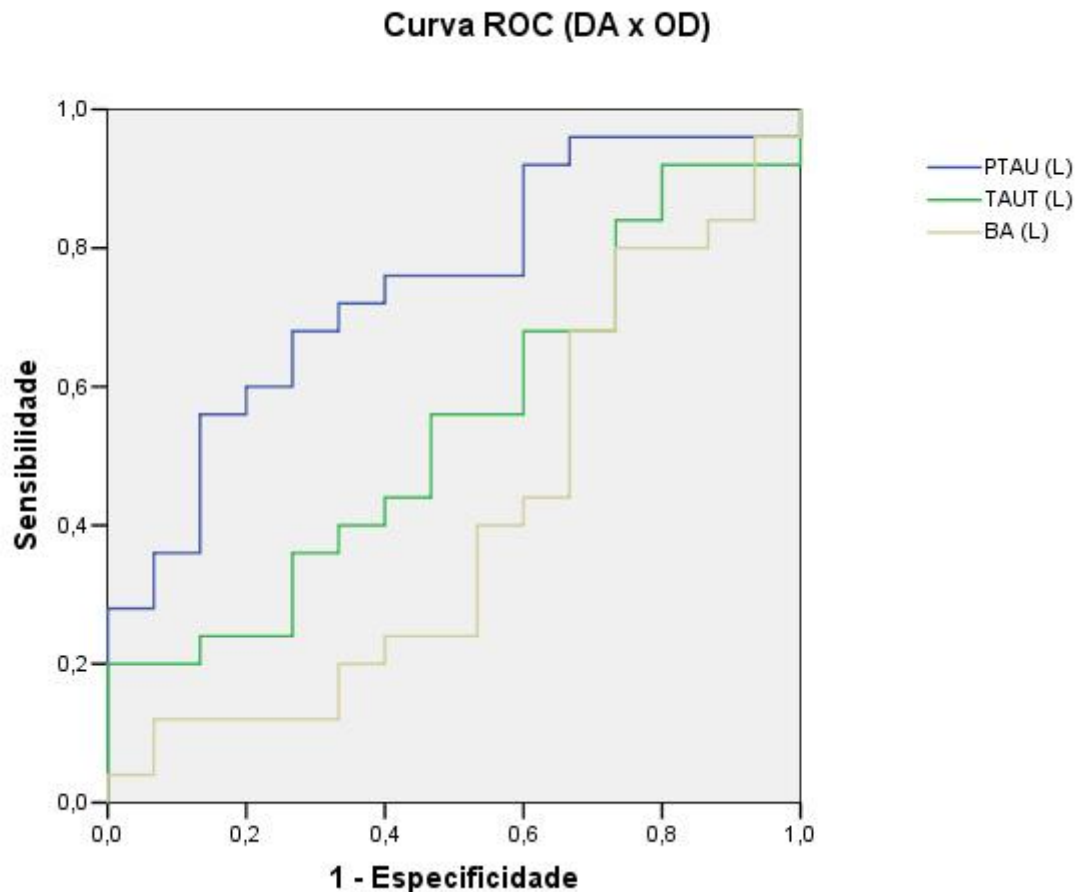


Gráfico 10 - Determinação da sensibilidade e especificidade dos três biomarcadores estudados (Tau-T, P-Tau e β A) nos grupos DA versus OD.

Tabela 22 - Parâmetros utilizados para a determinação da curva ROC para o grupo DA versus OD, no LCR.

Características	Área	Valor p (a)	Intervalo de confiança 95%	
			Limite mínimo	Limite máximo
Tau-T	0,544	0,516	0,280	0,610
P-Tau	0,747	0,031**	0,526	0,838
β A	0,408	0,335	0,585	0,890

a Hipótese nula = 0.05

No ponto de corte de 31,3015pg/ μ L de P-Tau, observamos uma sensibilidade de 72% e especificidade de 67%. Para os outros biomarcadores, Tau-T e β A, não foi encontrado nenhum ponto de corte onde o marcador pudesse ser utilizado para diferenciar DA de OD.

Ao realizarmos a curva ROC na saliva, entre o grupo DA versus CT, obtivemos o seguinte perfil observado no Gráfico11 e os resultados como listados na Tabela 23.

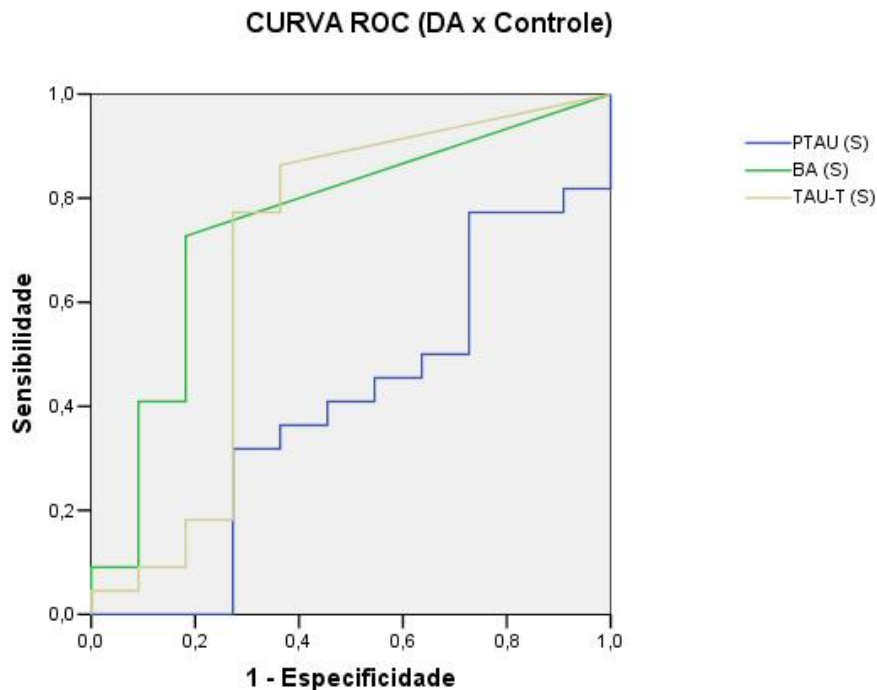


Gráfico 11 - Determinação da sensibilidade e especificidade dos três biomarcadores estudados (Tau-T, P-Tau e β A) nos grupos DA versus CT.

Na Tabela 23, observamos que houve diferença significativa para a proteína β A, cujo ponto de corte de 11,9056 apresenta sensibilidade de 70% e especificidade de 80%.

Tabela 23 - Parâmetros utilizados para a determinação da curva ROC para o grupo DA *versus* CT na saliva.

Características	Área	Valor p (a)	Intervalo de confiança 95%	
			Limite mínimo	Limite máximo
Tau-T	0,692	0,076	0,462	0,922
P-Tau	0,401	0,359	0,189	0,612
β A	0,752	0,020**	0,566	0,938

a Hipótese nula = 0.05

Quando analisamos a saliva entre o grupo DA *versus* OD, verificamos o perfil da curva ROC demonstrado no Gráfico 12.

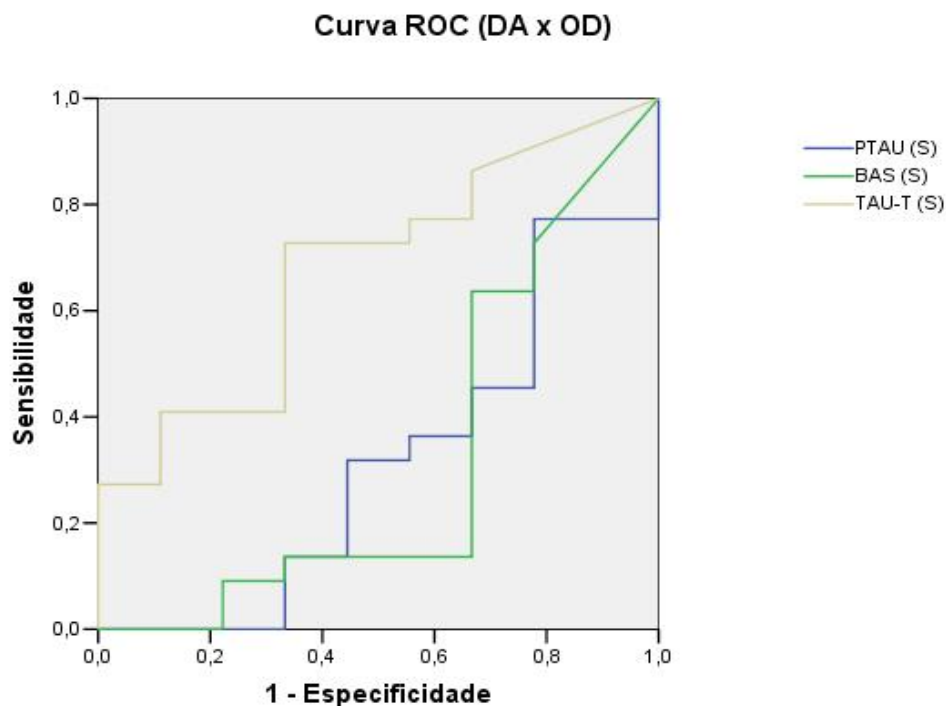


Gráfico 12 - Determinação da sensibilidade e especificidade dos três biomarcadores estudados (Tau-T, P-Tau e β A) nos grupos DA *versus* OD.

Quando analisamos a curva ROC para o grupo DA *versus* OD, não observamos nenhuma diferença estatisticamente significativa para os biomarcadores presentes na saliva (Tabela 24).

Tabela 24 - Parâmetros utilizados para a determinação da curva ROC para o grupo DA *versus* OD na saliva.

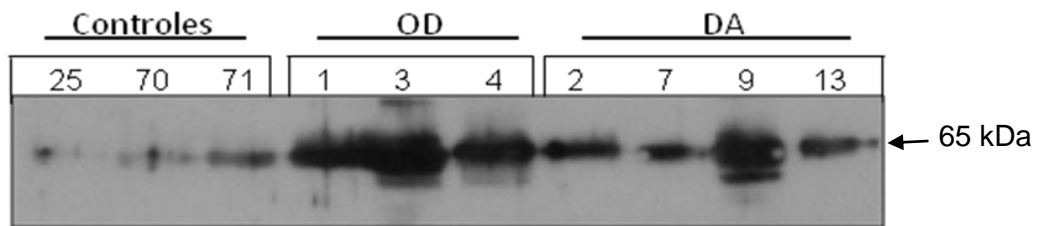
Características	Área	Valor p (a)	Intervalo de confiança 95%	
			Limite mínimo	Limite máximo
Tau-T	0,679	0,122	0,477	0,882
PTau	0,313	0,107	0,096	0,531
βA	0,318	0,117	0,077	0,560

a Hipótese nula = 0.05

5.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS OBTIDOS NO WESTERN BLOT.

A partir do raspado da mucosa oral, obtivemos a quantificação dos níveis de expressão das proteínas Tau-T através da análise por densitometria. Na Figura 4A, observa-se a expressão da proteína Tau-T nos três grupos estudados e, na Figura 4B, a expressão da proteína P-Tau.

A)



B)

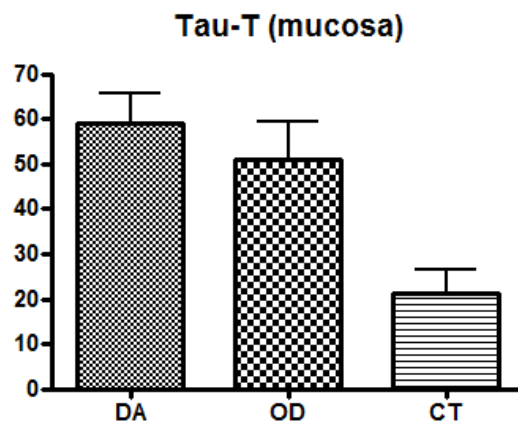


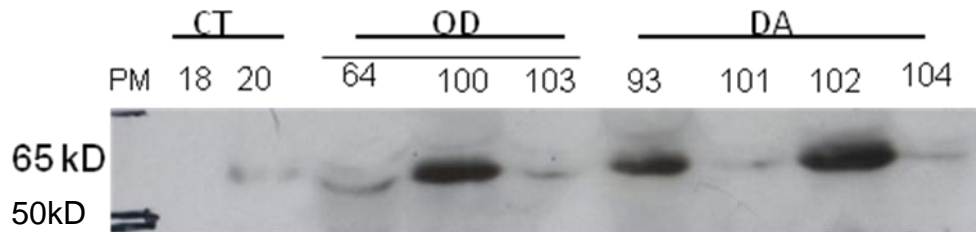
Figura 4 - **Análise da Expressão da proteína Tau-T em amostras de células da mucosa oral.** As células foram obtidas da mucosa oral dos três grupos estudados e submetidos à análise dos níveis de Tau-T por Western blot como descrito em Material e Métodos. **(A)** Autorradiografia representativa e **(B)** análise densitométrica da expressão de proteína Tau-T nos três grupos estudados: DA=doença de Alzheimer, OD = outras demências, CT = controles. Peso molecular da proteína – 65kDa.

Por meio de análise de densitometria da membrana com o software Image J, nota-se que os pacientes com DA apresentam níveis de expressão da proteína Tau-T inalterados quando comparados aos pacientes do grupo OD. Entretanto, o grupo DA quando comparado ao grupo CT, apresentaram aumento da expressão de Tau-T, que foi significativo ($p < 0,01$). O mesmo foi observado quando comparamos o grupo OD com o grupo CT ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos como mediana e submetidos à análise One-Way Anova com pós-teste de correção de Bonferroni.

Foi realizada também a análise da proteína P-Tau na mucosa dos três grupos diagnósticos (DA, OD e CT). Na Figura 5A, verifica-se a expressão desta proteína nos três grupos. Na Figura 5B foi feita a análise densitométrica desta proteína nos três grupos.

Na análise de densitometria de membrana com o software Image J, nota-se que os pacientes DA apresentam níveis de expressão da proteína P-Tau inalterados quando comparados aos pacientes do grupo OD. Entretanto, o grupo DA quando comparado ao grupo CT), apresenta aumento da expressão de P-Tau, que foi significativo ($p < 0,001$). O mesmo foi observado quando comparamos o grupo OD com o grupo CT ($p < 0,05$). O nível de significância foi maior entre os grupos DA x CT. Os resultados foram expressos como mediana e submetidos a análise One-Way Anova com pós-teste de comparação de Bonferroni.

A)



B)

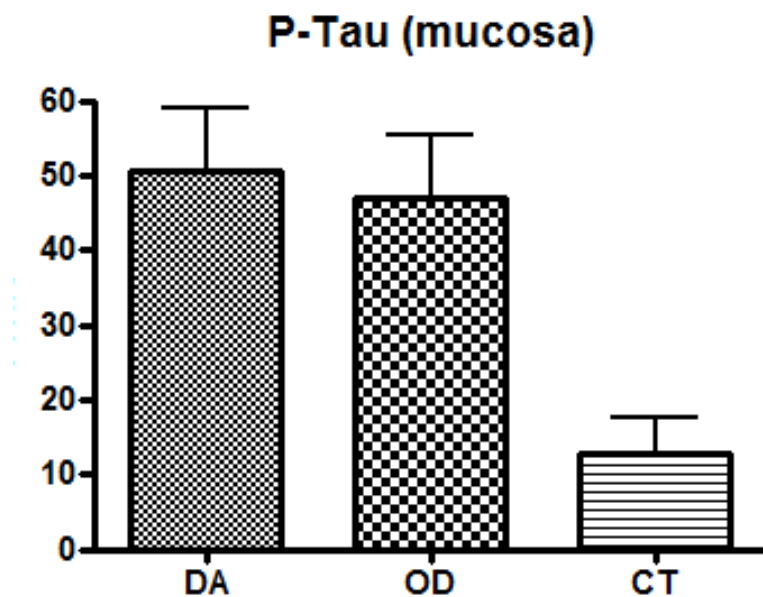


Figura 5 - **Análise da Expressão da proteína P-Tau em amostras de células da mucosa oral.** As células foram obtidas da mucosa oral dos três grupos estudados e submetidos à análise dos níveis de P-Tau por Western blot como descrito em Material e Métodos. **(A)** Autorradiografia representativa e **(B)** análise densitométrica da expressão de proteína P-Tau nos três grupos estudados: DA=doença de Alzheimer, OD = outras demências, CT = controles. Peso molecular da proteína – 65kDa.

6 DISCUSSÃO

O diagnóstico da DA permanece como um grande desafio para a saúde pública mundial. A pesquisa de um biomarcador ideal tanto no LCR, quanto em sangue, saliva e mucosa, assim como em métodos de neuroimagem, permanecem sendo alvo de muitos estudos.

De acordo com Borroni e colaboradores (2006), o biomarcador ideal deve apresentar características que possam distinguir a DA de outras demências, ser capaz de detectar alterações fisiológicas da doença precocemente, ter baixo custo, não ser invasivo.

A utilização da saliva (Bermejo-Pareja et al., 2010) e de células da mucosa oral (Hattori et al., 2002) é justificada pela fácil obtenção destes materiais. Assim a coleta deste material deve ser feita com cuidado, principalmente no seu manuseio e processamento, afim de evitarmos contaminação dos mesmos. Os biomarcadores no LCR têm sido amplamente estudados (Clark et al., 2008; Hampel et al., 2009; Mattson et al., 2009; Zetterberg et al., 2009; van Harten et al., 2010; Demarin et al., 2011).

Portanto, o objetivo de nosso trabalho foi correlacionar os resultados da expressão das proteínas β A, Tau-T e P-Tau, obtidos no LCR e já descritos na literatura, com os achados na saliva e na mucosa oral dos pacientes com DA e controles cognitivamente saudáveis.

Em nossos estudos verificamos diferença significativa ao analisarmos a proteína β A no LCR entre os grupos DA x CT e OD x CT (Gráfico1). A avaliação das medianas nos mostra que a expressão da proteína β A-42 no LCR de controles está reduzida quando comparada ao grupo DA e CT. Os resultados obtidos diferem da literatura, pois não foi observada redução na expressão deste peptídeo no grupo DA quando comparada aos outros grupos. Algumas hipóteses podem ser levantadas no intuito de explicar nossos resultados. O tamanho amostral reduzido e ainda o tipo de armazenamento do LCR, em freezer -20° C ao invés de -80° C, como sugere a literatura (Hu, et al., 2010), que pode ter levado à instabilidade do material. O tempo de armazenamento está condizente com os autores, uma média de 8,7 anos e

desvio-padrão de 3,6 anos. Nosso material ficou armazenado por um período inferior a dois anos.

Ao fazermos a correlação entre os resultados obtidos no LCR e na saliva, observamos que para β A-42 esta foi significativa entre os grupos DA x CT, o que significa que à medida que a proteína β A-42 aumenta no LCR, o mesmo é observado na saliva. Esses dados são condizentes com a literatura, como já descrito anteriormente, pois se sugere que a β A-42 diminui no LCR de pacientes com DA em função da redução do *clearance* para fora do SNC. (Mawuenyega et al., 2011).

Com relação à expressão da β A-42 na saliva dos pacientes analisados, observamos que existe uma diferença significativa quando comparamos o grupo DA com o grupo CT. Este dado é interessante, pois de acordo com Bermeja-Pareja e colaboradores em um estudo realizado em 2010, há aumento da expressão da proteína β A-42 na saliva dos pacientes com DA, sugerindo que este possa ser um marcador potencial da DA, uma vez que quando comparada a saliva de pacientes DA com OD não houve diferença.

Outra proteína utilizada como biomarcador para a DA, além da proteína β A-42, é a proteína Tau-T e sua forma fosforilada, P-Tau. Concentrações de Tau-T são consideradas como sendo um marcador geral da neurodegeneração (Blennow et al., 2003) enquanto as concentrações de P-Tau estão relacionadas com a presença de emaranhados neurofibrilares (van Harten, et al., 2011). Juntas, essas proteínas apresentam sensibilidade e especificidade de 80% a 90% entre o grupo DA e controles. Aproximadamente 80% dos pacientes diagnosticados clinicamente como DA, tem níveis aumentados de proteína Tau no LCR (Andreasen et al., 1999; Blennow et al., 2001; Clark et al., 2008). Estudos com autópsia confirmam essa associação e validam a relação existente entre altos níveis de Tau no LCR e o diagnóstico patológico da DA.

Ao analisarmos os resultados obtidos de Tau-T no LCR observamos que não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos, como pode ser observado no Gráfico 5. O mesmo foi observado na saliva. As hipóteses para explicar esta discrepância com relação à literatura são as mesmas utilizadas

para interpretar os resultados obtidos com a proteína β A. Não foi observada correlação entre as concentrações de Tau-T no LCR e na saliva.

A proteína P-Tau apresenta aproximadamente 30 epítopos na DA (Buerger et al., 2006), sendo as mais comuns treonina 181, serina 199 e treonina 231. Enquanto níveis aumentados de P-Tau 181 podem ser úteis na distinção da DA de outras demências, a quantificação de Tau-T parece ser melhor para distinguir pacientes com DA de indivíduos cognitivamente saudáveis (Clark et al., 2008). De acordo com o Gráfico 6 e Tabela 12, pode-se verificar que há uma diferença significativa entre o grupo DA x OD, sendo que essa diferença não é observada no grupo controle. Mais uma vez, os resultados obtidos em nosso estudo, não condizem com os resultados observados na literatura. Sustentamos a hipótese do número de nossas amostras ter sido baixo e a estocagem do LCR, que podem ter influenciado negativamente nossos resultados. Ao analisarmos a expressão de proteína P-Tau na saliva, os resultados não conferem com os resultados encontrados no LCR, onde não houve diferença significativa. Ao fazermos a correlação entre os resultados obtidos no LCR e na saliva, não observamos nenhum resultado significativo, o que indica que não há correlação entre LCR e saliva nos grupos estudados, pois de acordo com os resultados obtidos, a relação é inversa: enquanto a P-Tau aumenta no LCR, diminui na saliva e/ou vice-versa.

Nas análises de sensibilidade e especificidade de nossos biomarcadores, verificamos que no LCR não encontramos valores ótimos para nenhum deles. Sabe-se que a sensibilidade e especificidade encontrados na razão entre Tau-T/ β A é de 85% (Andreasen et al., 2001) e em nosso estudo não conseguimos encontrar resultados similares devido ao tamanho de nossa amostra. Para a saliva, não fizemos esta relação, pois existem muitos faltantes em nossa amostra. Isto provavelmente foi consequência de efeitos colaterais de medicações em uso ou ainda de dificuldades de colaboração de alguns pacientes. Mesmo em relação a dados que tínhamos, várias dosagens se aproximavam de zero, e por isso a análise da correlação não seria possível.

A proteína Tau, apresenta perfis de banda que são dependentes do anticorpo anti-Tau fosfo-específico (Santpere et al., 2006). A Tau é expressa em seis diferentes isoformas que variam de 43 a 65kd (Ingelson et al., 1996).

Foi demonstrado que a proteína Tau não é expressa apenas nos neurônios, mas também em astrócitos, oligodendrócitos e em vários tecidos periféricos de diferentes espécies (Ingelson et al., 1996).

Hattori e colaboradores em 2002 realizaram um estudo que analisaram a mucosa oral de pacientes com DA e CT e observaram que o peso molecular da proteína Tau encontrado era de 65kd e 110kd, que foram chamados de pequena Tau e grande Tau, respectivamente (Oyama et al., 1996). Essas proteínas são detectadas na maioria de tecidos não neurais.

De acordo com os resultados obtidos em nosso estudo, verificamos que houve diferença significativa na expressão tanto da proteína Tau-T quanto da proteína P-Tau na mucosa, quando comparamos os grupos DA x CT. Estes resultados nos levam a acreditar que estes biomarcadores podem ser detectados a partir do raspado oral, sem que haja necessidade de um procedimento mais invasivo, como a punção lombar. Desse modo, trata-se de material fácil de ser obtido, processado e armazenado. A mucosa oral é constituída de epitélio estratificado cuja origem é o ectoderma, que também origina o tubo neural primitivo.

Quando analisamos os resultados obtidos no LCR, saliva e mucosa, verificamos que, em relação aos resultados da proteína Tau-T, esta apresentou níveis de significância apenas na mucosa, enquanto que no LCR e saliva os resultados obtidos não foram significativos. O mesmo é observado quando analisamos os resultados da expressão da proteína P-Tau. Ao compararmos os resultados obtidos no LCR e saliva observamos que a expressão desta proteína não é significativa ao compararmos o grupo DA x CT. Sendo assim, não obtivemos correlação entre os materiais biológicos utilizados para servir como método diagnóstico para a DA.

Verificamos diferenças entre os grupos em relação à idade e sexo, mas acreditamos não terem influenciado nos resultados, portanto, não podendo ser imputados como responsáveis pela falta de resultados positivos e em acordo com a literatura. Para a variável MEEM, houve diferenças entre os grupos DA x CT e OD x CT, como esperado em função da natureza diagnóstica dos grupos. Ao correlacionarmos o MEEM com o tempo de doença, foi possível verificar

que existe correlação inversa entre o grupo DA x CT, ou seja, à medida que a doença vai progredindo, o escore do MEEM vai diminuindo, uma vez que a DA está relacionada com o declínio das funções cognitivas (Arcoverde et al., 2008).

Algumas limitações foram observadas ao longo da realização do nosso estudo. Para que o paciente fizesse parte da pesquisa ele e seu responsável assinavam um termo de consentimento, consentindo a punção lombar. Infelizmente, várias pessoas e/ou seus responsáveis se negavam a realizar este procedimento. Este foi o principal problema ao qual enfrentamos. Alguns pacientes com DA ou com OD, mesmo tendo aceitado, tiveram que ser excluídos devido à dificuldades técnicas ou à falta de colaboração no momento da punção. Quanto ao número baixo de amostras de saliva, observamos que muitos dos pacientes não salivavam no momento do exame e, outros casos, em estágio avançado da doença, não conseguiam ficar com o algodão dentro da boca. O único material que conseguimos em 100% dos casos foi o raspado da mucosa oral. Para que realizássemos nosso trabalho, incluímos aqueles participantes que apresentavam, pelo menos, LCR e raspado da mucosa oral.

Mesmo sujeito às limitações apresentadas, os resultados que obtivemos na mucosa são animadores. O LCR é obtido por processo invasivo, doloroso, com certo grau de incômodo para o indivíduo e, às vezes, difícil de conseguir, devido à idade ou estágio da demência. Já a mucosa oral é obtida por um método simples e é fácil de ser armazenada. Ainda, a técnica de *Western blot* é mais específica do que a de ELISA para a identificação das proteínas Tau-T e P-Tau. Esses dados indicam que o epitélio oral reflete alterações patológicas, assim como observado no LCR.

A presença de proteína β A na saliva também se mostrou potencialmente útil para diferir DA de CT. A maior parte dos estudos realizados utiliza o LCR para a detecção dos biomarcadores específicos da DA. Sendo assim, nosso estudo sugere que há níveis significativamente aumentados de proteína β A na saliva de pacientes DA quando comparados aos controles.

Os resultados obtidos neste estudo nos remetem a pesquisas futuras onde esses marcadores serão avaliados longitudinalmente quanto a propósitos preditivos diagnósticos e de avaliação de tratamento.

7 CONCLUSÕES

Os biomarcadores presentes no LCR apresentaram resultados divergentes ao que é difundido na literatura. Os níveis da proteína β A foram significativamente diferentes no grupo DA, porém com expressão aumentada nestes pacientes. Já a concentração da proteína Tau-T não foi diferente entre os grupos e a P-Tau teve expressão aumentada nos indivíduos com DA em comparação com o grupo CT.

Na saliva, a proteína β A apresentou níveis significativamente mais elevados no grupo DA em comparação com o grupo CT, enquanto que a concentração das proteínas Tau-T e P-Tau não apresentaram diferenças entre os grupos diagnósticos.

Na comparação entre os resultados obtidos no LCR e na saliva, verificamos que somente o biomarcador β A apresenta correlação entre estes dois materiais. Esta correlação está presente entre o grupo DA e CT, sugerindo ser este um biomarcador para a DA neste material.

A expressão das proteínas Tau-T e P-Tau na mucosa foi significativamente diferente entre os grupos DA e CT e também entre o grupo OD e CT, sugerindo que a análise deste material possa constituir um método diagnóstico auxiliar na DA.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alafuzoff I, Helisalmi S, Mannermaa A, Soininen H. Severity of cardiovascular disease, apolipoprotein E genotype, and brain pathology in aging and dementia. *Ann N Y Acad Sci.* n.903, p.244-51, 2000.

Alzheimer's Association 2010. <<http://www.alz.org>> Acessado em Março de 2011.

Alzheimer's disease International: World Alzheimer Report, 2009. London. 2009.

Andreasen N, Hesse C, Lindstrom A M, Vanmechelen E, Winblad B, Blennow K. A community-based follow-up study on CSF tau protein in patients with dementia. *Neurobiol Aging*, n.17:S167, 1996.

Andreasen N, Minthon L, Davidsson P, et al. Evaluation of CSF-tau and CSF- Abeta42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice. *Arch Neurol*, n.58, p.373–379, 1996.

Andreasen N, Minthon L, Vanmechelen E *et al.* Cerebrospinal fluid tau and Abeta42 as predictors of development of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Neurosci Lett*, n.273(1), p.5-8, 1999.

Andreasen N, Minthon L, Davidsson P, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Winblad B, Blennow K. Evaluation of CSF-tau and CSF-Abeta42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice. *Arch Neurol.*,58(3):373-9, Mar 2001.

Andreasen N., Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidsson P, Blennow K. Cerebrospinal fluid levels of total-tau, phospho-tau and AB42 predicts development of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Acta Neurologica Scandinavica*, n.107, p.47-51, 2003.

Arai H, Terajima M, Miura M *et al.* Tau in cerebrospinal fluid: a potential diagnostic marker in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, n.38(4), p.649-52, 1995.

Arai H, Terajima M, Miura M, et al. Elevated cerebrospinal fluid tau protein level as a predictor fo dementia in memory-impaired individuals. *Alzheimer's Research*, n.3, p.211-13, 1997.

Arai H, Clark CM, Ewbank DC *et al.* Cerebrospinal fluid tau protein as a potential diagnostic marker in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, n.19(2), p.125-6, 1998.

Arcoverde C et al . Role of physical activity on the maintenance of cognition and activities of daily living in elderly with Alzheimer's disease. *Arq. Neuro-Psiquiatr.*, São Paulo, v. 66, n. 2b, June 2008 .

Arendt T, Holzer M, Fruth R, Bruckner MK, Gartner U. Phosphorylation of tau, Abeta-formation, and apoptosis after in vivo inhibition of PP-1 and PP-2A. *Neurobiol Aging*, n.19(1), p.3-13, 1998.

Arriagada PV, Louis DN, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles and olfactory dysgenesis. *Lancet.*, 337(8740):559, 1991.

Arriagada PV, Marzloff K, Hyman BT. Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease. *Neurology*, v. 42(9), p.1681-8, 1992.

Attems J, Lintner F, Jellinger KA: Olfactory involvement in aging and Alzheimer's disease: an autopsy study. *J Alzheimers Dis*, 7:149-157, 2005.

Bateman RJ, Wen G, Morris JC, Holtzman DM. Fluctuations of CSF amyloid-beta levels: implications for a diagnostic and therapeutic biomarker. *Neurology*,68:666–9, 2007.

Bermejo-Pareja F, Antequera D, Vargas T, Molina JA, Carro E. Saliva levels of Abeta1-42 as potential biomarker of Alzheimer's disease: a pilot study. *BMC Neurol.*, 3;10:108, Nov 2010.

Biagioni, MC; Glavin, JE. Using biomarkers to improve detection of Alzheimer's Disease. *Neurodegen. Dis. Manage.*,1(2):1-13, 2011.

Blennow K, Wallin A, Agren H, Spenger C, Siegfried J, Vanmechelen E. Tau protein in cerebrospinal fluid: a biochemical marker for axonal degeneration in Alzheimer disease? *Mol Chem Neuropathol*, n.26(3), p.231-45, 1995.

Blennow K, Vanmechelen E, Hampel H. CSF total tau, A-beta42 and phosphorylated tau protein as biomarkers for Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 24: 87–97, 2001.

Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* n.2, p.605–613, 2003.

Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet.*, n.368 (9533), p.387-403, 2006.

Blennow K, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.*, n.18(2), p.413-7, 2009.

Blessed G, Tomlinson B E & Roth M. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Brit. J. Psychiat.* n.114, p.797-811, 1968.

Borroni B, Di Luca M, Padovani A. Predicting Alzheimer dementia in mild cognitive impairment patients. Are biomarkers useful? *Eur J Pharmacol.*,545(1):73-80, 2006.

Bottino CMC, Azevedo Jr D, Tatsch M et al. Estimate of Dementia Prevalence in a community sample of from São Paulo, Brazil. *Dement Geriatr Cogn Disord*, v. 26, p.291-299, 2008.

Braak H, Braak E. Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand*, n.165, p.3-12, 1996.

Braak H, De Vos Ra, Jansen En, Bratzke H, Braak E Neuropathological hallmarks of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Prog Brain Res*, v.117, p.267-285, 1998.

Brandt R, Hundelt M, Shahani N. Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models. *Biochim Biophys Acta*. 3;1739(2-3):331-54, 2005.

Brion JP, Smith C, Couck AM, Gallo JM, Anderton BH. Developmental changes in tau phosphorylation: fetal tau is transiently phosphorylated in a manner similar to paired helical filament-tau characteristic of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 61(6):2071-80, 1993.

Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, MH Arrighi. "Forecasting the global burden of Alzheimer's disease". *Alzheimer's and Dementia*, v.3 (3), p.186-91, 2007.

Brucki SM, Nitrini R, Caramelli P, Bertolucci PH, Okamoto IH. Suggestions for utilization of the mini-mental state examination in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*.,61(3B):777-81, 2003.

Buée L, Bussièrè T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev*. 33(1):95-130, 2000.

Buerger K, Teipel SJ, Zinkowski R et al. CSF tau protein phosphorylated at threonine 231 correlates with cognitive decline in MCI subjects. *Neurology*, v.59(4), p.627-9, 2002a.

Buerger K, Zinkowski R, Teipel SJ et al. Differential diagnosis of Alzheimer disease with cerebrospinal fluid levels of tau protein phosphorylated at threonine 231. *Arch Neurol*, v.59 (8), p.1267-72, 2002b.

Buerger K, Ewers M, Pirttilä T, Zinkowski R, Alafuzoff I, Teipel SJ. CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain*, 29:3035-41, 2006.

Burgernee Buch K, Padberg F, Nolde T et al. Cerebrospinal fluid tau protein shows a better discrimination in young old (<70 years) than in old old patients with Alzheimer's disease compared with controls. *Neurosci Lett*, n.277(1), p.21-4, 1999.

Caramelli P, Robitaille Y, Laroche-Cholette A *et al.* Structural correlates of cognitive deficits in a selected group of patients with Alzheimer's disease. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol* n.11(4), p.184-90, 1998.

Caramelli P, Carvalho VA. Doença de Alzheimer. Em: Teixeira AL, Caramelli P, editores. *Neurologia Cognitiva e do Comportamento*. Rio de Janeiro: Revinter, p. 246-259. 2011.

Clark LM, Bosworth HB, Welsh-Bohmer KA, Dawson DV, Siegler IC. Relation between informant-rated personality and clinician-rated depression in patients with memory disorders. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol.*,13(1):39-47, 2000.

Clark CM, Xie S, Chittams J, Ewbank D, Peskind E, Galasko D, Morris JC, McKeel DW Jr, et al. Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid: how well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses. *Arch Neurol*, n.60, p.1696–1702, 2003.

Clark CM, Davatzikov C, Borthkur A, Newberg A, Leight S, Lee VMY, Trojanowski JQ. Biomarkers for Early detection of Alzheimer Pathology. *Neurosignals.* 16(1): 11-18, 2008.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* n.26, p.921-3, 1993.

Demarin V, Zavoreo I, Kes VB, Simundic AM. Biomarkers in Alzheimer disease. *Clin Chem Lab Med.*, 49(5): 773-778, 2011.

Dickson DW Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies. *Neurobiol Aging*, v.18, p.S21-S26, 1997.

Diniz BSO, Tavares A. – As Bases Biológicas da Doença de Alzheimer. *Rev Med Minas Gerais*.11(2): 92-7, 2001.

Dreses-Werringloer U, Lambert JC, Vingtdeux V, Zhao H, Vais H, Siebert A, Jain A, Koppel J, et al. A polymorphism in CALHM1 influences Ca²⁺ homeostasis, Aβ levels, and Alzheimer's disease risk. *Cell*, n.133, p.1149–61, 2008.

Eastwood R, Reisberg B. Mood and behaviour. In: Gauthier S, editor. *Clinical Diagnosis and Management of Alzheimer's Disease*. London: Martin Dunitz Ltd., p. 175-90, 1996.

Emre M, Aarsland D, Brown R, Burn DJ, Duyckaerts C, Mizuno Y, Broe GA, et al. Clinical diagnostic criteria for dementia associated with Parkinson's disease. *Mov Disord.*,22(12):1689-707, 2007 Sep 15.

Ertekin-Taner N. Genetics of Alzheimer's disease: a centennial review. *Neurol Clin*, 25(3):6111-67, 2007.

Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, Hebert LE, Hennekens CH, Taylor JO. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA* ; v.10; 262 (18), p. 2551-6, 1989.

Ewers M, Buerger K, Teipel SJ, Scheltens P, Schroöder J, Zinkowski RP. Multicentre assessment of CSF-phosphorylated tau for the prediction of conversion of MCI. *Neurology*,69: 2205–12, 2007.

Fagan AM, Mitun MA, Mach RH, Lee SY, Dence CS, Shah AR. Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *AnnNeurol*, 59:512-519, 2006.

Fagan AM, Roe CM, Xiong C, Mintun MA, Morris JC, Holtzman DM. Cerebrospinal Fluid tau/ β -Amyloid42 Ratio as a Prediction of Cognitive Decline in Nondemented Older Adults. *Arch Neurol.*,64(3):343-349, 2007.

Folstein MF, Folstein SE, Mchugh PR. "Mini-Mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Psychiatri. Res.*,12:189-198, 1975.

Forlenza OV, Diniz BS, Gattaz WF. Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease. *BMC Med.* v. 22 p.8:89, 2010.

Frederikse PH, Garland D, Zigler JS Jr, Piatigorsky J: Oxidative stress increases production of beta-amyloid precursor protein and betaamyloid (Abeta) in mammalian lenses, and Abeta has toxic effects on lens epithelial cells. *J Biol Chem*, 271:10169-10174, 1996.

Fukuchi K, Li L, Hart M, Lindsey JR: Accumulation of amyloid-beta protein in exocrine glands of transgenic mice overexpressing a carboxyl terminal portion of amyloid protein precursor. *Int J Exp Pathol*, 81:231-239, 2000.

Galasko D, Hansen L, Vigo-Pelfrey C, et al. Antemortem CSF tau is related to neuronal pathology at autopsy in Alzheimer's disease. *Soc Neurosci Abstr*, (21):581, 1995.

Galasko D, Motter R, Seubert P. Interpreting cerebrospinal fluid tau levels in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* v.17:S1, 1996.

Galasko D, Chang L, Motter R, Clark CM, Kaye J, Knopman D, Thomas R, et al. High cerebrospinal fluid tau and low amyloid beta42 levels in the clinical diagnosis of Alzheimer disease and relation to apolipoprotein E genotype. *Arch Neurol.*, 55(7):937-45, Jul 1998.

Galasko D. Biological markers and the treatment of Alzheimer's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, Vol.17, N 2, 119-125, 2001.

Galvin, J.E. Dementia screening, biomarkers and protein misfolding: Implications for public health and diagnosis. *Prion.*,5(1):16-21, 2011.

Gasparini L, Racchi M, Binetti G, Trabucchi M, Solerte SB, Alkon D, Etcheberrigaray R, Gibson G, Blass J, Paoletti R, Govoni S: Peripheral markers in testing pathophysiological hypotheses and diagnosing Alzheimer's disease. *FASEB J*, 12:17-34, 1998.

Geula C. Abnormalities of neural circuitry in Alzheimer's disease: hippocampus and cortical cholinergic innervation. *Neurology* v.51(1 Suppl 1), p.S18-29, discussion S65-7, 1998.

Gibb WRG, Luthert PJ, Marsden CD. Corticobasal degeneration. *Brain*, 112:1171-1192, 1989.

Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*. v.3, p.519-526, 1989.

Goedert M, Crowther RA, Garner CC. Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. *Trends Neurosci*, v. 14(5), p.193-9, 1991.

Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA. Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*. n.89, p.1983-1987, 1992.

Goedert M, Hasegawa M. The tauopathies: toward an experimental animal model. *Am J Pathol*, n. 154(1), p.1-6, 1999.

Goedert M, Spillantini MG. A Century of Alzheimer's Disease. *Science* 3, Vol. 314 no. 5800, p. 777-781, November 2006.

Gorelick PB. Risk factors for vascular dementia and Alzheimer disease. *Stroke*, v.35(11 Suppl. 1), p.2620, 2004.

Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, Kertesz A, Mendez M, Cappa SF, Ogar JM, et al. Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology*, 76(11):1006-14, 2011.

Green AJ, Harvey RJ, Thompson EJ, Rossor MN. Increased tau in the cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, v. 259(2), p.133-5, 1999.

Gu Y, Oyama F, Ihara Y. Tau is widely expressed in rat tissues. *J Neurochem.*, v. 67, p.1235-1244, 1996.

Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*. v.8(2), p.101-12, 2007.

Hall CB, Derby C, LeValley A, Katz MJ, Verghese J, Lipton RB. Education delays accelerated decline on a memory test in persons who develop dementia. *Neurology*, vol. 69 no. 17 1657-1664, 2007.

Hampel H, Buerger K, Kohnken R *et al.* Tracking of Alzheimer's disease progression with cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at threonine 231. *Ann Neurol*, v.49(4), p.545-6, 2001.

Hampel H, Buerger K, Zinkowski R, *et al.* Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study. *Arch Gen Psychiatry*, v.61, p.95–102, 2004a.

Hampel H, Mitchell A, Blennow K, Frank RA, Brettschneider S, Weller L, Moller HJ. Core biological marker candidates of Alzheimer's disease—perspectives for diagnosis, prediction of outcome and reflection of biological activity. *J Neural Transm*, v.111, p.247–272, 2004b.

Hampel H, Buerger K, Teipel SJ, Bokde AL, Zetterberg H, Blennow K. Core candidate neurochemical and imaging biomarkers of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. v.4, p.38–48, 2008.

Hampel H, Blennow K, Shaw LM, Hoessler YC, Zetterberg H, Trojanowski JQ. Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.*, 45(1):30-40, 2009.

Hampel H, Blennow K, Shaw LM, Hoessler YC, Zetterberg H, Trojanowski JQ. Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.*, v.45(1), p.30-40, 2010.

Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, *et al.* Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol*, v.5, p.228–234, 2006.

Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. v.256 (5054), p.184–5, 1992.

Harman D. A hypothesis on the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Ann NY*, 786:152-68, 1996.

Hartmann AP, Almeida SM, Livramento JA, Nitrini R, Takahashi D, Caramelli P. Hyperphosphorylated tau protein in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and other dementias: preliminary findings. *Arq Neuropsiquiatr*, v. 62(3B), p.751-755, 2004.

Hasegawa M. Biochemistry and molecular biology of tauopathies. *Neuropathology*, 26:484–90, 2006.

Hattori H, Matsumoto M, Iwai K, Tsuchiya H, Miyauchi E, Takasaki M, Kamino K, *et al.* The tau protein of oral epithelium increases in Alzheimer's disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, v.57(1), p.64-70, 2002.

Herrera E Jr, Caramelli P, Silveira AS, Nitrini R. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, v.16(2), p.103-8, 2002.

Hock C, Golombowski S, Naser W, Muller-Spahn F. Increased levels of tau protein in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease--correlation with degree of cognitive impairment. *Ann Neurol*, v. 37(3), p.414-5, 1995.

Hu WT, Chen-Plotkin A, Arnold SE, Grossman M, Clark CM, Shaw LM, Pickering E, Kuhn M, Chen Y, McCluskey L, et al. Novel CSF biomarkers for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Acta Neuropathol*, 119: 669–678, 2010.

Hu YY, He SS, Wang X *et al.* Levels of nonphosphorylated and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients: an ultrasensitive bienzyme-substrate-recycle enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Pathol*, v.160(4), p.1269-78, 2002.

Hulstaert F, Blennow K, Ivanoiu A *et al.* Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1-42) and tau levels in CSF. *Neurology*, v. 52(8), p.1555-62, 1999.

Hutton M, Lendon CL, Rizzu P *et al.* Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*, v.393(6686), p.702-5, 1998.

Ibach B, Binder H, Dragon M, Poljansky S, Haen E, Schmitz E, Koch H, Putzhammer A, Klunemann H, Wieland W, Hajak G. Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid in Alzheimer patients, disease controls and an age-matched random sample. *Neurobiol Aging*. 2006 Sep;27(9):1202-11. Epub 2005 Aug 8.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, 2008 - <<http://www.ibge.gov.br>> – acessado em Outubro de 2010.

Ingelson M, E. Vanmechelen & L. Lannfelt: Microtubule-associated protein tau in human fibroblasts with the Swedish Alzheimer mutation. *Neurosci Lett*, 220, 9-12, 1996.

Iqbal K, Adel C, Chen S, et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochem Biophys Acta*; v.13, p.198-210, 2005.

Ishiguro K, Ohno H, Arai H *et al.* Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, v. 270(2), p.91-4, 1999.

Itoh N, Arai H, Urakami K, et al. Large-scale, multicenter study of cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at serine 199 for the antemortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, v.50, p.150–156, 2001.

Iwatsubo T. Amyloid deposits and plaque formation. Cap. 10, p. 147-156, 2000 In: Neurodegenerative dementias. Clinical features and pathological mechanisms. McGraw-Hill, New York, USA.

Jensen M, Basun H, Lannfelt L. Increased cerebrospinal fluid tau in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, v. 186(2-3), p.189-91, 1995.

Jensen M, Schröder J, Blomberg M, Engvall B, Pantel J, Ida N, Basun H, et al. Cerebrospinal fluid A beta42 is increased early in sporadic Alzheimer's disease and declines with disease progression. *Ann Neurol*,45(4):504-11, Abr 1999.

Kahle PJ, Jakowec M, Teipel SJ *et al.* Combined assessment of tau and neuronal thread protein in Alzheimer's disease CSF. *Neurology*,54(7):1498-504, 2000.

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, *et al.* The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, v.325, p.733 – 736, 1987.

Kapaki E, Paraskevas GP, Zalonis I, Zournas C. CSF tau protein and beta-amyloid (1-42) in Alzheimer's disease diagnosis: discrimination from normal ageing and other dementias in the Greek population. *Eur J Neurol*, 10(2):119-128, 2003.

Katzman R, Terry R, DeTeresa R, *et al.* Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann Neurol*, 23:138-144, 1988.

Kennedy JL, Farrer LA, Andreade NC, Mayeux R, George-Hyslop PS. The Genetics of Adult-Onset Neuropsychiatric Disease: Complexities and Conundra? *Science*, v. 302 (5646), p.822-826, 2003.

Kimura M, Asada T, Uno M *et al.* Assessment of cerebrospinal fluid levels of serum amyloid P component in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, v.273(2), p.137-9, 1999.

Kirshner HS, Lavin PJ. Posterior cortical atrophy: a brief review. *Curr Neurol Neurosci Rep*.;6(6):477-80, 2006.

Kohnken R, Buerger K, Zinkowski R *et al.* Detection of tau phosphorylated at threonine 231 in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett*, v. 287(3), p.187-90, 2000.

Kuperstein I, Broersen K, Benilova I, Rozenski J, Jonckheere W, Debulpaep M, Vandersteen A, *et al.* Neurotoxicity of Alzheimer's disease A β peptides is induced by small changes in the A β 42 to A β 40 ratio. *EMBO J*. 2010 Oct 6;29(19):3408-20. Epub 2010 Sep 3.

Kurt, A. Jellinger. The enigma of vascular cognitive disorder and vascular dementia. *Acta Neuropathol*,113:349–388, 2007.

Kurz A, Riemenschneider M, Buch K *et al.* Tau protein in cerebrospinal fluid is significantly increased at the earliest clinical stage of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, v.12(4), p.372-7, 1998.

Kwon JM, Nowotny P, Shah PK *et al.* Tau polymorphisms are not associated with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, v.284(1-2), p.77-80, 2000.

Lambert JC, Amouyel P. Genetic heterogeneity of Alzheimer's disease: Complexity and advances. *Psychoneuroendocrinology* n.32 (Suppl. 1), S62–S70, 2007.

Larson EB, Wang L, Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Crane P. *et al.* Exercise is associated with reduced risks for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Annals of internal medicine*, v.144, p.73-81, 2006.

Laurin D, Verreault R, Lindsay J, Macpherson K, Rockwood K. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch. Neurol.* v. 58, p. 498-504, 2001.

Lindsay J. & Anderson L. Dementia / Alzheimer's Disease. *BMC Womens Health.*;4 Suppl 1:S20. 2004.

Lindwall G, Cole RD. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem*, v.259(8), p.5301-5, 1984.

Lopes M, Bottino CMC. Prevalência de demência em diversas regiões do mundo. Análise dos estudos epidemiológicos de 1994 a 2000. *Arq Neuropsiquiatr*,60(1):61-69, 2002.

Lopes MA, Hototian SR, Azevedo Jr D *et al.* Prevalence of dementia and Alzheimer's disease in Ribeirão Preto, Brazil: A community survey in ederly population. *In: 12th International Meeting of the International Psychogeriatric Association, Stocolmo. International Psychogeriatrics*, n.17, p.210-210, 2005.

Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* n.23 (1), p. 134-147, 1997.

Maruyama M, Arai H, Sugita M *et al.* Cerebrospinal fluid amyloid beta(1-42) levels in the mild cognitive impairment stage of Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, v.172(2), p.433-6, 2001.

Masliah E, Mallory M, Deerinck T *et al.* Re-evaluation of the structural organization of neuritic plaques in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, v.52(6), p.619-32, 1993.

Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, *et al.* CSF Biomarkers and Incipient Alzheimer Disease in Patients With Mild Cognitive Impairment. *JAMA*. 302(4):385-393, 2009.

Mattsson, N. CSF biomarkers in neurodegenerative diseases. *Clin. Chem. Lab. Med.*,49(3): 345-352, 2011.

Maurer, K. *et al.* Auguste D. and Alzheimer's disease. *Lancet* v.349, p.1546- 49, 1997.

Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science*. 24;330(6012):1774, 2010.

Mayeux R. Epidemiology of neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience*, v.26, p.81-104, 2003.

McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging–Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.*, 7:263–269, 2011.

Mecocci P, Cherubini A, Bregnocchi M *et al.* Tau protein in cerebrospinal fluid: a new diagnostic and prognostic marker in Alzheimer disease? *Alzheimer Dis Assoc Disord*, v.12(3), p.211-4, 1998.

Mirra SS, Heyman A, McKeel D *et al.* The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*, v.41(4), p.479-86, 1991.

Molina L, Touchon J, Lefranc D, Vermesch P, Pau B, Mourton-Gilles C. Detection of tau protein in cerebrospinal fluid from Alzheimer's patients *Neurobiology of Aging*, n.17, pS166, 1996.

Molina L, Touchon J, Herpe M *et al.* Tau and apo E in CSF: potential aid for discriminating Alzheimer's disease from other dementias. *Neuroreport*, v. 10(17), p3491-5, 1999.

Moller HJ, Graeber MB. The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. *Europ Arch Psychiat Clin Neuroscience*, v. 248 (3), p. 111—122, 1998.

Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, Barbour R, Johnson-Wood K, et al. Reduction of beta-amyloid peptide₄₂ in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol.*,38(4):643-8, 1995.

Mount C, Downton C. Alzheimer disease: progress or profit? *Nat Med.*,12(7):780-4, jul, 2006.

Nakamura T, Shoji M, Harigaya Y, Watanabe M, Hosoda K, Cheung TT, et al. Amyloid β protein levels in cerebrospinal fluid are elevated in early-onset Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, Vol 36, Issue 6, pages 903–911, 1994.

National Intitute of Aging, 2007 - <<http://www.nia.nih.gov>> - acessado em dez de 2010.

Neary D, Snowden JS, Gustafson L, Passant U, Stuss D, Black S, Freedman M, et al. Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology.*, 51(6):1546-54, 1998.

Nitrini R, Bottino CMC, Abdala, C et al. Prevalence of dementia in Latin America: a collaborative study of population based cohorts. *International Psychogeriatrics*, v.21, p622-630, 2009.

Oh YS, Turner RJ: Effect of gamma-secretase inhibitors on muscarinic receptor-mediated calcium signaling in human salivary epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291:76-82, 2006.

Ohru T, Yamaya M, Arai H, Sekizawa K, Sasaki H. Disturbed consciousness and asthma. *Lancet*, v.349(9052), p.652, 1997.

Okamoto, I.H. Aspectos cognitivos da doença de Alzheimer no teste do relógio: avaliação de amostra da população brasileira. [s.n.], 2001. Doutorado -- Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Curso de Neurologia, São Paulo, 2001.

Otto M, Wiltfang J, Tumani H et al. Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett*, v.225(3), p.210-2, 1997.

Oyama F, Gu Y, Murakami N, Nonaka I, Ihara Y. Non-neuronal tau: transient upregulation and subsequent accumulation of big and small tau in chloroquine myopathy. In: Iqbal K, Wiblad B, Nishimura T, Takeda M, Wisiewski HM, eds. *Alzheimer's Disease: Biology, Diagnosis and Therapeutics*. Chichester, UK: John Wiley and Sons; p.437-445, 1996.

Parihar, M.S; Hemnani, T. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *Journal of Clinical Neuroscience*. Vol11, Issue 5,456-467, 2004.

Parnetti L, Lanari A, Amici S, Gallai V, Vanmechelen E, Hulstaert F. CSF phosphorylated tau is a possible marker for discriminating Alzheimer's disease from dementia with Lewy bodies. Phospho-Tau International Study Group. *Neurol Sci*, v.22(1), p.77-8, 2001. Notes: CORPORATE NAME: Phospho-Tau International Study Group.

Passos GF. Caracterização do envolvimento de quimiocinas nas alterações moleculares e comportamentais induzidas pelo peptídeo beta-amilóide (1-40) em camundongos. 2009. 139f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Catarina Centro De Ciências Biológicas, Departamento de Farmacologia, 2009.

Pastor P, Goate AM. Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Curr. Psychiatry Rep*. n.6, p.125-133, 2004.

Paula VJR, Guimaraes FM, Forlenza OV. Papel da proteína Tau na fisiopatologia da demência frontotemporal. *Rev. psiquiatr. clín.*, São Paulo, v. 36, n. 5, 2009 .

- Petersen RC, Doody R, Kurz A, et al. Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch Neurol.*, v. 58, p.1985-1992, 2001.
- Petrella JR, Coleman RE, Doraiswamy PM. Neuroimaging and early diagnosis of Alzheimer disease: a look to the future. *Radiology.*, v.226(2), p.315–336, 2003.
- Qiu C, Ronche D, Fratiglioni L. The epidemiology of the dementias: an update. *Curr Opin Psychiatry*, v.20, p.380-385, 2007.
- Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci.* ,11(2):111-28, 2009.
- Reisberg B. Functional assessment staging (FAST). *Psychopharmacol Bull*;24:653-5, 1988.
- Ritchie, K. & Lovestone, S. The dementias. *Lancet*, v.360, p.1759-1766, 2002.
- Román GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T, Cummings JL, Masdeu JC, Garcia JH, Amaducci L, Orgogozo JM, Brun A, Hofman A, et al. Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop. *Neurology.*,43(2):250-60, 1993.
- Santpere G, Puig B, Ferrer I. Low molecular weight species of tau in Alzheimer's disease are dependent on tau phosphorylation sites but not on delayed post-mortem delay in tissue processing. *Neurosci Lett*, 399 (1-2): 106-10, 2006 May
- Sayer R, Law E, Connelly PJ, Breen KC: Association of a salivary acetylcholinesterase with Alzheimer's disease and response to cholinesterase inhibitors. *Clin Biochem*, 37:98-104, 2004.
- Shaw LM, Vanderstichele H, Knapik-Czajka M, et al. Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. *Ann Neurol.*, v.65, p.403–413, 2009.
- Scherber A, Richter K, Schaps P: Distribution of antiepileptic drugs between plasma, plasma water, cerebrospinal fluid, saliva and brain. *Monogr Neural Sci*, 5:208-212, 1980.
- Schoonenboom NS, Pijnenburg YA, Mulder C, et al. Amyloid beta(1-42) and phosphorylated tau in CSF as markers for early-onset Alzheimer disease. *Neurology*, v.62, p.1580–1584, 2004.
- Selkoe DJ. Molecular pathology of amyloidogenic proteins and the role of vascular amyloidosis in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 10(5):387-95, 1989, Review.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, 81, p.741-766, 2001.

- Sjögren M, Davidsson P, Gottfries J *et al.* The cerebrospinal fluid levels of tau, growth-associated protein-43 and soluble amyloid precursor protein correlate in Alzheimer's disease, reflecting a common pathophysiological process. *Dement Geriatr Cogn Disord*, v.12(4), p.257-64, 2001.
- Small BJ, Gagnon E, Robinson B. Early identification of cognitive deficits Preclinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Geriatrics*, v. 62, Issue 4, p. 19-24, 2007.
- Smith, M.A.C. Doença de Alzheimer. *Rev Bras Psiquiatr.*, p.3-7, 1999 (Suppl2).
- Sousa LP, Silva BM, Brasil BS, Nogueira S V, Ferreira PC, Kroon EG, Kato K, Bonjardim CA Plasminogen/plasmin regulates-enolase expression through the MEK/ERK pathway. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* v.337, p.1065–1071, 2005.
- Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.95(13), p.7737-41, 1998.
- Stozická Z, Zilka N, Novák M. Risk and protective factors for sporadic Alzheimer's disease. *Acta Virol*; v.51 (4), p.205-22, 2007.
- Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, et al - Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid b peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease - *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.90, p.8098-8102, 1993.
- Sunderland T, Wolozin B, Galasko D, Levy J, Dukoff R, Bahro M, Lasser R, Motter R, Lehtimäki T, Seubert P. Longitudinal stability of CSF tau levels in Alzheimer patients. *Biol Psychiatry.*, 46(6):750-5, Set. 1999.
- Sunderland T, Linker G, Mirza N *et al.* Decreased B-amyloid and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* n.289, p.2094-101, 2003.
- Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka SK, et al. Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch Neurol.* v.66, p.382–389, 2009.
- Tatsch MF, Bottino CM, Azevedo D, Hototian SR, Moscoso MA, Folquitto JC, Scalco AZ, Louzã MR. Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer disease and cognitively impaired, nondemented elderly from a community-based sample in Brazil: prevalence and relationship with dementia severity. *Am J Geriatr Psychiatry.* 14(5):438-45. May, 2006.
- Tato RE, Frank A, Hernanz A. Tau protein concentrations in cerebrospinal fluid of patients with dementia of the Alzheimer type. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v.59(3), p.280-3, 1995.

Teri L, Borson S, Kiyak HA, Yamagishi M. Behavioral disturbance, cognitive dysfunction, and functional skill. Prevalence and relationship in Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc.* 37(2):109-16. Feb, 1989.

The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group. *Neurobiol.Aging* 19, 109–116, 1998.

Truzz, A, Laks J. Doença de Alzheimer esporádica de início precoce. *Rev. Psiq. Clín.* 32 (1); 43-46, 2005

Van Everbroeck B, Green AJ, Vanmechelen E *et al.* Phosphorylated tau in cerebrospinal fluid as a marker for Creutzfeldt- Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v.73(1), p.79-81, 2002.

van Harten AC, Kester MI, Visser PJ, Blankenstein MA, Pijnenburg YA, van der Flier WM, Scheltens P. Tau and p-tau as CSF biomarkers in dementia: a meta-analysis. *Clin Chem Lab Med.*,49(3):353-66. Epub 2011 Feb 23.

Vandermeeren M, Mercken M, Vanmechelen E *et al.* Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Neurochem*, v.61(5), p.1828-34, 1993.

Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidsson P *et al.* Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neurosci Lett*, v.285(1), p.49-52, 2000.

Verbeek MM, De Jong D, Kremer, H.P. Brain-specific proteins in cerebrospinal fluid for the diagnosis of neurodegenerative diseases. *Ann Clin Biochem.*,40(Pt 1):25-40, 2003, Review.

Victoroff J, Ross GW, Benson DF, Verity MA, Vinters HV. Posterior cortical atrophy. Neuropathologic correlations. *Arch Neurol.*,51(3):269-74, 1994 Mar.

Vigo-Pelfrey C, Seubert P, Barbour R *et al.* Elevation of microtubule-associated protein tau in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neurology*, v.45(4), p.788-93, 1995.

Vogel G. Tau protein mutations confirmed as neuron killers. *Science*, v.280(5369), p.1524-5, 1998.

Wallin A, Blennow K, Rosengren L. Cerebrospinal fluid markers of pathogenetic processes in vascular dementia, with special reference to the subcortical subtype. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, V.13 Suppl 3, p.S102-5, 1999.

Walsh DM, Selkoe DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* v.44, p. 181–193, 2004.

Walsh JS, Welch HG, Larson EB. Survival of outpatients with Alzheimer-type dementia. *Annals of Internal Medicine*, v.113(6), p.429-34, 1990.

Wang JZ, Xia YY, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Abnormal Hyperphosphorylation of Tau: Sites, Regulation, and Molecular Mechanism of Neurofibrillary Degeneration. *J Alzheimers Dis.* 2012 Jun 18. [Epub ahead of print]

Wang L, Larson EB, Bowen JD, van Belle G. Performance-based physical function and future dementia in older people. *Arch Intern Med*; v.166 (10), p. 1115-20, 2006.

Wang XP and Ding HL. Alzheimer's disease: epidemiology, genetics, and beyond. *Neuroscience Bulletin*, v. 24, Number 2, p.105-109, 2008.

Winblad B, Palmer K, Kivipelto M, Jelic V, Fratiglioni I, Wahlund LO, et al. Mild cognitive impairment-beyond controversies, towards a consensus: report of International Working Group on Mild Cognitive Impairment. *J Intern Med.*;256(3):240-6, 2004.

World Alzheimer Report. < <http://www.alz.co.uk/research/files/WorldAlzheimerReport-Portuguese.pdf>>. Acessado em 29/06/2012.

Zetterberg H, Andreasen N, Blennow K. Biomarkers in cerebrospinal fluid and blood in memory complaints. *Lakartidningen.*;106(20):1386-9, 2009, Review.

Zhu CW, Sano M. Economic considerations in the management of Alzheimer's disease. *Clinical Interventions in Aging*, v.1(2), p.143-154, 2006.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO 1

-----*Mini-mental*-----

(Folstein, Folstein & McHugh, 1975)

Paciente: _____

Data de avaliação: _____ **Avaliador:** _____

Orientação

- | | |
|--|----------|
| 1) Dia da Semana (1 ponto) | () |
| 2) Dia do Mês (1 ponto) | () |
| 3) Mês (1 ponto) | () |
| 4) Ano (1 ponto) | () |
| 5) Hora aproximada (1 ponto) | () |
| 6) Local específico (andar ou setor) (1 ponto) | () |
| 7) Instituição (residência, hospital, clínica) (1 ponto) | () |
| 8) Bairro ou rua próxima (1 ponto) | () |
| 9) Cidade (1 ponto) | () |
| 10) Estado (1 ponto) | () |

Memória Imediata

Fale três palavras não relacionadas (canela, tijolo, tapete). Posteriormente pergunte ao paciente pelas 3 palavras. Dê 1 ponto para cada resposta correta.()

Depois repita as palavras e certifique-se de que o paciente as aprendeu, pois mais adiante você irá perguntá-las novamente.

Atenção e Cálculo

(100-7) sucessivos, 5 vezes sucessivamente (93,86,79,72,65)

(1 ponto para cada cálculo correto) ()

Evocação

Pergunte pelas três palavras ditas anteriormente 1 ponto por palavra) ()

¹ INTERPRETAÇÃO DO MINI EXAME DO ESTADO MENTAL (MMSE)

Pontuação

< 24
< 18
< 14

Escolaridade

Altamente escolarizado
Ginásio
Analfabeto

Diagnóstico

Possível demência
Possível demência
Possível demência

Linguagem

- 1) Nomear um relógio e uma caneta (2 pontos) ()
- 2) Repetir “nem aqui, nem ali, nem lá” (1 ponto) ()
- 3) Comando: “pegue este papel com a mão direita, dobre ao meio e coloque no chão (3 pontos) ()
- 4) Ler e obedecer: “feche os olhos” (1 ponto) ()
- 5) Escrever uma frase (1 ponto) ()
- 6) Copiar um desenho (1 ponto) ()

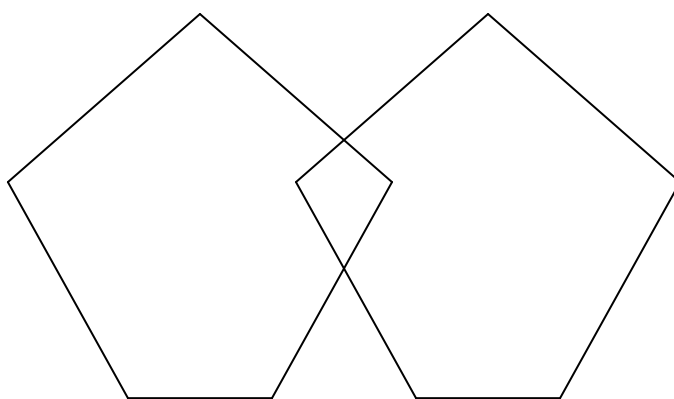
Escore: (/ 30)

Paciente: _____²Idade: _____

Data de Avaliação: _____

ESCREVA UMA FRASE

COPIE O DESENHO



² CONTINUAÇÃO MINI-MENTAL

9.2 ANEXO 2

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

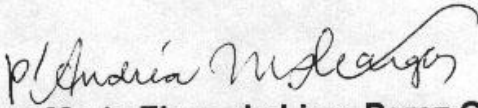
Parecer nº. ETIC 221/06

Interessada: Profa. Tarcília Aparecida da Silva
Depto. de Odontologia Social e Preventiva
Faculdade de Odontologia-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou, *ad referendum*, no dia 29 de novembro de 2006, depois de atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **“Análise citomorfológica e bioquímica da mucosa bucal em pacientes com doença de Alzheimer: potencial aplicação no diagnóstico”** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG

9.3 ANEXO 3

Universidade Federal de Minas Gerais / Faculdade de Odontologia

TERMO DE ESCLARECIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO

Esse documento tem como finalidade propor a sua participação no projeto de pesquisa “ANÁLISE CITOMORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DA MUCOSA BUCAL EM PACIENTES COM DOENÇA DE ALZHEIMER: POTENCIAL APLICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO”. Esta pesquisa tem como objetivo a estudar algumas substâncias que podem estar presentes no líquido da espinha e em células da boca de pacientes com doença de Alzheimer. Estas substâncias podem vir a ser no futuro importantes para diagnosticar precocemente a doença de Alzheimer e outras síndromes demenciais (alterações no sistema nervoso).

Em pacientes com doença de Alzheimer ou com síndromes demenciais o exame do líquido (líquido da espinha) é um método auxiliar de diagnóstico, porque algumas substâncias que se acumulam no cérebro podem ser vistas no líquido da espinha. Assim, não é obrigatório que este exame seja feito, mas a sua realização pode ser importante para a confirmação do diagnóstico. Caso você concorde com a realização desse exame, precisamos de sua autorização para que um pequeno volume (1 ml) do líquido que será colhido como parte da investigação do diagnóstico neurológico seja destinado a este estudo. O líquido da espinha será coletado por um médico especializado em uma sala individual do ambulatório de Neurologia do Hospital das Clínicas da UFMG. O procedimento não requer anestesia ou o uso de qualquer medicamento antes ou após. Você ficará consciente e sentirá um desconforto semelhante a uma “picada de agulha”. Você deverá ficar deitado durante o procedimento e durante o período de observação que será de uma hora porque após a coleta você poderá sentir tonturas e dor de cabeça. Se estes sintomas persistirem ou se agravarem após o período de observação será garantido pronto atendimento no ambulatório de Neurologia do Hospital das Clínicas da UFMG por um dos pesquisadores responsáveis ou médico neurologista de plantão.

Em outro estudo realizado em pacientes com doença de Alzheimer foi observado o acúmulo das mesmas substâncias presentes no líquido da espinha, este exame (da boca) não tem ainda nenhuma comprovação que seja útil para o diagnóstico da doença. Entretanto este estudo pode ajudar na descoberta de outro exame para diagnóstico da doença de Alzheimer. Por isto também precisamos colher células da sua boca para analisar junto com o líquido da espinha. Para a coleta destas células será utilizada uma escova esterilizada e macia. Esta escova será passada suavemente na parte de dentro da sua bochecha e língua. Este procedimento é indolor e não causará nenhum desconforto.

Os pesquisadores responsáveis assumem a responsabilidade de assistência integral às complicações e danos decorrentes dos riscos previstos, bem como de informar aos pacientes caso esta pesquisa demonstre algum avanço que seja importante para o tratamento da doença. A sua recusa em participar não implicará em nenhuma restrição ao seu tratamento.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a realização do raspado da mucosa bucal e que parte do líquido da espinha que foi coletado seja destinado para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar esse consentimento e pedir esclarecimentos sobre este estudo, havendo a continuação normal do tratamento. Receberei uma cópia deste documento.

Local: _____ Data: ____/____/____

Nome do paciente

Nome do responsável

Assinatura do paciente

Assinatura do responsável

Documento apresentado: _____ Nº.: _____

Pesquisadores responsáveis:

Tarcília Aparecida da Silva. Tel: (31) 34992476. E-mail: tarcilia@ufmg.br

Daniela Siqueira Veloso Starling. Tel: (31) 84228898.
E-mail: daniela@starlingtur.com.br

Paulo Caramelli. Tel (31) 32489540. E-mail: caramelp@usp.br

Antônio Lúcio Teixeira Júnior. Tel (31)34992651 E-mail: altexr@gmail.com

Faculdade de Medicina da UFMG, Departamento de Clínica Médica. Av. Alfredo Balena, 110, Santa Efigênia, Belo Horizonte, MG

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP) (Processo: ETIC-0021.0.203.000-06). Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II – 2º andar, Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG, CEP 31270901

Em caso de dúvida você pode ligar para o COEP através do número (31) 3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br