

Gisele Santos Gonçalves

**BIOMARCADORES DE LESÃO MICROVASCULAR,
DE DISLIPIDEMIA E MICROPARTÍCULAS
PLAQUETÁRIAS EM IDOSOS COM E SEM
COMPROMETIMENTO COGNITIVO**

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte

2012

Gisele Santos Gonçalves

**BIOMARCADORES DE LESÃO MICROVASCULAR,
DE DISLIPIDEMIA E MICROPARTÍCULAS
PLAQUETÁRIAS EM IDOSOS COM E SEM
COMPROMETIMENTO COGNITIVO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área: Análises Clínicas e Toxicológicas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Carvalho

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Josianne Nicácio Silveira

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte

2012

Colaboradores:

- Professor Dr. Edgar Nunes de Moraes – Médico do Hospital das Clínicas (Instituto Jenny de Andrade Faria)
- Dr^a. Cláudia Bandeira de Melo França – Médica do Hospital Odilon Behrens
- Dr^a. Fernanda Freire Campos Nunes – Bióloga do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz

Instituições Participantes

- Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG
- Hospital das Clínicas da UFMG - Instituto Jenny de Andrade Faria
- Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz

Apoio Financeiro

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Dedico este trabalho a toda minha família: meus pais, Ercílio e Beatriz, meus irmãos, Regina e Rodrigo, e meu marido, João Luiz, por todos os ensinamentos e apoio constantes durante toda minha vida.

Agradecimentos

À Profa. Maria das Graças pela oportunidade de ser sua aluna e pelos seus ensinamentos que foram fundamentais para a execução deste trabalho.

À Profa. Josianne Nicácio pelas sugestões e conselhos, no decorrer de todo o trabalho e pela oportunidade de trabalhar e aprender um pouco sobre CLAE.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, nas pessoas de seu coordenador Professor Armando da Cunha Silva Júnior e dos secretários Eduardo Castro e Silas Lopes Rosado pela valiosa ajuda e colaboração em todos os momentos.

À Profa. Ana Paula Salles Moura Fernandes que generosamente abriu as portas do Laboratório de Biologia Molecular, sob sua coordenação, o que possibilitou a realização do estudo da genotipagem da apolipoproteína E.

À Profa. Karina Braga Gomes Borges pela ajuda nos experimentos realizados no Laboratório de Biologia Molecular, que permitiu que eu conseguisse desenvolver este trabalho com toda técnica e empenho necessários.

À Prof^a Luci Maria Sant'Ana Dusse, obrigada pela amizade, carinho e pelos ensinamentos.

Às amigas Tatiana Campos, Elisângela Apolônio e Rita Carolina pela parceria nas determinações da homocisteína e das micropartículas plaquetárias.

À Cláudia Bandeira pela ajuda durante a seleção dos indivíduos do grupo controle além de todas as discussões que foram extremamente importantes.

À Biomédica Denise Bruno pelo auxílio nas coletas de sangue dos pacientes no Hospital das Clínicas.

Ao prof. Dr. Olindo Assis e a bióloga Fernanda Freire do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz, obrigada pelos ensinamentos na determinação das micropartículas plaquetárias. Agradeço também pela ajuda e apoio na interpretação dos dados.

Aos bolsistas de Iniciação Científica Kathryn Fontana, Marcos Vinícius Ferreira Silva, Arthur Assini e Caroline Penido pela ajuda nos trabalhos experimentais.

Ao Bioquímico Cláudio Maciel, do Laboratório Humberto Abrão, pela disponibilidade e ajuda nas dosagens bioquímicas do perfil lipídico.

À Estatística Flávia Komatsuzaki pelo carinho e competência profissional durante a realização das análises estatísticas.

Aos funcionários do laboratório de Hematologia e Biologia Molecular pelo companheirismo e colaboração, em especial a Fátima e Márcio pela constante ajuda.

À toda a equipe de médicos/geriatrias do HC, por toda ajuda na seleção e esclarecimento de dúvidas sobre o diagnóstico de todos os pacientes, sempre que necessário, especialmente a professora Maria Aparecida Bicalho e o neuropsicólogo Jonas Jardim.

Finalmente, nosso agradecimento especial aos pacientes que generosamente doaram uma amostra de sangue para a realização das análises laboratoriais concretizando assim a ideia deste estudo.

Lo desahogo de Zheimer Al zheimer

(Guilherme Coelho)

Estás aí de novo. Sorri, pois triunfaste sobre meu corpo e nem ao menos lembro desde quando habitas meu espelho todos os dias pela manhã. És o mal que consome minha memória, que devora minhas certezas e me atira num futuro inferno de estranhos penosos e patéticos tentando me ajudar em não sei o quê, nem por quê. Não saberás o quanto os amei. Não saberás o quanto te amei. O quanto tive orgulho de teu sucesso. O quanto me feriu com tuas feridas. O quanto cultivei teus belos cabelos... hoje grisalhos. Não sabes que tua sorte é também a tua própria morte. Que acabarás junto comigo, sem direito a um último delírio de lembrança e nostalgia em teus últimos segundos. Morrerás sem saber o que é dignidade, pois, quando chegar tua hora, não terás passado.

Fizeste pensarem de mim um velho. Lentamente, castraste-me a liberdade, sufocaste minha independência. Deixaste-me desorientado, e agora não posso mais atravessar a rua, pois não haverá em minha memória o caminho de volta. Tua loucura, agora também é minha. Não te reconheço, não me reconheço. Tornaste-me um prostrado passivo, um apático desinteressado da vida. Com meus amigos, deixaste-me irritado, egoísta, agressivo. Estás em mim, mas não possuo nada de ti.

Roubaste minha confiança, minha criatividade, meus valores. Trancaste para sempre a porta do quarto que guarda meus segredos. Tantos livros, tantos discos. Tiraste de mim as melodias que ressoavam de meus dedos, hoje já não tão ágeis para vibrar as cordas. Tornaste-me um compositor de frases curtas, palavras perdidas, palavras repetidas, que um dia, quem sabe, uma mente também amaldiçoada por teu mal, compreenderá o que dizem.

Apagas-te o brilho desta pobre mulher que sofre na cama ao meu lado, cujo esperava guardar para sempre, num suposto lugar mais seguro dentro de mim. Não me deixas-te nada. Morrerei, tu morrerás, todos morrerão. Mas não penses que tua vitória serás plena. De uma coisa tenhas certeza. Não terás teu mérito. A ti, deixo apenas este desabafo e esta dose de cicuta em meu Campari, que roubar-te-á o gostinho de destilar minha alma até a última gota.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAS	Ácido acetil salicílico
Apo A-1	Apolipoproteína A-1
Apo B	Apolipoproteína B
Apo E	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora beta-amilóide
AVDs	Atividades de Vida Diária
A β	Proteína beta-amilóide
bp	Pares de bases
CCL	Comprometimento Cognitivo Leve
CDR	Clinical Dementia Rating
CERAD	<i>Consortium to Establish a Registry to Alzheimer's Disease</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG
COX-2	Ciclooxigenase-2
CT	Colesterol Total
DA	Doença de Alzheimer
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSM IV	Manual Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais da Associação Psiquiátrica Americana
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
HC - UFMG	Hospital das Clínicas da UFMG
Hcy	Homocisteína
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDLc	Colesterol presente na lipoproteína de alta densidade
HERP	<i>Homocisteína-inducible endoplasmic reticulum stress protein</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICAM -1	Molécula de adesão intercelular-1
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IL 1 β	Interleucina 1 beta

IL 4	Interleucina 4
IL 6	Interleucina 6
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LDLc	Lipoproteína de baixa densidade
Lp (a)	Lipoproteína (a)
MEEM	Mini-Exame do Estado Mental
mg/dL	Miligramas/decilitro
mL	Mililitro
MP	Micropartículas
MPPs	Micropartículas de plaquetas
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato redutase
n	Número de indivíduos
ng/mL	Nanogramas/mililitro
NINCDS-ADRDA	<i>National Institute of Neurological and Communicative Disorders and stroke – Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
PBS	Tampão fosfato
PCR –RFLP	Polymerase Chain Reaction - Restricion Fragment Length Polymorfism
PECAM	<i>Platelet-endothelial cell adhesion molecule</i>
PF4	Fator plaquetário 4
PLA2	Fosfolipase A2
PMPs	Micropartículas de plaquetas
PSEN 1	Presenilina 1
PSEN 2	Presenilina 2
Qm	Quilomicrons
rpm	Rotações por minuto
SBD-F	7-Fluorobenzo-2,1,3- Oxadiazole-4-Ácido Sulfônico
SESC	Serviço Social do Comércio no Estado de Minas Gerais
sICAM -1	Molécula de adesão intercelular-1solúvel
SNPs	Polimorfismo de nuclotídeo único
TCA-EDTA	Ácido tricloro acético

TCEP	Tris-carboxyethyl-phosphine
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG	Triglicérides
TGF – β	Fator de Transformação do Crescimento beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VCAM -1	Molécula de adesão celular vascular-1
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
vs	versus
β TG	Beta Tromboglobulina
ϵ 2	Alelo 2
ϵ 3	Alelo 3
ϵ 4	Alelo 4
μ mol/L	Micromol/litro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Patologia da doença de Alzheimer.....	27
Figura 2 - Desenho esquemático da APP e suas três principais isoformas	28
Figura 3 – Metabolismo da homocisteína.....	41
Figura 4 - Curva de Calibração para a determinação da molécula de adesão solúvel (sICAM-1) utilizando a técnica de ELISA	66
Figura 5 - Curva de Calibração para a determinação da Homocisteína total plasmática utilizando a técnica de CLAE com detecção fluorimétrica.....	68
Figura 6 - Padrões de RFLP para apo E: as regiões hachuradas indicam os <i>primers</i> , as setas indicam sítios de clivagem pela HhaI e as setas em negrito marcam especificamente os sítios polimórficos de clivagem	73
Figura 7 - Gel de poliacrilamida a 12% corado pela prata, obtido após PCR, seguida de digestão com a endonuclease de restrição HhaI e eletroforese, contendo os perfis correspondentes aos 6 genótipos da ApoE.....	74
Figura 8 - Perfil cromatográfico, obtido por CLAE, para análise de Homocisteína no plasma. Pico 1: Hcy, Pico 2: Padrão interno/Cistamina, com os respectivos tempo de retenção e área	80
Figura 9 – Apresentação dos valores de micropartículas plaquetárias em porcentagem [MPP (%)] e valor absoluto (MPP/ μ L).....	81
Figura 10 – Resultados das análises de micropartículas plaquetárias nos três grupos estudados.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genótipos da Apo E e tamanho dos fragmentos gerados através do processo de digestão enzimática	74
Tabela 2 - Descrição da amostra e distribuição dos indivíduos envolvidos no estudo	77
Tabela 3 - Relação de co-morbidades dos indivíduos envolvidos no estudo	78
Tabela 4 - Perfil de uso de medicamentos pelos participantes do estudo.....	79
Tabela 5 - Níveis plasmáticos da molécula de adesão sICAM-1, pelo método ELISA	79
Tabela 6 - Níveis plasmáticos de homocisteína nos três grupos estudados, utilizando a técnica de CLAE com detecção fluorimétrica	80
Tabela 7 - Perfis lipídicos convencional e não convencional dos indivíduos do estudo	82
Tabela 8 - Perfil lipídico dos indivíduos em uso de medicamentos hipolipemiantes .	83
Tabela 9 - Diferentes genótipos (em números absolutos) e frequência genotípica para a Apo E calculada para o estudo	83
Tabela 10 - Números absolutos referentes aos alelos $\epsilon 4$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 2$ da apolipoproteína E (Apo E).....	84
Tabela 11 - Comparação das diferentes variáveis entre os 3 grupos em apenas indivíduos portadores do alelo $\epsilon 4$ da ApoE (genótipos $\epsilon 3/\epsilon 4$ ou $\epsilon 4/\epsilon 4$)	85
Tabela 12 - Comparação entre o grupo Controle e grupo com DA na presença e ausência do alelo $\epsilon 4$	86
Tabela 13 - Modelo de regressão logística múltipla para a presença de DA em função das variáveis selecionadas.....	88
Tabela 14 - Fatores de risco/variáveis para DA encontrados no presente estudo	89

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1 Demência.....	24
2.2 Comprometimento Cognitivo Leve.....	25
2.3 Doença de Alzheimer.....	26
2.3.1 Mecanismos patogênicos da doença de Alzheimer - APP e Tau	28
2.3.2 Quadro clínico e fatores de risco	30
2.3.3 Diagnóstico.....	34
2.4 Doença de Alzheimer e biomarcadores.....	40
2.4.1 Homocisteína.....	41
2.4.2 Micropartículas plaquetárias.....	44
2.4.3 Lipídeos e apolipoproteínas.....	46
2.4.4 Polimorfismo da apolipoproteína E	52
2.5 Alterações vasculares.....	56
3. OBJETIVOS.....	58
3.1 Objetivo geral.....	59
3.2 Objetivos específicos	59
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
4.1 Casuística	61
4.1.1 População em estudo.....	61
4.1.2 Seleção da amostra.....	62
4.2 Considerações éticas.....	63
4.3 Amostra	64
4.4 Métodos	65
4.4.1 Quantificação da molécula de adesão solúvel (sICAM-1)	65
4.4.2 Determinação de homocisteína	66

4.4.3 Determinação das micropartículas plaquetárias (MPPs).....	68
4.4.4 Avaliação do perfil lipídico e das apolipoproteínas A-1, B e Lp(a).....	69
4.4.5 Identificação dos alelos do gene da apolipoproteína E (Apo E)	72
4.5 Análise estatística	75
5. RESULTADOS	76
5.1 Características dos participantes do estudo	77
5.2 Molécula de adesão intercelular solúvel (sICAM-1).....	79
5.3 Níveis plasmáticos de homocisteína (Hcy)	80
5.5 Micropartículas plaquetárias (MPPs)	81
5.6 Perfil lipídico e das apolipoproteínas A-1, B e Lp(a)	82
5.7 Polimorfismo da Apo E	83
5.8 Possíveis diferenças intragrupos em indivíduos carreadores do alelo $\epsilon 4$ da Apo E (genótipos $\epsilon 3/\epsilon 4$ e $\epsilon 4/\epsilon 4$).....	84
6. DISCUSSÃO	90
6.1 Características dos grupos incluídos no estudo	91
6.2 Níveis plasmáticos da molécula de adesão solúvel (sICAM-1).....	95
6.3 Homocisteína (Hcy)	96
6.5 Micropartículas plaquetárias (MPPs)	98
6.6 Perfil lipídico	99
6.7 Polimorfismo da Apo E	102
6.8 Possíveis diferenças intragrupos em indivíduos portadores do mesmo genótipo da Apo E ($\epsilon 3/\epsilon 4$ e $\epsilon 4/\epsilon 4$)	103
6.9 Limitações do estudo e perspectivas.....	106
7. CONCLUSÕES	108
8. BIBLIOGRAFIA.....	110
9. ANEXOS	134

Anexo 1 - Aprovação do COEP	135
Anexo 2 - Termos de Consentimento Livre e Esclarecido	136
Anexo 3 – Aceite para publicação	140
Anexo 4 – Artigo 1 – Publicado na Revista da Pós-Graduação Newton Paiva.	141
Anexo 5 – Artigo 2 – Submetido à Revista ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS.....	151

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença multifatorial e o diagnóstico é exclusivamente clínico, sendo crucial para o diagnóstico precoce a descoberta de um biomarcador específico, sensível e confiável. Considerando as poucas alternativas terapêuticas, a identificação de indivíduos com alto risco de evoluírem para demência assume grande importância. Estudos recentes indicam que a avaliação do dano microvascular cerebral poderia fornecer um instrumento sensível para detecção precoce da DA. Adicionalmente, a patologia microvascular pode ser um alvo importante de intervenção terapêutica específica e, uma vez detectada por biomarcadores, a avaliação desses seria de grande importância para auxiliar no diagnóstico e avaliar a progressão da doença, bem como a resposta terapêutica. O presente estudo teve como objetivo avaliar potenciais biomarcadores, com enfoque naqueles específicos para alterações microvasculares, plaquetárias e dislipidêmicas, em idosos com Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) ou com DA, e em idosos sem alterações cognitivas (controles), visando contribuir para ampliar o conhecimento atual sobre a DA. Além da avaliação de alguns biomarcadores, foram incluídos neste estudo dados clínicos e epidemiológicos dos participantes. Em amostras de sangue de um total de 177 indivíduos, incluindo aqueles com DA (n=59), CCL (n=59), e idosos sem alterações cognitivas (n=59), foram determinados os seguintes parâmetros: (1) molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1); (2) homocisteína; (3) micropartículas plaquetárias (MPPs); (4) perfil lipídico convencional e não convencional e (5) genotipagem da apolipoproteína E. A análise conjunta dos dados obtidos no presente estudo permitiu concluir que a elevação dos níveis plasmáticos de ICAM-1, um biomarcador de lesão microvascular parece estar associado ao desenvolvimento da DA. Além do mais, a frequência do alelo $\epsilon 4$ se mostrou desproporcionalmente elevada em pacientes com DA e CCL em comparação ao grupo de idosos sem demência. E, em consonância com estudos anteriores, a simples presença do alelo $\epsilon 4$ da Apo E não é suficiente para o desenvolvimento da DA, o qual apenas aumenta o risco de DA, indicando que existem outros fatores ambientais e genéticos importantes no desenvolvimento da mesma. Os indivíduos do grupo controle, apresentaram os níveis de HDLc, significativamente maiores quando comparado aos indivíduos dos grupos DA e CCL. Com relação aos parâmetros apolipoproteicos dos três grupos, os níveis de Apo B foram significativamente mais elevados no grupo CCL em comparação aos grupos controle e DA. Finalmente, os níveis plasmáticos de homocisteína e de micropartículas plaquetárias no grupo com DA não se mostraram significativamente diferentes quando comparados aos níveis observados para os grupos controle e CCL.

Palavras-chave: doença de Alzheimer, comprometimento cognitivo leve, micropartículas plaquetárias, homocisteína, ICAM-1, Apolipoproteína E.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is a multifactorial disease and its diagnosis is exclusively clinical, which makes the discovery of a specific, sensitive and reliable biomarker crucial for an early diagnosis. Considering the few therapeutic options, the finding of people with high potential for developing dementia is fundamental. Recent studies indicate that the assessment of microvascular brain damage may prove to be a sensitive tool for detecting early stages of AD. Furthermore, the microvascular pathology can be an important and specific therapeutic target, and once detected by biomarkers, this evaluation could be a helpful tool for diagnosis and assessment of the disease progression, as well as treatment efficacy. The objective of this study was to evaluate potential biomarkers, focusing on those specific for microvascular and platelet alterations in patients with Mild Cognitive Impairment (MCI) and AD, seeking to contribute to broaden the current knowledge on AD. This study assessed serum or plasma samples, looking for possible candidates biochemical markers for AD. In a group of 177 subjects, including those with AD (n=59), MCI (n=59), and elderly people without cognitive impairment (n=59), the following parameters were determined: (1) intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1); (2) homocysteine; (3) platelet microparticles; (4) conventional and non conventional lipid profile, and (5) apolipoprotein E (apoE) genotyping. The pooled analysis of data obtained in this study indicates that the elevation of sICAM-1 plasma levels, a biomarker of microvascular injury appear to be associated with the development of AD. Moreover, the frequency of allele $\epsilon 4$ showed to be disproportionately elevated in patients with AD and MCI compared to the group of elderly without dementia. In line with previous studies, the mere presence of the allele $\epsilon 4$ from Apo E is not sufficient for the AD development, which only increases the risk of AD, indicating that there are other important genetic and environmental factors in the development of the disease. Individuals from the control group have presented significantly increased levels of HDLc compared to those observed in DA and MCI patients. Concerning to the apolipoprotein profile of the three groups, apo B levels were significantly increased in the MCI group compared to the control and DA groups. Finally, plasma levels of homocysteine and platelet microparticles in the group with AD were not significantly different when compared to the levels observed for both control group and MCI.

Key-words: Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, platelet microparticles, homocysteine, ICAM-1, apolipoprotein E.

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional é uma das mais importantes mudanças demográfica e social observadas em quase todo o mundo. Com o crescimento desta parcela da população, cresce também a prevalência das demências, em especial da Doença de Alzheimer (DA).

A DA é uma doença multifatorial com um componente genético forte, e pode ser subdividida em dois tipos distintos, as formas “familiar” e “esporádica”. A descoberta de influências genéticas e a identificação de genes responsáveis pela DA aumentou muito a compreensão da doença. Três produtos de genes diferentes têm sido até agora demonstrado que causam DA de início precoce familiar: a proteína precursora beta-amiloide (APP), presenilina 1 (PSEN 1) e presenilina 2 (PSEN 2) (TANZI & BERTRAM, 2001). No entanto a DA esporádica, que representa 85-90% dos casos em todo o mundo é, geralmente, de início tardio, ocorrendo depois dos 65 anos de idade. Embora vários fatores de risco genéticos têm sido associados com esta forma da doença, apenas o polimorfismo da apolipoproteína E do tipo 4 (Apo E ϵ 4) tem sido repetidamente associado a DA esporádica (POIRIER et al., 1993; STRITTMATTER et al., 1993; POIRIER 2003).

Do ponto de vista anatomopatológico, os achados na DA incluem perda neuronal com atrofia cerebral, degeneração sináptica, placas neuríticas (ou senis) contendo depósitos extracelulares de proteína beta-amiloide ($A\beta$), originados da clivagem anormal da proteína precursora beta-amiloide (APP); emaranhados neurofibrilares localizados normalmente no citoplasma perinuclear e composto de proteínas “tau” anormalmente fosforiladas (MUNOZ & FELDMAN, 2000; WILTFANG et al., 2009). Alterações microvasculares também podem ser observadas no cérebro de pacientes com DA. Estas alterações têm sido associadas ao processo patológico e podem preceder a neurodegeneração (SKOOG et al., 1999; KORNHUBER, 2005).

O sintoma inicial da doença é geralmente a perda progressiva da memória recente. Com a evolução da doença, outras alterações ocorrem na memória e na cognição, entre estas as deficiências de linguagem e nas funções visuoespaciais. Estes sintomas são frequentemente acompanhados por distúrbios comportamentais, incluindo agressividade, depressão e alucinações (SERENIKI & VITAL, 2008).

Considerando que a DA incide prioritariamente em pessoas mais idosas e sabendo que o envelhecimento normal é frequentemente acompanhado por alterações cognitivas, torna-se um grande desafio a discriminação entre alterações próprias da idade e alterações leves iniciais, porém já resultantes do processo inicial da DA.

O comprometimento cognitivo leve (CCL) é um estágio intermediário entre o indivíduo normal e com déficit cognitivo, que serve como um forte preditor de DA, uma vez que em vários estudos a incidência foi significativamente maior nos indivíduos com diagnóstico de CCL do que na população em geral (PERTERSEN et al., 2001; TABERT et al., 2006).

Diante do exposto, esforços devem ser envidados no sentido de se delinear novos estudos, em nível mundial, que permitam a melhor caracterização dos mecanismos envolvidos na DA, contemplando os fatores epidemiológicos regionais próprios. Um maior entendimento desta doença e de seus fatores de risco poderá modificar a história natural da mesma, mediante a adoção de medidas profiláticas e/ou esquemas terapêuticos adequados. De grande importância também são os estudos visando ampliar o leque de ferramentas diagnósticas, inclusive aquelas que poderiam ser empregadas para o diagnóstico precoce da DA.

No Brasil, estudos envolvendo DA estão se intensificando, uma vez que a parcela populacional na faixa etária acima dos 65 anos de idade vem crescendo significativamente. Desta forma, é cada vez mais frequente dúvidas em torno do diagnóstico de condições incapacitantes como a demência. Os estudos internacionais são de grande valia, no entanto, é fundamental que haja estudos nacionais, uma vez que tais questionamentos têm estreita relação com a cultura de cada povo. Dessa forma, há necessidade de um maior conhecimento sobre os mecanismos fisiopatológicos e fatores epidemiológicos envolvidos, melhoria nos métodos de diagnóstico precoce da doença, bem como nos esquemas terapêuticos, além de maior habilidade no manejo e controle destes pacientes para que se possa garantir uma melhor qualidade de vida aos mesmos.

É importante ressaltar que, no momento, as dificuldades no diagnóstico são ainda muito grandes, sendo este firmado quase que unicamente na exclusão de outras doenças/condições similares. A determinação de biomarcadores como proteína beta-amilóide ($A\beta$) e proteína tau, com potencial aplicação, oferecem resultados mais fidedignos em líquido cefalorraquidiano, constituindo uma limitação por implicar em método invasivo de coleta do material a ser analisado (JELLINGER et al., 2008). Assim, a busca de novos biomarcadores, envolvendo testes simples e não invasivos realizados em amostras de sangue, com valor diagnóstico e prognóstico para a detecção precoce da doença, deve ser incentivada considerando a possível aplicação na clínica (EWERS et al., 2009). A avaliação da doença microvascular constitui uma abordagem promissora para desenvolver marcadores biológicos úteis para a detecção precoce e caracterização patológica da DA.

Neste estudo pretende-se caracterizar o grau de doença microvascular e sua possível associação com a gravidade do déficit cognitivo e fatores de risco para o desenvolvimento da DA, buscando estabelecer diferenças entre os idosos com e sem DA.

Fatores genéticos e/ou adquiridos podem interferir na expressão da DA. Assim, o estabelecimento de um estudo fundamentado dentro da nossa realidade poderá trazer respostas mais fidedignas e adequadas, tendo em vista que a grande maioria do conhecimento sobre a DA, acumulado ao longo do tempo, foi obtido através de estudos conduzidos fora do nosso meio.

Diante do exposto, a principal hipótese que norteou o presente estudo admite que a elevação dos níveis plasmáticos de biomarcadores de lesão microvascular está associada ao grau de demência, ou seja, uma maior expressão dos níveis plasmáticos de tais marcadores estaria, possivelmente, relacionada ao desenvolvimento da DA.

Considerando as diferenças geográficas e étnicas, acredita-se que este estudo proporcionará uma melhor caracterização da DA acerca das alterações microvasculares e outras em nosso meio, o que poderá impactar positivamente a

adoção de novas estratégias para a prevenção e tratamento desta importante doença neurodegenerativa.

Uma análise minuciosa da literatura acerca da DA permite conjecturar que alguns aspectos da doença relatados em estudos realizados sob outras condições de experimentação podem não ser verdadeiros dentro da nossa realidade. Como exposto acima, fatores ambientais, genéticos, étnicos podem interferir na expressão da doença. Dessa forma, com base na percepção de possíveis diferenças, muitos questionamentos têm sido feitos, tais como:

- Estariam os níveis dos marcadores de lesão microvascular elevados de forma gradativa segundo o agravamento da doença?
- Quais os fatores de risco e biomarcadores avaliados nos grupos de estudo que estariam associados ao agravamento do déficit cognitivo de forma independente?
- A frequência do alelo $\epsilon 4$ seria desproporcionalmente elevada em pacientes com DA em comparação ao grupo de idosos sem demência?
- Há evidências de que a hiperhomocisteinemia possa ser um importante fator de risco para o desenvolvimento da DA uma vez que pode potencializar o dano endotelial e neuronal, levando à vasculopatia e neurotoxicidade (GEBARA & MATIOLI 2006; HERRMANN & OBEID 2011). Dessa forma, estariam os níveis de homocisteína significativamente mais elevados em pacientes com DA?
- À luz da evidência que plaquetas constituem a principal fonte da proteína precursora amilóide e, conseqüentemente, da proteína beta amilóide no sangue de humanos, pode-se sugerir que a ativação plaquetária em pacientes com DA reflita ou contribua para a patogênese desta doença (DI LUCA et al., 2000). Dessa forma, pacientes com DA apresentariam uma maior quantidade de micropartículas de origem plaquetária, refletindo uma maior ativação das plaquetas? E o grupo CCL, apresentaria um padrão intermediário no que se refere à ativação plaquetária?

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Demência

Demência pode ser definida como uma síndrome caracterizada por declínio de memória associado a déficit de, pelo menos, uma outra função cognitiva (linguagem, gnosias, praxias ou funções executivas) com intensidade suficiente para interferir no desempenho social ou profissional do indivíduo (APA 1994; DESAI et al., 2010). As quatro causas mais frequentes de demência irreversível na prática clínica são DA, demência vascular, demência com corpos de Lewy e demência frontotemporal (CARAMELLI & BARBOSA, 2002), sendo a DA o tipo mais comum de demência, responsável por mais de 50% dos casos na faixa etária igual ou superior a 65 anos (HERRERA et al., 1998).

Depois dos 65 anos de idade, a prevalência de demência aumenta exponencialmente, duplicando a cada cinco anos. Tal evolução é confirmada ao se comparar o grupo etário dos 65 aos 69 anos quando a demência é 0,8% e passa para 28,5% nas pessoas acima dos 90 anos de idade (BEARD et al., 1995; LOPES & BOTTINO, 2002).

O Brasil tem vivenciado uma realidade importante no mundo representado pelas mudanças demográficas. Com o aumento da expectativa de vida vem ocorrendo um aumento do envelhecimento da população (RIBEIRO et al., 2008). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2020 o Brasil terá uma população de 219,1 milhões de pessoas e os idosos chegarão a 25 milhões de pessoas, representarão 11,4% da população. Estudos mostram que é irreversível o envelhecimento da população brasileira (IBGE, 2008).

Nos países desenvolvidos, a prevalência de demência é aproximadamente 1,5% em torno dos 65 anos até alcançar 30%, em média, ao redor dos 80 anos (LOPES & BOTTINO, 2002; RITCHIE & LOVESTONE, 2002). No Brasil, a estatística é muito semelhante à mundial. Em estudo populacional realizado em Catanduva, município com 100 mil habitantes, no Estado de São Paulo, 25% dos idosos foram avaliados, encontrando prevalência de demência semelhante à literatura, de 1,6%, entre os

indivíduos com idade de 65 a 69 anos, a 38,9%, entre aqueles com idade superior a 84 anos (HERRERA et al., 1998).

2.2 Comprometimento Cognitivo Leve

O comprometimento cognitivo leve (CCL) é uma entidade clínica caracterizada pela presença de declínio cognitivo mais acentuado do que o esperado para a idade e nível educacional do paciente, mas insuficiente para limitar a execução das Atividades de Vida Diária (AVDs), portanto, não há subsídios para o diagnóstico de um quadro demencial (WINBLAD et al., 2004).

Estudos demonstraram também que o CCL é uma entidade heterogênea no seu curso clínico. Os subtipos de CCL têm sido caracterizados: no CCL amnésico, o indivíduo apresenta somente déficit de memória episódica; no CCL de múltiplas funções acometidas, o paciente apresenta déficit em mais de um domínio cognitivo além da memória; e no CCL não-amnésico, observa-se déficit em outra habilidade cognitiva diferente da memória (Petersen et al., 2004).

Todos os grupos podem permanecer estáveis e não evoluir para quadro demencial. A história natural do CCL é extremamente variável, com alta instabilidade diagnóstica (WINBLAD et al., 2004).

Assim, o CCL parece constituir uma condição de risco para demência, tendo sido determinada, em vários estudos, uma taxa de conversão anual que oscilou entre os 6 e 25%. Mais concretamente, o CCL amnésico apresenta um elevado risco de progressão para DA (10-15% ao ano), podendo, desta forma, constituir uma fase prodrômica da doença. A recomendação atual é que o CCL seja diagnosticado e acompanhado devido ao risco aumentado de desenvolvimento de demência (PETERSEN et al., 2001; WINBLAD et al., 2004; GAUTHIER et al., 2006).

Segundo Petersen e colaboradores (2001), os critérios de diagnóstico para o CCL (amnésico) são:

- Comprometimento subjetivo da memória, confirmado por um informador;
- Deterioração da memória superior ao que seria esperado para a idade e nível educacional;
- Funcionamento cognitivo global normal;
- Sem interferência na execução das AVDs;
- Ausência de demência.

Contudo, outros domínios cognitivos podem ser afetados, isolada ou simultaneamente, determinando o CCL com comprometimento de uma única função cognitiva diferente de memória ou o CCL com comprometimento leve de múltiplos domínios cognitivos, respectivamente (PETERSEN et al., 2001).

2.3 Doença de Alzheimer

Descrita inicialmente por Alzheimer (1907, apud SMITH, 1999) em uma mulher com quadro compatível com demência, caracterizada por idéias delirantes, seguido de declínio cognitivo e morte após quatro anos do surgimento dos sintomas, essa enfermidade ficou conhecida como doença de Alzheimer (DA).

A DA altera três grandes parâmetros incluindo a cognição (memória, linguagem, raciocínio e atenção), a funcionalidade (afetando atividades da vida diária como vestir-se, tomar banho, escovar os dentes, alimentar-se, fazer cálculos) e o comportamento (alterações de humor como a depressão, agitação, agressividade). Estas alterações interferem diretamente na vida social do indivíduo (SERENIKI & VITAL, 2008).

De acordo com a hipótese da cascata amiloidal, a neurodegeneração na DA inicia-se com a clivagem proteolítica da proteína precursora beta-amilóide (APP) e resulta na produção, agregação e deposição da proteína β -amilóide ($A\beta$) formando as placas senis (MUNOZ & FELDMAN, 2000; SERENIKI & VITAL, 2008). A presença de depósitos de $A\beta$ (placas senis) e emaranhados extracelulares (Figura 1) parecem agir como irritantes, causando a ativação do complemento, marcando o início de

mudanças nas células do sistema nervoso central, bem como a liberação de produtos neurotóxicos (MCGEER & MCGEER, 1998).

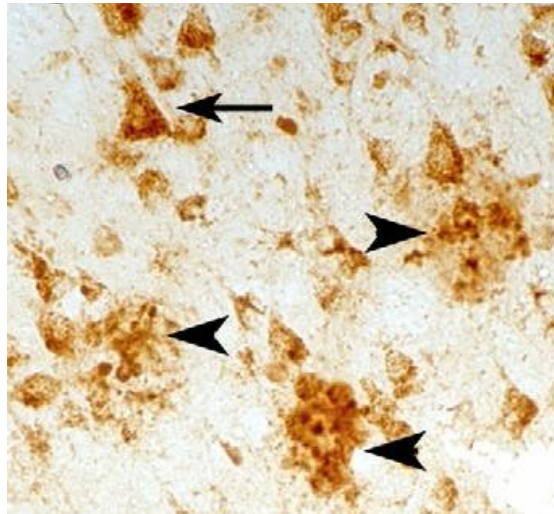


Figura 1 - Patologia da doença de Alzheimer

Características da DA, placas senis (cabeça de seta) e emaranhados neurofibrilares (seta), no cérebro (coloração pela prata).
Fonte: NIXON et al., 2005

As manifestações clínicas irão aparecer quando um número determinado destas lesões é atingido. Na DA este nível pode variar entre indivíduos e dependerá de fatores de risco genéticos e ambientais, bem como outras doenças cerebrais (MUNOZ & FELDMAN, 2000).

De acordo com Fassbender e colaboradores (2000), os mediadores inflamatórios podem indiretamente, promover a DA por interferência no metabolismo da APP. As citocinas inflamatórias como a Interleucina 1 beta (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), ou Fator de Transformação do Crescimento beta (TGF- β) podem aumentar a expressão da APP e a liberação da A β . Na verdade, a expressão da APP é regulada pelos mesmos fatores que estão envolvidos na expressão da maioria das proteínas de fase aguda. Portanto, uma relação de reciprocidade entre A β e mediadores inflamatórios pode existir, porque não só a presença da A β pode induzir a liberação de citocinas, mas uma vez liberadas, essas também podem aumentar a secreção de A β .

2.3.1 Mecanismos patogênicos da doença de Alzheimer - APP e Tau

A APP é uma proteína transmembrana que desempenha papel importante na regulação de várias funções celulares, especialmente no sistema nervoso. É descrita a importância da APP na formação das sinapses funcionais e também na maturação dos subtipos específicos de neurônios assim como também em mecanismos fisiológicos (transporte e sinalização neurotrófica, adesão e sinalização celular) (GRALLE & FERREIRA, 2007; NIXON, 2007; WILTFANG et al., 2009). Além disso, apresenta um envolvimento nas interações celulares e entre as células e a matriz extracelular, o que sugere que esta proteína pode agir como um receptor (GRALLE & FERREIRA, 2007).

A APP é codificada na espécie humana por um gene localizado no cromossomo 21 (MUNOZ & FELDMAN, 2000; GRALLE & FERREIRA, 2007; WILTFANG et al., 2009). As placas de A β são compostas principalmente de peptídeos originados a partir da clivagem enzimática da APP. A APP é processada enzimaticamente pelas α , β e γ secretases para liberar várias isoformas de peptídeos β -amiloide (APP695, APP751 e APP770) (Figura 2). A isoforma conhecida como APP695 expressa-se predominantemente no cérebro (ANDREASEN & BLENNOW, 2002; WILTFANG et al., 2009).

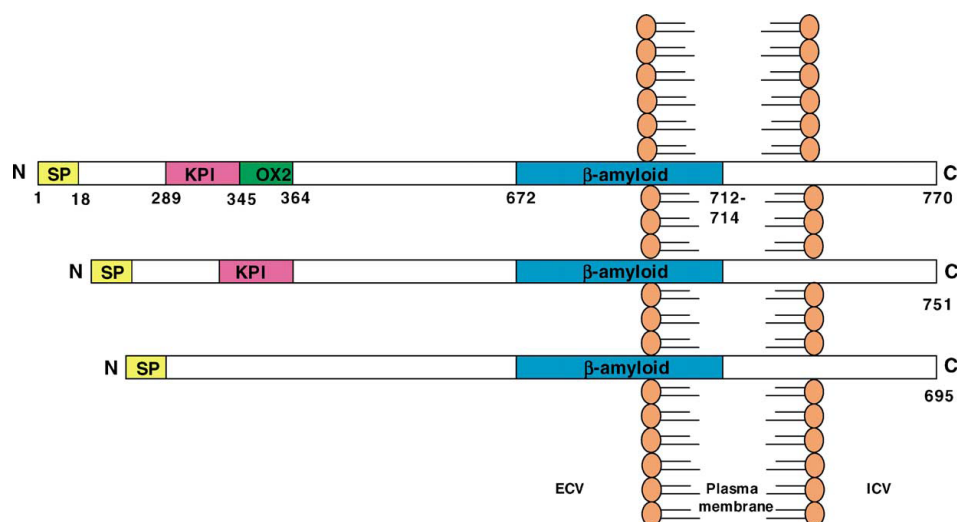


Figura 2 - Desenho esquemático da APP e suas três principais isoformas

Fonte: ANDREASEN & BLENNOW, 2002

Periféricamente, a APP também ocorre em outros tecidos, como células musculares, epiteliais e sanguíneas. Dentre estas, as plaquetas são uma importante fonte, pois contêm mais de 95% da APP circulante (DI LUCA et al., 2000; EVIN et al., 2003; KAR et al., 2004; ZAINAGHI et al., 2007). As plaquetas também apresentam concentrações das isoformas da APP equivalentes às encontradas no tecido cerebral, com exceção da isoforma 695, que é abundante no cérebro e praticamente indetectável em plaquetas, onde a mais abundante é a isoforma 770 (PADOVANI et al., 2001; WILTFANG et al., 2009).

As anormalidades bioquímicas do metabolismo da APP que levam à formação de agregados de A β levam também à desregulação de sinais intracelulares que contribuem adicionalmente para a hiperfosforilação da proteína tau (LOVESTONE et al., 2002; KAR et al., 2004).

A proteína tau pertence à família de proteínas associadas aos microtúbulos, encontradas nas células neuronais (predominantemente expressa em axônios) e não neuronais. O gene humano da tau está localizado no braço longo do cromossomo 17 (WILTFANG et al., 2009). Estudos sobre o papel das proteínas tau têm revelado que sua principal função é promover a estabilidade da estrutura dos microtúbulos neuronais (BALLATORE et al., 2007; WILTFANG et al., 2009).

O grau de fosforilação da proteína tau é um fator determinante da sua capacidade de interagir com os microtúbulos. A hiperfosforilação da tau resulta na perda de função desta proteína nos microtúbulos, contribuindo para a vulnerabilidade dos neurônios e induzindo a degeneração celular (MUNOZ & FELDMAN, 2000; BALLATORE et al., 2007). O estado de hiperfosforilação da proteína tau na DA pode causar a dissociação desta nos microtúbulos. De acordo com a densidade e tamanho destes filamentos, estes podem distorcer o corpo da célula e também distorcer seu núcleo alterando sua atividade, podendo levar o neurônio à morte (KAR et al., 2004).

Alguns grupos de neurônios são preferencialmente afetados pelos emaranhados neurofibrilares na DA, como, por exemplo, os neurônios da área do hipocampo que estão envolvidos no processamento de experiências antes do armazenamento como memória permanente. Isto se correlaciona com déficits observados nas fases iniciais da DA, na aprendizagem e na criação de novas memórias, bem como com a preservação de memórias estabelecidas (MUNOZ & FELDMAN, 2000).

A relação entre as placas amilóides e os emaranhados neurofibrilares é incerta, mas sabe-se que o acúmulo da A β predispõe à hiperfosforilação da proteína tau. Outro ponto importante a considerar é a disfunção do sistema colinérgico produzindo uma deficiência de memória. Cérebros de pacientes portadores da DA mostraram degeneração dos neurônios colinérgicos, ocorrendo também uma redução dos marcadores colinérgicos, sendo que a colina acetiltransferase e a acetilcolinesterase tiveram sua atividade reduzida no córtex cerebral de pacientes portadores da DA (SERENIKI & VITAL, 2008).

2.3.2 Quadro clínico e fatores de risco

O quadro clínico da DA é extremamente variável. Os primeiros sintomas da DA aparecem usualmente após os 65 anos. Cada paciente apresenta sinais e sintomas da DA de forma única, mas existem pontos em comum. Nos estágios iniciais da doença a perda da memória pode não ser percebida ou ser atribuída a esquecimento ocasional. Todavia, os problemas cognitivos começam lentamente a interferir nas atividades diárias, tais como manter as finanças sob controle, seguir instruções no emprego, condução inadequada do veículo e descontrole nas compras domésticas. Algumas pessoas não têm consciência dessas dificuldades, conhecida como agnosognosia, e outras têm uma percepção considerável, o que gera frustração e ansiedade (HUEB, 2009).

Observa-se tendência ao esquecimento de fatos recentes e dificuldade para registrar novas informações. Esses sintomas se instalam de forma insidiosa, com piora lentamente progressiva, embora períodos de relativa estabilidade clínica possam

ocorrer. Alterações de linguagem (principalmente anomia), distúrbios de planejamento (funções executivas) e de habilidades visuoespaciais surgem com a evolução do quadro. Na faixa pré-senil (antes dos 65 anos), os distúrbios de linguagem podem ser a manifestação predominante do processo demencial, enquanto sintomatologia psicótica (como ideias delirantes, sobretudo de caráter persecutório, e alucinações) é habitualmente mais comum nos pacientes mais idosos. Estas alterações mantêm paralelo com a evolução neuropatológica da doença (VALE, 2006).

Nas fases intermediárias da enfermidade a pessoa é incapaz de trabalhar e se confunde com facilidade, exigindo supervisão diária. A linguagem pode ficar comprometida, especialmente na sua compreensão. Em algumas pessoas a afasia é um aspecto precoce e proeminente. Várias apraxias também são comuns, ou seja, déficits na execução de tarefas motoras sequenciais, como vestir e comer. Os padrões de sono e vigília ficam perturbados e o hábito de vagar pela casa durante a noite é frequente. Alguns deles desenvolvem marcha arrastada, com rigidez muscular generalizada com inadequação dos movimentos. O óbito, em geral, decorre de desnutrição, infecções secundárias ou cardiopatia. A duração mais frequente da DA é de 8 a 10 anos (HUEB, 2009).

Além das dificuldades de atenção e fluência verbal, outras funções cognitivas deterioram à medida que a patologia evolui, entre elas a capacidade de fazer cálculos, as habilidades visuoespaciais e a capacidade de usar objetos comuns e ferramentas. Sintomas depressivos são observados em até 40-50% dos pacientes, enquanto transtornos depressivos acometem em torno de 10-20% dos casos (WRAGG & JESTE, 1989; FORLENZA, 2000). Outros sintomas, como a apatia, a lentificação da marcha ou do discurso, a dificuldade de concentração, a perda de peso, a insônia e a agitação podem ocorrer como parte da síndrome demencial (SERENIKI & VITAL, 2008).

Diversos e complexos são os fatores que, combinados, podem aumentar ou diminuir o risco de uma pessoa desenvolver DA. Dentre os fenômenos reconhecidos se encontram idade avançada, histórico familiar de demência e aspectos genéticos.

Outros fenômenos ainda estão sendo estudados como, por exemplo, ser do sexo feminino, ter baixa escolaridade, histórico de depressão e ser portador de doenças vasculares (MUNOZ & FELDMAN, 2000; VALE, 2006).

O sexo feminino pode ser um fator de risco independente da longevidade das mulheres. As mulheres frequentemente queixam de distúrbios da memória no período perimenopausal, chegando a cifras de 60%. Entretanto, a queixa pode envolver uma série de sintomas rotulados como sendo “memória fraca”, tais como falta de concentração, dificuldade de lembrar nomes, esquecimento da razão pela qual entrou num cômodo da casa ou o esquecimento de compromissos e fatos. Apenas a última queixa poderia refletir uma dificuldade na memória, dependente do hipocampo e de outras estruturas do lobo temporal. As pesquisas experimentais sugerem que o estrógeno desempenharia um papel no aprendizado e na memória (BIRGE, 1997; MUNOZ & FELDMAN, 2000; APRAHAMIAN et al., 2009).

Estudo conduzido por Snowdon e colaboradores, em 1997, mostrou que a presença de infarto cerebral, mesmo que pequeno, aumenta o risco de demência em até 20 vezes em indivíduos com lesões características da DA. Este pode ser o mecanismo mais comum de lesões vasculares que contribui para a demência, uma vez que o infarto cerebral em indivíduos sem lesões da DA apresentaram poucas alterações cognitivas (MUNOZ et al., 1997). Assim, o tratamento da hipertensão e outros fatores de risco vascular e da promoção da alimentação saudável e atividade física poderiam potencialmente reduzir a incidência de demência (SNOWDON et al., 1997; MUNOZ et al., 1997; POIRIER, 2003).

Embora os fatores ambientais possam aumentar o risco de DA esporádica, a doença parece ter uma base genética significativa. A influência dos fatores genéticos é inversamente proporcional à idade de início da DA. As formas precoces, cujo início se dá antes dos 65 anos, estão associadas a mutações nos genes descritos como determinantes da DA: gene da APP, gene precursor da presenilina 1 (PSEN 1) e gene precursor da presenilina 2 (PSEN 2) (MUNOZ & FELDMAN, 2000; KAR et al., 2004).

Entretanto, mutações nos genes da APP, PSEN 1 e PSEN 2 são responsáveis apenas por 5% do total de casos de DA. Os 95% restantes são, na maioria, casos esporádicos de início tardio, com etiologia complexa devido a interações entre componentes ambientais e genéticos (FRIDMAN et al., 2004).

A primeira mutação identificada foi no gene da APP localizado no cromossomo 21, explicando alguns casos familiares. Adultos com trissomia do 21 sistematicamente desenvolvem características neuropatológicas típicas de DA após os 40 anos de idade. Podem desenvolver demência progressiva superposta ao seu retardamento mental subjacente (SERENIKI & VITAL, 2008; HUEB, 2009).

Mutações no gene das presenilinas 1 e 2 causam respectivamente 30% a 70% dos casos de DA de início precoce (SAMAIA & VALLADA FILHO 2000; VALE, 2006). As presenilinas são proteínas cujas funções ainda não estão bem estabelecidas, que foram assim denominadas pela associação dos genes correspondentes (PSEN1 e PSEN2) com a DA. Sabe-se que mutações nesses genes, identificados nos cromossomos 14 e 1, estão relacionadas com alterações na clivagem da APP, aumentando a produção da A β . A PSEN 1 está relacionada com o processo inflamatório e pode interferir no processo de apoptose, e mutações no gene da PSEN2 podem acelerar o processo de neurodegeneração (LUCATELLI et al., 2009; HUEB, 2009).

Na forma usual da doença, cujo início se dá após os 60 anos, a importância dos fatores genéticos é menor e está relacionado ao gene codificador da apolipoproteína E (Apo E – proteína plasmática envolvida no metabolismo do colesterol), localizada no cromossomo 19. Esse gene é composto de três alelos comuns (ϵ 2, ϵ 3 e ϵ 4). A presença do alelo do tipo 4 demonstrou uma maior associação ao número de placas senis e placas vasculares, além de uma redução da função colinérgica em cérebros de pacientes portadores de DA (SAMAIA & VALLADA FILHO 2000; OJOPI et al., 2004).

Em populações caucasianas, o alelo mais frequente é o $\epsilon 3$, ocorrendo em cerca de 75% dos cromossomos, enquanto as frequências dos alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 4$ são de 8% e 15%, respectivamente. Estudos epidemiológicos demonstraram que, em indivíduos com DA, a frequência do alelo $\epsilon 4$ é desproporcionalmente elevada, com valores geralmente situados entre 25% e 40%. Além disso, os portadores do alelo $\epsilon 4$ tendem a desenvolver os sintomas de DA mais precocemente, efeito ainda mais evidente nos homocigotos. Em contraste, o alelo $\epsilon 2$ pode conferir um discreto efeito protetor porque sua frequência tem sido referida como um pouco menor entre indivíduos com DA que na população geral, mas este resultado não tem se reproduzido sistematicamente. Quando indivíduos com alelos $\epsilon 2/\epsilon 3$ apresentam DA, a idade de início é mais avançada que nos portadores de $\epsilon 4$ (OJOPI et al., 2004; VALE, 2006; SERENIKI & VITAL, 2008; HUEB, 2009).

Assim como há fatores de risco para a doença, existem também fatores protetores. A escolaridade é identificada em inúmeros estudos, como protetora, provavelmente pelo conseqüente aumento da densidade sináptica de regiões corticais e pela maior capacidade de compensação de deficiências intelectuais dos indivíduos com maior escolaridade (CUMMINGS et al., 1998). Os sujeitos com alta escolaridade apresentam melhor rendimento em testes neuropsicométricos mais simples como o Mini-Exame do Estado Mental (BUTLER et al., 1996). No estudo realizado em Catanduva (HERRERA et al., 1998), observou-se relação inversamente proporcional entre a prevalência de demência e a escolaridade. Nos indivíduos com oito anos ou mais de escolaridade a prevalência foi de 3,5%, enquanto que nos analfabetos foi de 12,2%.

2.3.3 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da DA é complexo e deve ser realizado de forma segura e confiável. Este se baseia primeiramente em definir a presença de demência e, após, em exclusão de outras doenças por meio das características clínicas, sendo auxiliado por exames laboratoriais e de imagem (SAMAIA & VALLADA FILHO 2000; VALE, 2006; HUEB, 2009). Existe um atraso médio de cerca de 3 anos a partir de

quando os sintomas iniciais aparecem, para quando a DA é diagnosticada (JORST & GROSSBERG, 1995).

Vários instrumentos clínicos são usados para se chegar ao diagnóstico incluindo uma história médica completa do paciente e de sua família; exame neurológico e testes neuropsicológicos, que avaliam a memória e o estado mental, o grau de atenção e concentração e das habilidades de resolver problemas e nível de comunicação; revisão do uso de fármacos; exame físico; avaliação psiquiátrica; e testes laboratoriais como exames de sangue e urina, exames de imagem são usados para determinar o tipo de demência e/ou avaliar sua gravidade (NITRINI et al., 2005). Os testes de rastreio cognitivo como o Mini-Exame do Estado Mental (MEEM), o teste do Desenho do Relógio, o teste de Fluência Verbal e a Escala de Demência de Blessed são exemplos de testes utilizados para a avaliação inicial de pacientes com suspeita de comprometimento cognitivo (APRAHAMIAN et al., 2009).

Segundo Nitrini e colaboradores (2005) devido às características de heterogeneidade educacional de nossa população, testes neuropsicológicos elaborados para avaliar indivíduos de escolaridade alta e de cultura distinta podem não ser indicados para uso em nosso meio. Este fato tende a dar origem a adaptações que podem produzir formas diferentes de aplicação do mesmo teste, situação a ser evitada.

Todos esses exames podem melhorar a exatidão do diagnóstico, embora ainda não sejam específicos para DA e nem tenham validade absoluta. O exame do líquido cefalorraquiano está indicado em situações particulares (NITRINI et al., 2005). Esses exames permitem a identificação de diversas causas potencialmente reversíveis de demência, além de possibilitarem detecção de eventuais doenças associadas (CARAMELLI & BARBOSA, 2002).

O Mini Exame do Estado Mental (MEEM) tornou-se um importante instrumento de rastreio de comprometimento cognitivo. Provavelmente é o teste de rastreio mais utilizado no mundo (BERTOLUCCI, 2000). De acordo com Brucki et al., (2003), o MEEM foi desenvolvido com o objetivo de diferenciar pacientes psiquiátricos com

quadros orgânicos funcionais. Com o passar do tempo, a escala passou a ser utilizada como um instrumento para orientar a avaliação de pacientes com demência, sendo seu uso recomendado para a realização tanto do diagnóstico de demência como da doença de Alzheimer. Entre os testes podemos destacar a bateria do CERAD (HEYMAN et al., 1996), na qual a recordação tardia de uma lista de 10 palavras é solicitada cerca de cinco minutos após o registro.

Segundo Almeida (1998), os escores do MEEM sofrem influência significativa da idade e da escolaridade do indivíduo, sugerindo a necessidade de se utilizar pontos de corte diferenciados de acordo com a escolaridade. Em um estudo realizado em São Paulo com duzentos e onze pacientes com mais de 60 anos de idade, a escala apresentou sensibilidade de 84% e especificidade de 60% quando o tradicional ponto de corte 23/24 foi utilizado. Contudo, o estudo mostrou que levando a idade em consideração, o ponto de corte 19/20 era o mais adequado para o diagnóstico de demência no caso de idosos sem escolaridade. Os índices de sensibilidade e especificidade foram respectivamente 80% e 71%. Para idosos com alguma instrução escolar o ponto de corte deve ser 23/24, e está associado a sensibilidade de 78% e especificidade de 75% (ALMEIDA, 1998).

A investigação das características neuropsicológicas nos estágios iniciais da DA é fundamental para uma melhor compreensão da doença e o estabelecimento do seu diagnóstico precoce. Estudo realizado por Charchat e colaboradores (2001) ao comparar o desempenho nos diferentes testes da bateria de testes neuropsicológicos computadorizados (BTNC) intragrupos e intergrupos, identificou alterações neuropsicológicas presentes nos estágios iniciais da DA. As principais características neuropsicológicas dos estágios iniciais da DA foram: i) tempo de reação aumentado indicando uma lentidão no processamento das informações pelo sistema nervoso central; ii) comprometimento da memória episódica observado em todos os testes, porém, mais acentuado para o teste de memória verbal, indicando um acometimento bilateral dos lobos temporais, com predomínio do hemisfério dominante (esquerdo); iii) comprometimento da memória de curto prazo que tem sido correlacionada com disfunção no lobo frontal.

Embora a sensibilidade do diagnóstico clínico seja relativamente alta (93%), a especificidade pode ser mais baixa – 55%, conforme relatado por um estudo clínico-patológico multicêntrico (MAYEUX, 1998). Em mãos experientes, o diagnóstico clínico de DA pode ser preditivo da confirmação neuropatológica em 80% a 90% dos casos; contudo, o diagnóstico da DA em fases iniciais assim como o diagnóstico diferencial das apresentações demenciais incomuns continuam sendo tarefas difíceis em bases puramente clínicas (WILTFANG et al., 2009).

Para Daffner (2000), a exatidão do diagnóstico tornou-se um grande desafio. A exatidão do diagnóstico pode promover importantes informações prognósticas para as famílias, permitindo gerar expectativas apropriadas e planejar as necessidades futuras dos pacientes. Talvez de forma mais significativa, tais esforços em si obter um diagnóstico mais exato podem ajudar a identificar condições potencialmente reversíveis ou tratáveis que tenham contribuído para o declínio cognitivo e demência.

Os médicos podem realizar o diagnóstico como “possível” ou “provável” para a DA. Segundo o *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) (MCKHANN et al., 2011), os critérios para o diagnóstico clínico de DA “possível”, “provável” e “definitiva”, são: i) DA possível - presença de síndrome demencial, na ausência de outras anormalidades neurológicas, psiquiátricas ou sistêmicas, suficientes para causar demência, podendo haver a presença de doenças secundárias sistêmicas ou cerebrais que poderiam ser a causa do quadro, mas não são consideradas como tal; ii) DA provável - demência estabelecida por exame clínico e documentada por MEEM ou escala de demência de Blessed ou outro exame similar, confirmada por testes neuropsicológicos; déficit em duas ou mais áreas da cognição; progressiva piora da memória e de outras funções, sem distúrbio de consciência; início entre idades de 40 e 90 anos, mais frequentemente acima de 65 anos; e ausência de outros distúrbios sistêmicos ou cerebrais, que poderiam ser causas do déficit de memória e cognição progressivos. O diagnóstico de DA provável pode ser corroborado por deterioração progressiva de funções cognitivas específicas, tais como afasia, apraxia e agnosia; comprometimento de AVDs e

alterações de comportamento; história familiar de distúrbios similares, particularmente se confirmadas por exame neuropatológico; e outros exames incluindo punção lombar normal, eletroencefalograma normal ou com alterações inespecíficas (como aumento de atividade de onda lenta) e evidência na tomografia computadorizada de atrofia; iii) DA definitiva - somente evidências histopatológicas, obtidas por biópsia ou autópsia, permitem o diagnóstico de certeza.

O diagnóstico definitivo da DA é estabelecido após identificação dos achados histopatológicos típicos através do exame anatomopatológico do tecido cerebral. Conseqüentemente, o diagnóstico da síndrome demencial é, habitualmente, clínico, tendo sido convencionados, ao nível internacional, critérios para determinar o diagnóstico provável (ou possível) de cada uma das principais demências degenerativas. Os critérios mais utilizados são propostos pelo Manual Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais da Associação Psiquiátrica Americana (DSM-IV) e Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos - Associação de Doença de Alzheimer e Doenças Relacionadas (NINCDS-ADRDA) (NITRINI et al., 2005). Entretanto, nos últimos anos ocorreram importantes avanços no entendimento da DA, tais como a observação de diversos espectros clínicos além do amnésico e a maior capacidade de detectar *in vivo* os processos fisiopatológicos da doença, tornando necessária a revisão desses critérios (FROTA et al., 2011).

Nos critérios anteriores, a DA somente era diagnosticada quando havia demência enquanto na nova proposta a DA pode ser diagnosticada em três fases ou estágios: DA pré-clínica, comprometimento cognitivo leve (CCL) devido à DA e demência, sendo que o diagnóstico da fase pré-clínica deve ser restrito à pesquisa (FROTA et al., 2011).

Segundo Frota e colaboradores (2011) a nova proposta para o diagnóstico de demência no Brasil exige o comprometimento funcional e cognitivo, atingindo este último pelo menos dois dos seguintes cinco domínios a seguir: memória, função executiva, linguagem, habilidade visual-espacial e alteração de personalidade. O diagnóstico do comprometimento cognitivo leve é clínico, podendo, em situações de

pesquisas, serem utilizados marcadores biológicos buscando maior probabilidade de evolução para DA.

A inclusão de biomarcadores, no diagnóstico, foi recomendada por enquanto somente em pesquisa clínica. Novos estudos precisam ser realizados para validar os critérios de CCL associado à biomarcadores, assim como os critérios da fase pré-sintomática da DA. Entretanto, podem ser utilizados como instrumentos opcionais, quando considerados apropriados pelo clínico (FROTA et al., 2011; MCKHANN et al., 2011).

Segundo Frota e colaboradores (2011) estas novas recomendações para o diagnóstico de DA representam um avanço em relação às de 2005. Em primeiro lugar, o que era designado como DA nos critérios de 2005 passou a ser denominado demência da DA, enquanto a designação geral admite a fase pré-clínica e o CCL devido à DA. Para o diagnóstico de demência não existe mais a obrigatoriedade do comprometimento da memória que é exigido pelo DSM IV (American Psychiatric Association, 1994), DSM-III-R (American Psychiatric Association, 1987) e pelo CID-10 (WHO 1993) e que eram recomendados em 2005 (NITRINI et al., 2005).

Diferentemente dos critérios anteriores, o diagnóstico de demência ou de DA somente necessita de confirmação por meio de avaliação neuropsicológica quando a anamnese e a avaliação cognitiva realizada pelo médico forem insuficientes para o diagnóstico. A limitação da idade de início entre 40 e 90 anos também foi excluída dos critérios atuais (FROTA et al., 2011). Assim, a principal diferença entre as novas recomendações para o diagnóstico de demência da DA foi a inclusão da necessidade de exame de imagem, tomografia de crânio ou preferencialmente ressonância magnética do crânio para excluir outras etiologias ou co-morbididades (MCKHANN et al., 2011; FROTA et al., 2011).

2.4 Doença de Alzheimer e biomarcadores

A apresentação clínica da DA pode variar enormemente dificultando o seu diagnóstico, o qual envolve história clínica, exames físico e neurológico, avaliação neuropsicológica, exames de imagem do cérebro, além de um número de outros possíveis procedimentos incluindo testes de urina, sangue, líquido cefalorraquidiano, testes genéticos, eletroencefalograma, angiografia e, raramente, biopsia cerebral. Lamentavelmente o diagnóstico é frequentemente demorado devido a fatores como avaliações prolongadas por múltiplos profissionais e dificuldade de diagnóstico precoce, principalmente devido à sintomatologia sutil apresentada. A avaliação inicial dos pacientes com dificuldades cognitivas e possível demência constitui ainda um grande desafio principalmente para médicos não especialistas (GOODMAN, 2008).

A introdução das drogas antidemência, tais como os inibidores da acetilcolinesterase para o tratamento da DA, representou um potencial benefício terapêutico considerável (WILTFANG et al., 2009). O diagnóstico precoce constitui ainda um grande problema na prática clínica. Portanto, o desenvolvimento e introdução de um biomarcador para diagnóstico precoce e avaliação da terapêutica, utilizando sangue ou urina, é extremamente desejável (DIAZ, 2001). Os biomarcadores têm o papel de auxiliar em várias etapas tais como no diagnóstico precoce, avaliação do estágio da doença, eficácia terapêutica dos medicamentos, bem como diferenciar de outras formas de demência. Até o momento, a pesquisa de biomarcadores tem se concentrado no plasma e no líquido cefalorraquidiano (LCR) (ALUISE et al., 2008; WILTFANG et al., 2009).

Os requisitos para que um determinado teste seja aceito como parâmetro de diagnóstico para a DA foram propostos recentemente. De maneira ideal, tal teste deve ser capaz de detectar uma característica fundamental da patologia da DA, validado em casos neuropatologicamente confirmados, preciso e confiável, não invasivo, simples de realizar e barato. Além disso, a sensibilidade deve ser de aproximadamente 85% ou mais, e a especificidade deve ser igual ou superior a 75% – 85% (WILTFANG et al., 2009).

Todavia, a identificação de biomarcadores no sangue é uma alternativa desejável, por ser menos invasiva e mais tolerável para os pacientes, favorecendo a realização de determinações prospectivas, com múltiplas determinações.

2.4.1 Homocisteína

A homocisteína (Hcy) é um metabólito intermediário da via biossintética que converte a metionina em cisteína e é rapidamente oxidada no plasma a dissulfeto homocisteína e cisteína-homocisteína (Figura 3). A metionina é um aminoácido abundante em proteínas de plantas e animais, e é a principal fonte de átomos sulfurosos de proteínas. O processo de desmetilação é uma importante via metabólica que resulta em reações de metilação vitais no corpo (SACHDEV, 2004; GEBARA & MATIOLI, 2006).

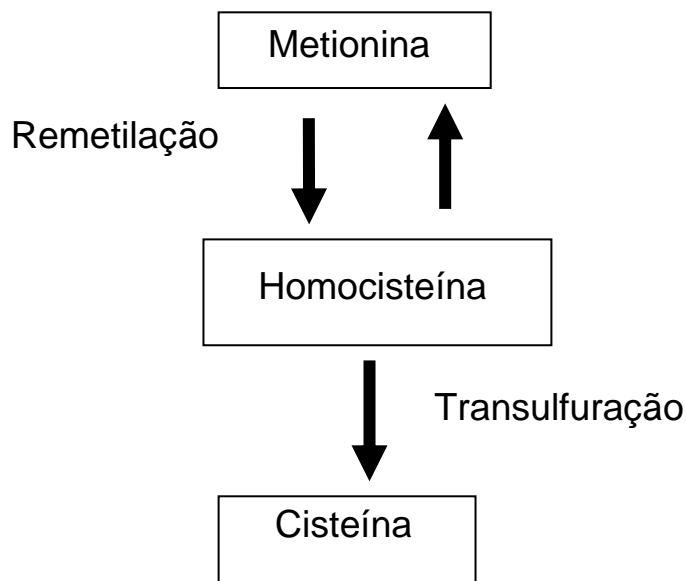


Figura 3 – Metabolismo da homocisteína

Níveis elevados de Hcy plasmática são denominados de hiperhomocisteína, sendo classificada em três níveis de severidade: leve (15-30 $\mu\text{mol/L}$), intermediário (30-100 $\mu\text{mol/L}$) e acentuado (acima de 100 $\mu\text{mol/L}$) (KORENZYN, 2002; SACHDEV, 2004; GEBARA & MATIOLI, 2006).

A elevação da Hcy no sangue possui causas multifatoriais, entre estas a ingestão elevada de metionina, redução do metabolismo, alterações genéticas ou deficiência de enzimas (cistationina β sintetase ou metilenotetrahidrofolato redutase - MTHFR) ou de vitaminas (B_{12} , B_6 e ácido fólico) importantes no processo de metabolização da Hcy, as quais podem promover o acúmulo desta e a injúria do endotélio vascular (SACHDEV, 2004).

A Hcy é reconhecida como pró-aterogênica e pró-trombótica. Níveis elevados de homocisteína possuem uma ação tóxica ao endotélio vascular, assim a hiperhomocisteinemia tem sido considerada como um fator de risco independente para o desenvolvimento da aterosclerose (SACHDEV, 2004). A Hcy plasmática elevada, por estar associada a um aumento no risco de seqüela aterosclerótica, incluindo morte por causas cardiovasculares, doença coronariana, aterosclerose da carótida e acidente vascular cerebral (AVC), sugere a hipótese de ser um fator de risco para demência. Estudos epidemiológicos e experimentais têm associado à deficiência de folato ao conseqüente aumento dos níveis de homocisteína, com várias condições degenerativas, incluindo AVC, DA e doença de Parkinson (GEBARA & MATIOLI, 2006).

Um evento chave na patogenia da DA é a formação de agregados insolúveis de $A\beta$ e este processo é favorecido por uma condição de hiperhomocisteína (GENEDANI et al., 2010).

A Hcy exerce efeitos neurotóxicos em altas concentrações sendo demonstrado ser um fator de risco para o desenvolvimento da DA (CLARKE et al., 1998). Assim Hcy elevada é um forte fator de risco para um declínio cognitivo rápido em pacientes com DA, relativamente jovem, mas torna-se progressivamente menos importante com o aumento da idade (OULHAJ et al., 2010).

A Hcy passa a ser associada à doença cardiovascular e à DA quando está presente em níveis moderadamente elevados no plasma, que pode ser ocasionado por diversos fatores, como o genético, o ambiental e o nutricional. Há evidências de que

a Hcy atue potencializando o dano endotelial e neuronal, levando à vasculopatia e neurotoxicidade, respectivamente (GEBARA & MATIOLI, 2006).

Miller, em 2000, demonstrou altos níveis séricos de homocisteína em indivíduos com DA e os comparou com indivíduos controle sem doença neurodegenerativa. Aqueles que apresentaram concentrações acima de 14 $\mu\text{mol/L}$ tiveram riscos maiores de ter DA do que aqueles com homocisteína plasmática abaixo de 11 $\mu\text{mol/L}$.

Clarke e colaboradores (1998) examinaram 164 pacientes com DA, com confirmação histológica em 76 deles, e encontraram naqueles com Hcy na linha de base nos dois tercís superiores significativamente mais atrofia do lobo temporal após três anos que os do tercil mais baixo. Tais resultados sugerem que níveis elevados de Hcy possam determinar o índice de progressão da doença.

Alguns pesquisadores (ELLINSON et al., 2004; KAGEYAMA et al., 2008) dosaram a Hcy plasmática em pacientes com DA, constatando que a concentração desta era significativamente mais elevada que a encontrada em indivíduos hígidos, passando a considerar a hiperhomocisteinemia como fator de risco para DA.

Ainda segundo Miller (2000) é possível associar quatro motivos que relacionam a doença cardiovascular com a DA. O primeiro é que não é incomum encontrar indivíduos que apresentam DA e doença vascular. Em segundo lugar, DA está geralmente associada à aterosclerose, anormalidade microvascular cerebral e hipertensão sanguínea. O terceiro lugar, a presença do alelo $\epsilon 4$ da Apo E é um provável fator de risco independente para DA e doença vascular, e a presença da Apo E em combinação com aterosclerose, doença vascular periférica e diabetes mellitus aumenta substancialmente o risco de declínio cognitivo. O último motivo, indivíduos *postmortem*, com neuropatologia definitiva que evidencia DA e infarto cerebral, possuíam prejuízo cognitivo mais grave e uma maior prevalência de demência que aqueles com evidência de DA que não apresentavam infartos cerebrais.

Uma interessante ligação entre Hcy e DA vêm de estudos recentes de uma proteína conhecida como *homocisteína-inducible endoplasmic reticulum stress protein* (HERP). Há evidências que essa proteína leva ao aumento da produção de peptídeo beta-amilóide em cultura de células. A HERP está presente na região hipocampal e em neurônios corticais, onde sua expressão é induzida por estresse do retículo endoplasmático. Esta provavelmente possui uma função neuroprotetora, pois seu nível está elevado em indivíduos com DA e, também, porque sua superexpressão protege culturas neuronais de células contra a morte induzida pelo estresse do retículo endoplasmático e do peptídeo beta-amilóide. Esta promove a homeostasia da liberação de cálcio pelo retículo endoplasmático, o que é um fator que garante a ação neuroprotetora (HO et al., 2001; KAGEYAMA et al., 2008).

2.4.2 Micropartículas plaquetárias

As plaquetas desempenham importante papel no processo da hemostasia pela sua interação com o endotélio e formação do tampão plaquetário. Segundo Ciabattini e colaboradores (2007) a ativação plaquetária persistente está aumentada na DA, estando relacionada ao aumento da peroxidação lipídica associada com níveis inadequados de vitamina E.

A hiperatividade plaquetária resulta na liberação *in vivo* do conteúdo dos grânulos alfa, especialmente as proteínas específicas das plaquetas como beta tromboglobulina (β TG) e fator plaquetário 4 (PF4). Esta ativação plaquetária pode resultar das interações com as estruturas subendoteliais, placas ateroscleróticas, superfícies artificiais e trombina (geralmente no estado de hipercoagulabilidade). A existência de nível patológico de PF4 no plasma livre de plaquetas geralmente é indicativo de ativação plaquetária (SEVUSH et al., 1998).

As micropartículas (MPs) são pequenos fragmentos de membrana que são liberados durante a ativação celular e apoptose. Muitos tipos celulares, como células endoteliais, plaquetas e leucócitos, liberam estas MPs *in vitro*, mas vários estudos

têm demonstrado a presença destes fragmentos *in vivo* (HORSTMAN & AHN, 1999; NIEUWLAND et al., 2000; JOOP et al., 2001).

Sabe-se que as características das MPs dependem da origem das células ativadas e do mecanismo de estimulação. No entanto, a importância fisiológica das MPs não foi ainda completamente elucidada. O aumento do número de MPs plaquetárias tem sido observado em pacientes que possuem um risco aumentado para doenças tromboembólicas, como aumento da ativação da coagulação, trombocitopenia idiopática, acidente vascular cerebral isquêmico, além de esclerose múltipla (HORSTMAN & AHN, 1999) e sepse (NIEUWLAND et al., 2000; JOOP et al., 2001).

As MPs originadas de plaquetas induzem a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2), de prostaglandinas e produção de citocinas em células endoteliais, aumentando a adesão de moléculas e de monócitos na superfície do endotélio, amplificando a ativação plaquetária (BARRY et al., 1998; NOMURA et al., 2001). Já as MPs originadas de leucócitos também induzem o aumento de moléculas de adesão nas células endoteliais e desencadeiam a produção de interleucinas 6 e 8 (MESRI & ALTIERI, 1998). As MPs de células endoteliais podem desencadear ativação de neutrófilo e estimular a coagulação (WEBER et al., 2000), atuando como potentes indutores pró-inflamatórios que afetam a função do endotélio. Desta forma, estes fragmentos *in vivo* podem estar envolvidos na regulação da coagulação e função vascular.

De acordo com Sevush e colaboradores (1998) as plaquetas de pacientes com DA exibem uma maior ativação espontânea quando comparado a pacientes controles. As causas em potencial para esta maior estimulação plaquetária incluem danos nas células endoteliais do cérebro, bem como anormalidades da membrana da plaqueta. À luz de evidência que plaquetas constituem a principal fonte da proteína precursora amilóide e da proteína beta amilóide no sangue de humanos, pode-se admitir que a ativação plaquetária em pacientes com DA pode refletir ou contribuir para a patogênese desta doença.

As plaquetas são uma fonte importante de A β no sistema circulatório e desempenham um importante papel pró-inflamatório. Ativadas aderem a leucócitos e células endoteliais por meio de proteínas de adesão celular como a P-selectina, *platelet-endothelial cell adhesion molecule* (PECAM) e molécula de adesão intercelular-1 e -2 (ICAM-1 e -2) e secretam mediadores inflamatórios. Além disso, as plaquetas contêm enzimas importantes envolvidas na síntese de intermediários inflamatórios, como fosfolipase A2 (PLA2) e ciclooxygenase-2 (COX-2). Relatos recentes demonstraram significativas mudanças nos níveis e atividade das plaquetas na DA. Assim, as plaquetas representam um elo importante entre a A β e reações inflamatórias especialmente em nível endotelial podendo ser consideradas um modelo celular valioso para avaliar potenciais biomarcadores inflamatórios periféricos na DA (CASOLI et al., 2010).

2.4.3 Lipídeos e apolipoproteínas

Os lipídeos são substâncias insolúveis em água, que são transportados na forma de lipoproteínas, que podem ser divididos, de acordo com sua densidade, em cinco classes: quilomícrons (Qm), lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL). A função principal das lipoproteínas plasmáticas é o transporte dos triglicérides e do colesterol dos locais de origem para os locais de armazenamento e utilização (SCHIAVO *et al.*, 2003).

Estudos sugerem uma ligação entre o colesterol e a patogênese da DA (SPARKS et al., 2000; PAPPOLLA et al., 2002). Em contraste, outros trabalhos de coortes que avaliaram pacientes mais velhos e por curto período de acompanhamento concluíram que não houve associação entre o declínio cognitivo e altos níveis de colesterol (KIVIPELTO & SOLOMON, 2006; ARVANITAKIS et al., 2008). Estudos realizados por Kivipelto e colaboradores, em 2002, sugerem que a hipercolesterolemia é apenas um dos primeiros fatores de risco para a DA.

Vários estudos têm demonstrado que a expressão do alelo $\epsilon 4$ da Apo E é um forte fator de risco para a DA de início tardio (CORDER et al., 1993; NALBANTOGU et al., 1994). A Apo E está presente em diferentes classes de lipoproteínas tais como Qm, VLDL, LDL e HDL, apresentando um papel importante na regulação do metabolismo lipídico (MAHLEY 1988). O alelo $\epsilon 4$ está associado com um aumento nos níveis de colesterol e tem sido mostrado como um fator de risco para doença arterial coronariana (VAN & MAMOTTE 1992). Assim, a associação da Apo E4 com a DA pode sugerir uma possível contribuição para os mecanismos de aterosclerose na patogênese da doença. Uma associação entre a presença do alelo $\epsilon 4$ com aterosclerose em pacientes com DA foi encontrado (KOSUNE et al., 1995).

A hipótese de que a hipercolesterolemia representa um fator de risco precoce da DA, foi recentemente comprovado por um estudo neuropatológico. Sendo a hipercolesterolemia fortemente correlacionada com a presença da proteína β amilóide no cérebro, mas apenas em indivíduos com idade entre 40 e 55 anos. As diferenças na colesterolemia desapareceram entre os indivíduos com idade acima de 55 anos com ou sem o depósito da proteína β amilóide no cérebro (PAPPOLLA et al., 2003).

De acordo com o estudo realizado por Zambón e colaboradores, em 2010, pacientes com história familiar de hipercolesterolemia mostraram maior incidência de comprometimento cognitivo leve quando comparado com aqueles sem história familiar de hipercolesterolemia (21,3% vs 2,9%). Foi possível observar diferenças significativas, independente do polimorfismo da Apo E, entre aqueles indivíduos com e sem hipercolesterolemia familiar em diversos testes de avaliação cognitiva, todos com um pior desempenho para aqueles que apresentavam a hipercolesterolemia familiar.

As apolipoproteínas são proteínas que estão em associação com lípidos nas partículas de lipoproteínas e desempenham funções importantes no metabolismo lipoprotéico, como transporte destas moléculas hidrofóbicas no meio aquoso plasmático, ligação aos receptores específicos na superfície celular para direcionar

corretamente os lípides para os órgãos-alvo e tecidos do organismo, e ativação ou inibição de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico (BEISIEGEL, 1998).

A apolipoproteína A-I (Apo A-I) é o maior componente da partícula de lipoproteína de alta densidade (HDL) representando cerca de 45% de sua massa molecular. Atua como co-fator para a enzima lecitina colesterol acil transferase, e também como mediador na transferência do colesterol das células para as partículas de HDL, processos importantes para o transporte reverso do colesterol para o fígado. O HDL colesterol, ou lipoproteínas de alta densidade são moléculas com propriedades antiaterogênicas (FRANK & MARCEL, 2000).

A concentração plasmática de Apo A-I é fortemente associada com o HDL-colesterol (HDLc), e a expressão de Apo A-I pode ser responsável pela determinação dos níveis plasmáticos de HDLc (WALLDIUS, 2004).

Em um estudo caso-controle, de 44 pacientes de início tardio da doença de Alzheimer e 43 pacientes com demência vascular, quando comparados com os controles, apresentaram níveis reduzidos de Apo A-I especialmente nos pacientes com demência vascular (KURIYAMA et al., 1994). Em outro estudo caso-controle de 45 pacientes com doença de Alzheimer e 79 controles, os níveis de Apo A-I foram menores em pacientes com doença de Alzheimer (KAWANO et al., 1995).

Evidências estão aumentando na literatura em relação à associação entre DA e lípides, uma vez que esses podem influenciar a neurodegeneração através de efeitos diretos sobre os neurônios e vasos, pela aterosclerose, ou pela inflamação crônica do cérebro. Investigações sobre o papel da Apo A-I e HDLc nas doenças arteriais coronárias, quando examinadas num modelo multivariado mostram que ambos Apo A-I e HDLc estão significativamente e inversamente associados com doenças cardíacas e neurodegenerativas (SHARP et al., 2000).

A apolipoproteína B (Apo B) é a principal proteína presente nas moléculas de LDL, IDL, VLDL e quilomícrons. A Apo B é a principal proteína funcional para o transporte de colesterol para as células periféricas (RIFAI et al., 1999). Cerca de 90% da

proteína na LDL é constituída de Apo B. Os níveis plasmáticos de Apo B estimam bem o total de massa de partículas aterogênicas. Altos níveis de Apo B são comumente encontrados em indivíduos normocolesterolêmicos, sugerindo que nem todos os riscos cardiovasculares relacionados aos lípides possam ser estimados pela determinação convencional do perfil lipídico (WALLDIUS & JUNGNER, 2007).

A Apo B apresenta-se sob duas formas, a B-48 e a B-100, diferenciadas pelo seu peso molecular. A Apo B-48, sintetizada no intestino, é constituinte dos quilomicrons e seus remanescentes (com potencial aterogênico) e metabolizada na circulação e no fígado. A Apo B-100 é sintetizada no fígado, faz parte das principais frações lipoprotéicas consideradas aterogênicas (LDL e IDL), cujo conteúdo de colesterol é variável. Somente uma molécula de Apo B-100 está presente em cada uma dessas frações. A Apo B-100 é essencial para ligação das partículas de LDL aos receptores celulares, permitindo a entrada de LDL nas células; logo um excesso de Apo B representa um fator desencadeante para o processo aterogênico. A maioria da Apo B-100 circulante encontra-se na partícula LDL sendo um fator de risco para doença coronariana. Estudos sugerem que a determinação da Apo A-I e Apo B tem maior poder discriminatório, por apresentarem menores variações analíticas, que HDL e LDL, respectivamente, na definição do risco cardiovascular (WALLDIUS 2004; WALLDIUS & JUNGNER 2007).

A Apo B está presente nos quilomicrons como Apo B-48 e nas lipoproteínas de densidade muito baixa, lipoproteína de densidade intermediária, e lipoproteínas de baixa densidade e como Apo B-100, que é responsável pela ligação da lipoproteína ao seu receptor tecidual específico (PACKARD & SHEPHERD, 1997).

Vários estudos mostraram a superioridade das determinações dos níveis plasmáticos das apolipoproteínas A-I e B, como melhores preditores de doenças ateroscleróticas do que as concentrações de lípides e lipoproteínas. Por isso, tem sido proposto que o índice Apo B/Apo A-I represente um parâmetro superior para predição de risco cardiovascular do que outros índices lipídicos, como colesterol total/HDL, LDL/HDL e colesterol não HDL/HDL (SNIDERMAN et al., 2003).

Outra vantagem do uso do índice Apo B/Apo A-I é de caráter metodológico. Apo A-I e Apo B são mensuradas diretamente no soro, enquanto que o LDLc, principal marcador utilizado para nortear o tratamento para dislipidemia, é um parâmetro calculado pela dosagem de colesterol total, triglicérides e HDLc usando a fórmula de Friedewald, válida somente para triglicérides abaixo de 400mg/dL. Os níveis de triglicérides sofrem grande influência pelo tempo de jejum realizado antes da coleta de sangue e o coeficiente de variação oscila entre 5 a 10%. Já os erros nas dosagens das apolipoproteínas são inferiores a 5% (WALLDIUS & JUNGNER, 2007).

Desde a sua descoberta em 1963, a lipoproteína(a) [Lp(a)] tem sido alvo de numerosas pesquisas. O interesse sobre esta lipoproteína decorre de diversos estudos clínicos, que estabeleceram uma correlação significativa entre seus níveis elevados e desenvolvimento de doenças coronariana e cerebrovascular (BACH-NGOHOU et al., 2001; SBC, 2001).

A lipoproteína(a) é semelhante à LDL, mas contém uma glicoproteína adicional, denominada apolipoproteína(a), acoplada à apolipoproteína B por pontes de dissulfeto (BOFFA et al., 2004). A Lp(a) é uma glicoproteína polimórfica, tem variado número de repetições de sequência de aminoácidos, homólogos à região do Kringle 4 do plasminogênio (CAIN et al., 2005). Tal glicoproteína pertence à família do plasminogênio e atua como um inibidor competitivo do ativador tecidual do plasminogênio (t-PA) inibindo a geração de plasmina e a fibrinólise, características que conferem à Lp(a) propriedades pró-aterogênicas (SBC, 2001). Além disso, a Lp(a) é fagocitada por macrófagos, que precede a formação das células espumosas seguindo um caminho semelhante ao LDLc na formação da placa aterosclerótica, mas seu depósito subendotelial é maior por ter maior afinidade pela fibrina (HOLANDA et al., 2004).

A Lp(a) é sintetizada no fígado e a ligação com a Apo B pode ocorrer tanto no espaço intracelular ou extracelular, dependendo do estado metabólico do indivíduo. A Lp(a) não é produto metabólico de outras lipoproteínas contendo Apo B, como a lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), sendo, portanto, sintetizada

independentemente das lipoproteínas ricas em triglicérides (KREMPLER et al., 1979). Tal fato justificaria a observação de que a concentração plasmática da mesma não é influenciada pela dieta (BROWN et al., 1991). O metabolismo da Lp(a) não está completamente esclarecido, e os estudos demonstram que as variações de suas concentrações plasmáticas dependem mais da síntese do que do catabolismo desta lipoproteína (KOSCHINSKY et al., 2004). Os níveis plasmáticos de Lp(a) e a sua massa molecular são determinados geneticamente, portanto são muito variáveis entre as pessoas (MARCOVINA et al., 2003). Contudo, certas anormalidades metabólicas podem influenciar nas concentrações circulantes de Lp(a). Estes valores podem ser aumentados como parte de uma resposta de fase aguda, no diabetes mellitus, insuficiência renal crônica, síndrome nefrótica, câncer, menopausa e hipotireoidismo (MILIONIS et al., 2000).

A lipoproteína(a) intacta, assim como lipoproteína(a) livre e os fragmentos proteolíticos de lipoproteína(a) foram identificados em lesões ateroscleróticas (HOFF et al., 1993). Além disso, a Lp(a) pode competir com o plasminogênio e, conseqüentemente, inibir a quebra da fibrina, gerando um estado de hipercoagulabilidade, contribuindo para a trombogênese (SCHACHTER, 2000). A lipoproteína(a) está presente em altas concentrações em artérias com aterosclerose quando comparadas com artérias normais, o que contribui para a redução da atividade fibrinolítica na placa aterosclerótica (DURIEZ et al., 1996).

Em relação a Lp(a) e DA existem estudos na literatura que associam um risco aumentado de desenvolvimento de DA com níveis elevados de Lp(a) (SOLFRIZZI et al., 2002).

Está bem estabelecido a associação de lesões aterotrombóticas com níveis elevados de Lp(a). Contudo, estudos que revelam uma associação entre a DA e Lp(a) ainda tem que ser mais consistentes. Por ser uma lipoproteína que acelera prematuramente o processo aterosclerótico, alguns estudos observaram que talvez a Lp(a) constituísse um alvo contra distúrbios cardiovasculares e neurodegenerativos (MOOSER, 2000; BOWMAN et al., 2012).

2.4.4 Polimorfismo da apolipoproteína E

O gene humano Apo E, localizado no braço longo do cromossomo 19 (19q13.2), codifica uma glicoproteína de 317 aminoácidos, que constitui uma das muitas classes de apolipoproteínas que transportam lipídios no plasma e em outros fluidos corpóreos. Seu papel é fundamental na redistribuição de triglicerídios e de colesterol em diferentes tecidos (OJOPI et al, 2004). Esse gene é composto de três alelos comuns ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$). Esses alelos são definidos por 2 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos resíduos 7412 e 429358 (BARBER, 2010; BEKRIS et al, 2010).

As isoformas protéicas produzidas por esses alelos diferem na composição de aminoácidos nas posições 112 e/ou 158. O alelo $\epsilon 2$ possui o aminoácido cisteína em ambas as posições da proteína; o $\epsilon 3$, cisteína na posição 112 e arginina na 158 e o alelo $\epsilon 4$ possui arginina nas duas posições (OJOPI et al., 2004). Essa substituição cisteína-arginina afeta a estrutura tridimensional e as propriedades de ligação aos lipídios entre as isoformas (BERKIS et al., 2010).

A Apo E é também a principal apolipoproteína encontrada no cérebro (OJOPI et al, 2004). Esta coordena a mobilização e a redistribuição do colesterol da mielina e das membranas neuronais (LEDUC et al., 2010). Além disso, está envolvida no reparo sináptico em resposta à injúria tecidual, na manutenção da estrutura neuronal e na função colinérgica (MUNOZ & FELDMAN, 2000).

As combinações dos três alelos dão origem a seis genótipos diferentes e sua frequência varia entre diferentes grupos étnicos. O alelo mais comumente encontrado na população caucasiana é $\epsilon 3$, correspondendo a aproximadamente 78% dos indivíduos. A frequência dos alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 4$ é aproximadamente de 8% e de 14%, respectivamente na mesma população (MUNOZ & FELDMAN, 2000).

Um estudo feito na região sudeste do Brasil identificou uma forte associação entre Apo E $\epsilon 4$ e DA, tendo sido o alelo $\epsilon 4$ encontrado com uma frequência de 39% em portadores da DA, valor cerca de quatro vezes maior que o encontrado nos indivíduos saudáveis da mesma localidade (DE-ANDRADE et al., 2000). Outro

estudo com 126 indivíduos brasileiros (SOUZA et al., 2003) mostrou que a frequência do alelo $\epsilon 2$ foi consideravelmente menor no grupo de pacientes com DA (1%; n=68); as frequências do alelo Apo E $\epsilon 3$ e do genótipo Apo E $\epsilon 3/\epsilon 3$ foram maiores nos controles (84% e 72%, respectivamente; n=58), enquanto as frequências do alelo Apo E $\epsilon 4$ e do genótipo Apo E $\epsilon 3/\epsilon 4$ foram maiores nos indivíduos com DA (25% e 41%, respectivamente).

Independentemente da etnia, o alelo $\epsilon 4$ é mais frequentemente encontrado em pacientes com DA, quando comparado ao grupo controle, tendo sido associado a um maior risco do desenvolvimento da doença, com idade menor para início dos sintomas em ambas as formas familiar e esporádica e com maior déficit cognitivo (DURON & HANON, 2008; BEKRIS et al., 2010).

A presença do alelo $\epsilon 4$ demonstrou uma maior associação com o número de placas senis e placas vasculares, além de uma redução da função colinérgica em cérebros de pacientes portadores de DA (SAMAIA & VALLADA FILHO, 2000; OJOPI et al., 2004). Além disso, os portadores do alelo $\epsilon 4$, conforme dito anteriormente, tendem a desenvolver os sintomas de DA mais precocemente, efeito ainda mais evidente nos homozigotos. Em contraste, o alelo $\epsilon 2$ pode conferir um discreto efeito protetor porque sua frequência é menor entre indivíduos com DA quando comparado à população geral, mas este resultado não tem se reproduzido sistematicamente. Quando indivíduos com alelos $\epsilon 2/\epsilon 3$ apresentam DA, a idade de início é mais avançada que nos carreadores de $\epsilon 4$ (TSAI et al., 1994; OJOPI et al., 2004; VALE, 2006; HUEB, 2009).

Estudos epidemiológicos demonstraram que, em indivíduos com DA, a frequência do alelo $\epsilon 4$ é desproporcionalmente elevada, com valores geralmente situados entre 25% e 40%. Pessoas com um alelo $\epsilon 4$ têm entre 2,2 e 4,4 mais chance de desenvolver DA que pessoas com alelos $\epsilon 3/\epsilon 3$, enquanto os homozigotos para o alelo $\epsilon 4$ têm de 5,1 a 34,3 maior chance (FARRER et al, 1997; OJOPI et al., 2004; VALE, 2006; HUEB, 2009).

Schachter e colaboradores (1994) demonstraram que pessoas que possuem o alelo $\epsilon 2$ têm maior probabilidade de se tornarem centenárias que aquelas com o alelo $\epsilon 3$, que, por sua vez, parecem ter maior sobrevivência que pessoas com o alelo $\epsilon 4$.

Os mecanismos pelos quais o alelo $\epsilon 4$ poderia influenciar na patologia da DA são incertos. No entanto, têm sido sugeridos atuação no metabolismo da APP e no acúmulo do peptídeo A β em placas senis e vasculares, aumento da hiperfosforilação da proteína tau e formação de novos neurofibrilares, redução da função colinérgica cerebral, aumento de processos oxidativos, inflamatórios ou de apoptose neuronal e alteração do metabolismo e do transporte lipídico, assim como da biossíntese de membranas neuronais (CORDER et al., 1998; CZYZEWSKI et al., 1998; CACABELOS, 2007; DURON & HANON, 2008).

Além da influência exercida na DA, essas isoformas têm sido relacionadas com os níveis plasmáticos de lipídios e com o risco de doença cardiovascular, sendo que os alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 4$ frequentemente têm exercido efeitos opostos (DE-ANDRADE et al., 2000). O alelo $\epsilon 4$ tem sido associado com altos níveis plasmáticos de colesterol total e de LDL, ambos considerados fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose. É também provável que esse polimorfismo influencie o desenvolvimento de demência por meio de processos neurodegenerativos e de aterogênese (JASINSKA-MYGA et al., 2007).

Um estudo realizado por De-Andrade e colaboradores (2000) no sul do Brasil demonstrou a associação do alelo $\epsilon 2$ com baixos níveis de triglicérides e de colesterol total e não-HDL em homens e mulheres. Inversamente, o alelo $\epsilon 4$ foi associado com altos níveis desse lipídio, mas a relação só foi observada em mulheres.

A contribuição da presença do alelo $\epsilon 4$ no desenvolvimento da DA está presente em ambos os sexos, etnias e em todas as idades, embora a força de associação pode variar dependendo destes fatores (MUNOZ & FELDMAN, 2000). A idade possui um papel particularmente importante no desenvolvimento de DA, uma vez que o risco de desenvolver a doença parece aumentar com a idade até certo ponto, a partir do qual

cai vertiginosamente. A presença de dois alelos $\epsilon 4$ é responsável por uma grande diminuição na idade de início da doença, enquanto que a presença de apenas um alelo $\epsilon 4$ é responsável por uma diminuição menos acentuada (PANZA et al., 2002). Um estudo recente avaliou o grau de risco conferido pelos diferentes genótipos de apo E entre indivíduos da mesma faixa etária. Os resultados mostram que indivíduos com idade de 80 anos que apresentam $\epsilon 3/\epsilon 4$ possuem uma taxa de incidência de DA aumentada em 3,4 vezes em relação a indivíduos $\epsilon 3/\epsilon 3$. Indivíduos que são $\epsilon 4/\epsilon 4$ possuem taxa de incidência aumentada 9,4, enquanto os que possuem a isoforma $\epsilon 2$ apresentam redução de 43% no risco apresentado por um indivíduo $\epsilon 3/\epsilon 3$, sugerindo um papel protetor do alelo $\epsilon 2$ (EWBANK, 2002).

Diversos estudos confirmam que a simples presença da isoforma $\epsilon 4$ de Apo E não é suficiente para o desenvolvimento da DA. No entanto, os alelos da Apo E são fatores importantes que, de acordo com sua variação, têm o efeito de induzir ou proteger contra a doença no processo de instauração da doença. Neste sentido, alguns grupos vêm estudando o papel dos polimorfismos da região promotora do gene Apo E e sua influência no desenvolvimento da DA. Polimorfismos na região promotora dos genes podem alterar a sua transcrição, gerando diferentes quantidades do RNA mensageiro e da respectiva proteína. Na região promotora do gene da Apo E, já foram identificados polimorfismos nas regiões -219 G/T, -427 C/T e -491 A/T (OJOPI et al., 2004).

Embora o estudo da genética da DA já esteja avançado, muitas lacunas ainda existem sobre os seus mecanismos de instauração, desenvolvimento e fatores de risco associados, quer sejam eles genéticos ou ambientais. Os futuros avanços e achados da genética poderão ser utilizados no diagnóstico precoce da doença, no seu tratamento ou mesmo na elaboração de estratégias de prevenção. Deve-se ressaltar que há um consenso na comunidade científica: a determinação das isoformas de Apo E ainda é insuficiente como método diagnóstico.

2.5 Alterações vasculares

Estudos epidemiológicos têm mostrado que as condições associadas com mudanças patológicas vasculares como a aterosclerose, diabetes ou pressão arterial elevada constituem fatores de risco para a DA de início tardio (ZULIANI et al., 2008). Em particular, as alterações microvasculares dentro do cérebro têm sido associadas com biomarcadores de DA e pode preceder a neurodegeneração. Esta análise pode ser feita no sangue estabelecendo biomarcadores da alteração microvascular no Alzheimer. Estes biomarcadores incluem a concentração plasmática da molécula de adesão celular vascular -1 (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) que estão aumentadas na DA (BRETELER, 2000; ZULIANI et al., 2008; EWERS et al., 2009).

Os neutrófilos assumem um papel importante e complexo, envolvendo a ligação às células endoteliais, ativação e liberação de mediadores inflamatórios. Esse processo é iniciado e mantido por meio de moléculas de adesão específicas, como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) (EWERS et al., 2009).

A ICAM-1 é expressa na superfície de vários tipos celulares, incluindo leucócitos e células endoteliais. No endotélio vascular, a ICAM-1 está presente em níveis baixos sob condições normais e a sua expressão é dramaticamente estimulada após ativação das células endoteliais por TNF- α , IL-1, interferon γ e endotoxina. No endotélio, ICAM-1 tem um importante papel na migração dos leucócitos aos sítios de inflamação, permitindo a adesão firme e a diapedese dos leucócitos via interação com seus ligantes (EWERS et al., 2009).

Células endoteliais não estimuladas não expressam VCAM-1 de superfície celular. Durante exposição aos agentes pró-inflamatórios, no entanto, essa molécula de adesão torna-se proeminentemente expressa pelas células endoteliais. Os agonistas que induzem a expressão do VCAM-1 na superfície endotelial são IL 1 β , IL 4, TNF- α e endotoxina (EWERS et al., 2009).

Zuliani e colaboradores, em 2008, estudaram um total de 210 pacientes divididos em 4 grupos (“provável” DA [n=60], demência vascular [n=80], doença vascular cerebral [n=40] e controle [n=30]). Estes autores encontraram níveis plasmáticos de VCAM-1 aumentado em todos os pacientes com DA e com demência vascular, em comparação com os pacientes idosos normais do grupo controle.

Níveis séricos de ICAM-1 foram avaliados em 25 pacientes com DA, 54 pacientes com doenças neurológicas não-inflamatórias, e 15 controles. Pacientes com DA apresentaram maior nível sérico de ICAM-1 em comparação com os outros pacientes. A presença de altos valores de ICAM-1 pode estar relacionada a processos imunológicos envolvidos na patogenia da DA (RENTZOS et al., 2004).

Segundo Breteler (2000), o que está claro é que a DA é uma doença multifatorial. A idade mais avançada e a patologia vascular em especial, causam ou contribuem para a síndrome demencial em pelo menos 50% de todos os pacientes dementes. Portanto, a identificação de mecanismos específicos é muito importante para elucidar o possível papel da patologia vascular na demência.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar parâmetros sanguíneos, com enfoque para biomarcadores de alterações microvasculares, dislipidêmicas e plaquetárias, em pacientes com demência de Alzheimer (DA) ou com comprometimento cognitivo leve (CCL) e em idosos sem déficit cognitivo, visando contribuir para uma melhor caracterização da doença em nosso meio.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar os níveis plasmáticos da molécula de adesão intercelular-1 solúvel (sICAM-1) em indivíduos sem déficit cognitivo e em pacientes com CCL e DA;
- Determinar os níveis plasmáticos de homocisteína total utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em indivíduos sem déficit cognitivo e em pacientes com CCL e DA;
- Investigar a ocorrência de ativação plaquetária por meio da determinação de micropartículas de origem plaquetária em indivíduos sem déficit cognitivo e em pacientes com CCL e DA;
- Avaliar o perfil lipídico convencional (colesterol total, HDLc, LDLc, triglicérides) e não convencional [apolipoproteínas A-I, B, e Lp(a)] em indivíduos sem déficit cognitivo e em pacientes com CCL e DA;
- Realizar a genotipagem da Apo E e correlacionar com as características dos grupos estudados;
- Investigar se há associação entre alterações das variáveis estudadas e DA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística

4.1.1 População em estudo

A população recrutada para este estudo foi composta por um conjunto de 177 idosos distribuídos em três grupos, com faixa etária compreendida entre 60 a 90 anos e de ambos os sexos, conforme mostrado abaixo:

- **Grupo controle (n=59):** indivíduos que não apresentaram qualquer déficit cognitivo.
- **Grupo CCL (n=59):** pacientes com comprometimento cognitivo leve.
- **Grupo DA (n=59):** pacientes com “provável” diagnóstico de doença de Alzheimer leve e moderado.

Os pacientes com CCL e DA foram selecionados no Ambulatório de Idosos do Instituto Jenny de Andrade Faria do Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG), em Belo Horizonte, sob a supervisão do Dr. Edgar Nunes de Moraes, coordenador do Centro de Referência do Idoso do HC-UFMG. O diagnóstico foi realizado pela equipe de geriatras e neuropsicólogos do referido Instituto.

Os indivíduos sem déficit cognitivo (controles) foram selecionados dentre os idosos participantes do “Grupo Reencontro” da unidade Tupinambás do Serviço Social do Comércio no Estado de Minas Gerais (SESC), em Belo Horizonte, cujo diagnóstico foi realizado pela mesma equipe de neuropsicólogos do ambulatório do Instituto Jenny Faria de Andrade, do Hospital das Clínicas/UFMG.

O diagnóstico dos três grupos supracitados foi definido por meio da aplicação do “Protocolo de avaliação multidimensional do idoso”, elaborado pelo Centro de Referência do Idoso Prof. Caio Benjamin Dias do Hospital das Clínicas da UFMG (MORAES, 2008). Este protocolo inclui a identificação do paciente, queixa principal detalhada, revisão dos sistemas fisiológicos principais, avaliação da funcionalidade global (AVDs básicas, cognição, humor, nutrição), história pessoal atual e pregressa, avaliação sócio-familiar e avaliação do cuidador.

A avaliação do estado mental foi realizada usando-se Mini Exame do Estado Mental (MEEM) (FOLSTEIN, 1975; BERTOLUCCI et al., 1994); Teste do relógio (AGRELL & DEHLIN, 1998); Teste de Fluência Verbal (BRUCKI et al., 1997) e a bateria do CERAD – uma lista de 10 objetos apresentados como desenhos simples (MORRIS et al., 1989; BERTOLUCCI et al., 2001). A avaliação neuropsicológica detalhada foi feita especialmente nos estágios iniciais de demência em que os testes breves podem ser normais ou apresentar resultado limítrofe.

Os dados demográficos, história clínica e variáveis objetivas dos indivíduos que participaram do estudo foram obtidos retrospectivamente por meio da revisão dos prontuários destes pacientes ou coletados pelo próprio pesquisador no momento da coleta de sangue.

4.1.2 Seleção da amostra

4.1.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo indivíduos que preencheram os critérios no diagnóstico clínico realizado por uma equipe multidisciplinar, incluindo médicos (psiquiatras, neurologista e geriatra) e neuropsicólogos. Os pacientes foram divididos em três grupos de acordo com o diagnóstico: (1) idosos cognitivamente saudáveis (controles); (2) portadores de comprometimento cognitivo leve (CCL); e de (3) doença de Alzheimer (DA).

- **Grupo controle:** idosos com escores de MEEM acima de 27 (BERTOLUCCI et al., 2003) e Fluência Verbal acima de 13 para aqueles com escolaridade acima de 8 anos (BRUCKI et al., 1997), e acima de 9 para aqueles com escolaridade menor que 8 anos, e Teste do Relógio com resultados entre 4 e 5 (AGRELL & DEHLIN, 1998).
- **Grupo CCL:** os critérios diagnósticos para CCL foram aqueles definidos por Petersen et al. (2001): queixa subjetiva de memória, preferencialmente

confirmada por um informante; declínio objetivo da memória; funções cognitivas gerais normais; AVDs intactas e não demente.

- **Grupo DA:** os pacientes elegíveis foram aqueles com DA “provável” ou “possível” segundo o manual Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais da Associação Psiquiátrica Americana (DSM-IV-TR) (APA, 1994) e Critérios desenvolvidos pelo Instituto Nacional das Doenças Neurológicas dos Estados Unidos (NINCDS-ADRDA) (NITRINI et al., 2005; MCKHANN *et al*, 2011; FROTA et al., 2011). Os pontos de corte utilizados no MEEM foram 13 para analfabetos, 18 para escolaridade baixa/média e 26 para alta escolaridade.

4.1.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os indivíduos que apresentaram qualquer uma das seguintes características:

- a) Idade inferior a 60 anos ou superior a 90 anos.
- b) Analfabetos.
- c) Condição de saúde gravemente alterada que inviabilizasse a execução de testes neuropsicológicos e exames subsidiários.
- d) Outras demências que não a DA (demência por múltiplos infartos, demência frontotemporal, demência por corpúsculos de Lewy e demência vascular pura).
- e) Evidência clínica de forte componente vascular na etiologia dos déficits cognitivos foi excluído pela aplicação da Escala Isquêmica de Hachinski (HACHINSKI et al., 1975; HACHINSKI et al., 2012).

4.2 Considerações éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (ETIC 0118.0.203.000-10) (ANEXO 1), e pela Comissão de Avaliação econômico financeira, pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Aos indivíduos e/ou seus responsáveis, no caso dos pacientes com DA, selecionados para participar do projeto foi feito o esclarecimento dos objetivos da pesquisa e aqueles que concordaram em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, antes de se proceder à coleta do material biológico (ANEXO 2).

4.3 Amostra

A coleta das amostras de sangue venoso dos 177 idosos foi realizada no HC-UFMG, entre agosto de 2010 a fevereiro de 2012, no período de 7 às 9 horas da manhã, após jejum de 12 a 14 horas, utilizando tubos do sistema Vacuteiner®. De cada idoso foi coletada uma amostra de 14,5mL de sangue venoso, sendo 5mL em tubo sem anticoagulante (para as dosagens bioquímicas e imunológicas), 5mL em tubo com EDTA (para extração do DNA e avaliação da homocisteína) e 4,5mL em tubo com citrato de sódio 3,2% (para avaliação das micropartículas plaquetárias).

Após a coleta as amostras foram transportadas para o Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG em caixa de isopor. Num prazo máximo de duas horas pós-coleta as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos. O soro e o plasma foram transferidos e aliquoteados em tubos *ependorf* devidamente identificados e estocados a -80°C até o momento da realização dos testes.

Para o cálculo do tamanho amostral para este projeto foi utilizado como referência o estudo “Serum Levels of Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 and Soluble Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1 in Alzheimer’s Disease” (RENTZOS et al., 2004). Foi considerado para o cálculo do tamanho amostral, um desvio-padrão de 335 para sICAM-1, conforme avaliado no estudo. Para detectar uma diferença média de 0,80 entre os grupos foi considerado o valor de $\alpha=0,05$ (intervalo de

confiança de 95%) e $\beta=80\%$, sendo assim, foi estimada uma amostragem mínima de 59 indivíduos em cada grupo.

4.4 Métodos

4.4.1 Quantificação da molécula de adesão solúvel (sICAM-1)

A dosagem plasmática da molécula de adesão foi realizada através do método de *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Foram adquiridos conjuntos de reagentes produzidos para uso em pesquisa e comercializados pela R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA).

O método de Elisa consiste de uma reação imunoenzimática que envolve uma reação simultânea entre uma substância ou mediador presente na amostra (no caso, sICAM-1) ou solução padrão com anticorpos monoclonais específicos fixados à superfície da placa (anticorpos anti-ICAM-1), formando uma ligação entre as duas substâncias (conjugado). Em, seguida, anticorpos monoclonais marcados com peroxidase se ligam à outros determinantes antigênicos. O material que não se liga na reação é retirado por aspiração e por sucessivas lavagens após 90 minutos de incubação. Na próxima etapa, o substrato cromógeno (tetrametilbenzidina) é adicionado e reage com a enzima produzindo um produto corado (azul). A reação é interrompida com uma solução ácida e a intensidade de cor produzida é diretamente proporcional à concentração do antígeno na amostra.

A concentração presente em cada amostra foi obtida pela interpolação dos resultados em uma equação gerada a partir da curva padrão, realizada com diferentes concentrações conhecidas da molécula de adesão sICAM-1. As curvas *standard* revelaram sensibilidade e repetitividade das duplicatas (Figura 4).

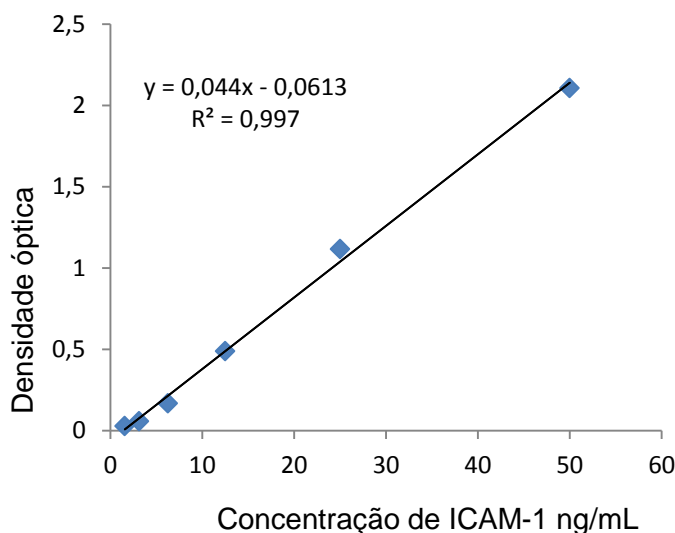


Figura 4 - Curva de Calibração para a determinação da molécula de adesão solúvel (sICAM-1) utilizando a técnica de ELISA

O valor de referência segundo o “kit” (R&D Systems):

- sICAM -1 solúvel: 211ng/mL (115 a 306 ng/mL; 2 desvios-padrão)

4.4.2 Determinação de homocisteína

Os níveis plasmáticos de Hcy foram avaliados por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector fluorimétrico, no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia/UFMG. O método utilizado foi descrito por PFEIFFER et al., 1999 com pequenas modificações e consiste inicialmente na redução dos grupos tióis, seguido da precipitação de proteínas e, posteriormente, na derivatização da homocisteína pelo 7-fluorobenzo-2,1,3- oxadiazole-4-ácido sulfônico (SBD-F).

Para a primeira etapa de redução dos grupos tióis, foram utilizados 50,0µL das amostras de plasma dos indivíduos do estudo, das soluções padrão de Hcy e amostras de referência (Bio-Rad ®) certificadas para o controle de qualidade interno do processo. Em seguida, foram adicionados 40,0µL da solução de padrão interno de cistamina (10,0µmol/L) e depois acrescentado 25,0µL de Tampão fosfato (PBS pH = 7,4). Por último, foram adicionados 40,0µL Tris-carboxyethyl-phosphine (TCEP 25,0 g/L) aos eppendorfs e deixados em repouso por 30 minutos, a temperatura ambiente (25°C).

Na segunda etapa, de precipitação das proteínas, após 30 minutos de repouso foram adicionados 90,0 μL da solução de Ácido Tricloro Acético (TCA-EDTA) e agitado por 30 segundos. Depois, os eppendorfs foram centrifugados por 10 minutos (13000g), sobre refrigeração de 24°C.

Na última etapa, de derivatização, foram utilizados 50,0 μL do sobrenadante do produto obtido após a centrifugação. O sobrenadante foi acrescentado em tubos escuros contendo 40,0 μL de NaOH (0,39 mol/L), 125,0 μL de tampão borato - EDTA (pH=9,5) e 50,0 μL SBD-F 1,0 g/L. Em seguida os tubos foram incubados em banho maria à 60°C por 60 minutos.

Após derivatização, 50 μL do produto foi injetado no cromatógrafo. Foi utilizado o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Hewlett Packard 1100 HP/Agilent, constituído de detector fluorimétrico com amostrador automático. Para obtenção dos perfis cromatográficos, utilizou-se coluna Techsphere 5 ODS (4,6x150mm, de 5 μm), detecção no comprimento de onda de excitação de 385nm e emissão de 515nm, fluxo de 1,2mL/min e ganho de 15,0.

Utilizou como fase móvel solução de tampão acetato pH 5,5. Em todas as etapas, foram empregados solvente grau CLAE e água destilada, filtrada em sistema Milli-Q. O tempo médio de retenção apresentado pela Hcy foi de 3,5 minutos e do padrão interno (cistamina) de aproximadamente 8 minutos.

A cada dia de análise foi utilizada uma curva de calibração construída com soluções padrão de homocisteína aquosas de concentrações conhecidas (5, 20, 35, 50, 65 e 80 $\mu\text{mol/L}$) na abscissa e na ordenada a área relativa (área da homocisteína/área do padrão interno). As amostras de plasma dos pacientes e controles envolvidos no estudo foram quantificadas pela equação de regressão linear obtida da curva de calibração, conforme exemplo apresentado na Figura 5.

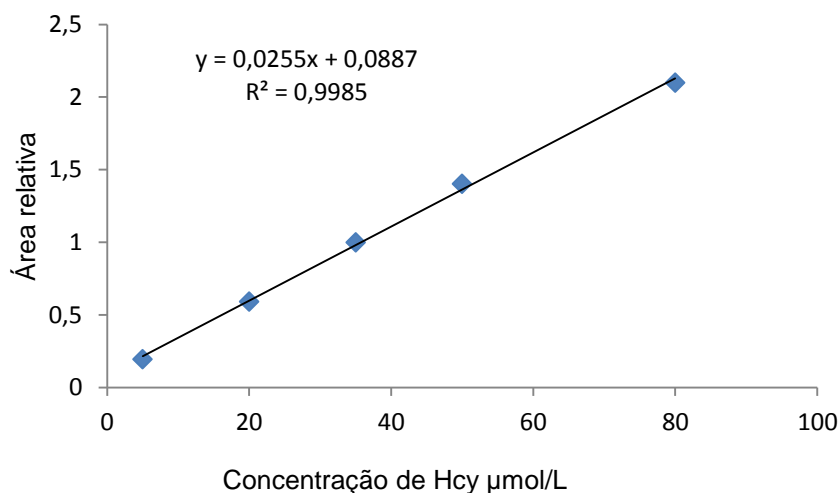


Figura 5 - Curva de Calibração para a determinação da Homocisteína total plasmática utilizando a técnica de CLAE com detecção fluorimétrica

Os valores de referência esperados segundo REFSUM (1998) são: 5,0 a 15,0 μmol/L.

4.4.3 Determinação das micropartículas plaquetárias (MPPs)

As amostras de plasma foram centrifugadas a 13.000g por 3 minutos a temperatura ambiente para obtenção das MPPs (micropartículas de plaquetas) no sobrenadante. Cuidadosamente, 100 μL do sobrenadante foi aspirado e colocado em outro tubo contendo 300 μL de solução de PBS contendo heparina e citrato (diluição 1:3). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 15.000g por 90 minutos a 15°C para formação do *pellet* de MPPs.

O *pellet* de MPPs foi ressuspenso em 100 μL de anexina V (BD Biosciences, Califórnia, EUA). Em seguida, foi adicionado 5 μL do anticorpo monoclonal CD41a marcado com PE e 2,5 μL de FITC Annexin V. A mistura foi incubada por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, foi adicionado 300 μL de anexina V e posteriormente as amostras foram lidas no citômetro de fluxo (FACScalibur- BD, EUA).

Para confirmar se os números absolutos de MPPs do plasma foram diferentes entre os pacientes com CCL, DA e idosos sem déficit cognitivo, bem como para determinar os números de MPPs por microlitro (MP/ μ L), o citômetro foi ajustado para operar com uma taxa de fluxo de alta definição durante 60 segundos para cada amostra. O número de MP/ μ L de plaquetas foi calculado como descrito por CAMPOS e colaboradores (2010): $MP/\mu L = (N \times 400) / (60 \times 100)$, em que N é o número de eventos, 400 é o volume total de amostra no tubo antes da análise, 60 é o volume da amostra analisada, e 100 é o volume original de suspensão das MP.

4.4.4 Avaliação do perfil lipídico e das apolipoproteínas A-1, B e Lp(a)

Para a determinação do perfil lipídico foram realizadas as dosagens de triglicérides, colesterol total e frações, em amostras de soro, utilizando métodos enzimáticos convencionais no Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG. As determinações das apolipoproteínas A-1, B e Lp(a) foram realizadas no Laboratório Humberto Abrão utilizando o aparelho Cobas Mira Plus® em sistema automatizado. O controle interno de qualidade (LABTEST®) foi realizado em todas as dosagens.

A interpretação clínica dos resultados foi estabelecida de acordo com os valores de referência preconizados pelas IV Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia (RESUMO, 2007).

4.4.4.1 Determinação do colesterol total (CT)

A determinação do colesterol total foi realizada utilizando o conjunto de reagentes COLESTEROL COD (BIOCLIN®), pelo método enzimático colorimétrico de Trinder, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. A leitura das absorvâncias do padrão, das amostras e dos soros controles foi realizada em Espectrofotômetro BIOTRON BTR 811.

Foram utilizados os seguintes valores de referência:

- a) Desejável < 200mg/dL
- b) Aceitável: 200 – 239mg/dL
- c) Elevado > 240mg/dL

4.4.4.2 Determinação de HDL colesterol (HDLc)

Para a determinação da fração HDLc foi utilizado o método de precipitação seletiva, utilizando o conjunto de reagentes COLESTEROL HDL ENZIMÁTICO (BIOCLIN®), seguindo as instruções do fabricante. As lipoproteínas VLDLc, a LDLc e os quilomícrons foram precipitados com a mistura de ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio. Após centrifugação, o colesterol ligado às HDL foi determinado no sobrenadante por método colorimétrico enzimático de Trinder. A leitura das absorvâncias foi realizada em Espectrofotômetro BIOTRON BTR 811.

Foram utilizados os seguintes valores de referência:

- Mulheres (mg/dL): a) Desejável>65 b) Médio Risco: 45-65 c) Alto Risco<45
Homens (mg/dL): a) Desejável>55 b) Médio Risco: 35-55 c) Alto Risco<35

4.4.4.3 Determinação de Triglicérides (TG)

Para a determinação do triglicérides foi utilizado o método enzimático colorimétrico de Trinder, utilizando o conjunto de reagentes TRIGLICÉRIDES ENZIMÁTICO (BIOCLIN®), seguindo as instruções do fabricante. A leitura das absorvâncias foi realizada em Espectrofotômetro BIOTRON BTR 811.

Foram utilizados os seguintes valores de referência:

- a) Ótimo <150mg/dL
- b) Limítrofe 150 - 200mg/dL
- c) Alto 200 - 499mg/dL
- d) Muito alto > 500mg/dL

4.4.4.4 Estimativa de LDL Colesterol (LDLc)

A concentração do LDL colesterol foi calculada através da fórmula de Friedewald (FRIEDEWALD, 1972). Neste método, o VLDL é estimado com o valor de TG plasmático dividido por cinco. Os valores de LDLc não podem ser estimados através desta equação com níveis de triglicérides > 400mg/dL, na presença de quilomícrons e hiperproteinemia tipo 3.

Equação de Friedewald: $LDLc = CT - (HDLc + VLDLc)$

$VLDLc = TG/5$ (para $TG < 400$ mg/dL)

Foram utilizados os seguintes valores de referência:

- a) Ótimo < 100mg/dL
- b) Desejável 100 - 129mg/dL
- c) Limítrofe 130 – 159 mg/dL
- d) Alto 160 – 189mg/dL
- e) Muito Alto > 190mg/dL

4.4.4.5 Apolipoproteína A-I (Apo A-I)

A determinação da Apo A-I foi realizada por meio do uso de conjunto diagnóstico APOLIPOPROTEÍNA A-I (APO A-I) (BIOSYS APO A1 FS®), pelo método turbidimétrico, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus® em sistema completamente automatizado.

Foram utilizados os seguintes valores de referência:

Homens: 110-170 mg/dL

Mulheres: 120-190 mg/dL

4.4.4.6 Apolipoproteína B (Apo B)

A determinação da Apo B foi realizada por meio do uso de conjunto diagnóstico APOLIPOPROTEÍNA B (APO B) (BIOSYS APO B FS®), pelo método turbidimétrico, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus® em sistema completamente automatizado.

Foram utilizados os seguintes valores de referência:

Homens: 80-155mg/dL

Mulheres: 75-150mg/dL

4.4.4.7 Lipoproteína a [Lp (a)]

A determinação da Lp(a) foi realizada por meio do uso de conjunto diagnóstico LIPOPROTEÍNA (a) (BIOSYS Lp(a) FS ®), pelo método turbidimétrico, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus® em sistema completamente automatizado.

Valores normais Lp (a) devem ser inferiores a 30mg/dL.

4.4.5 Identificação dos alelos do gene da apolipoproteína E (Apo E)

As amostras de sangue (5mL) foram coletadas em frasco com EDTA, e o DNA genômico foi extraído das células sanguíneas (leucócitos). Uma alíquota de 300µL da amostra de sangue foi transferida para um tubo *ependorf* de 1,5mL estéril e incubada com uma solução de lise de hemácias durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Após a lise das hemácias, a amostra foi centrifugada a 14.000g, durante 2 minutos em microcentrifuga FANEN. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de leucócitos ressuspendido em solução de lise celular. Posteriormente, foi adicionada a solução de precipitação de proteínas, a amostra foi agitada em vortex durante 30 segundos e, em seguida, centrifugada a 14.000g durante 3 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um tubo novo contendo isopropanol. A amostra foi misturada por inversão cerca de 30 vezes para que

ocorresse a precipitação do DNA e, posteriormente, centrifugada a 14.000g durante 3 minutos. Após o descarte do isopropanol, foi adicionado etanol a 70% para lavar o sedimento de DNA. Em seguida, foi realizada outra centrifugação, descartado o etanol e adicionados 50 μ L de solução de hidratação. Após este procedimento, as amostras foram armazenadas no freezer a -20° C para posterior pesquisa das mutações.

A análise do gene da *Apo E* foi feita por meio do procedimento de *Polymerase Chain Reaction* (PCR-RFLP), utilizando-se os *primers* e a metodologia descrita por Tsukamoto *et al.* (1992).

Após a extração de DNA total, uma região de 270 pares de bases do gene codificador de *ApoE* foi amplificado, utilizando-se o primer senso 5' GCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGC 3' e o primer antisenso 5' GGCCTCGCGGATGGCGCTGAG 3'. O produto de PCR foi então submetido à digestão no período da noite, utilizando-se a endonuclease de restrição *HhaI*. Esta enzima reconhece 8 sítios de clivagem no alelo $\epsilon 2$, 9 sítios no alelo $\epsilon 3$ e 10 sítios no alelo $\epsilon 4$, de acordo com o esquema abaixo (Figura 6).

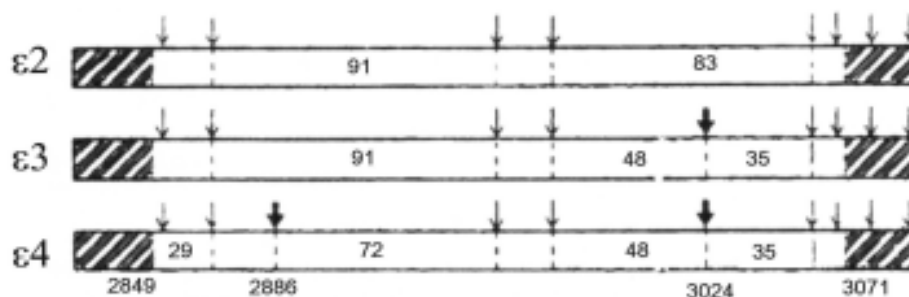


Figura 6 - Padrões de RFLP para apo E: as regiões hachuradas indicam os *primers*, as setas indicam sítios de clivagem pela *HhaI* e as setas em negrito marcam especificamente os sítios polimórficos de clivagem

O produto de PCR foi incubado com a enzima de restrição a 37° C por, no mínimo, 8 horas. Por fim, o produto da digestão foi aplicado em gel de poliacrilamida a 12% e submetido à eletroforese, sendo posteriormente revelado através de coloração com solução de nitrato de prata.

O resultado obtido desse gel permitiu determinar o genótipo do paciente, a partir da leitura dos fragmentos obtidos (Tabela 1). Cada indivíduo possui um alelo proveniente do pai e outro da mãe, que podem ser identificados de acordo com o perfil das bandas.

Tabela 1 - Genótipos da Apo E e tamanho dos fragmentos gerados através do processo de digestão enzimática

Genótipos – Apo E		Fragmentos gerados pela digestão
Homozigotos	$\epsilon 2\epsilon 2$	91 e 83 bp
	$\epsilon 3\epsilon 3$	91 e 48 bp
	$\epsilon 4\epsilon 4$	72, 48, 35 e 29 bp
Heterozigotos	$\epsilon 2\epsilon 3$	91, 83, 48 e 29 bp
	$\epsilon 2\epsilon 4$	91, 83 e 72 bp
	$\epsilon 3\epsilon 4$	91, 72, 48 e 35 bp

Abreviatura: (bp) pares de bases

A Figura 7 ilustra todos os possíveis perfis encontrados empregando-se a técnica PCR-RFLP, para o polimorfismo da Apo E.

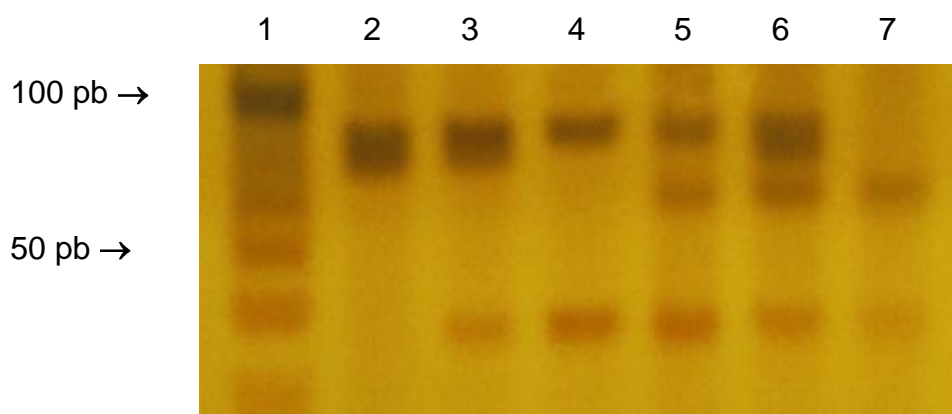


Figura 7 - Gel de poliacrilamida a 12% corado pela prata, obtido após PCR, seguida de digestão com a endonuclease de restrição HhaI e eletroforese, contendo os perfis correspondentes aos 6 genótipos da ApoE

Abreviatura: (pb) pares de base. Na primeira canaleta foi aplicado o padrão de 100 pb que permite determinar o tamanho do fragmento - cuja banda mais fortemente corada representa o fragmento de 100pb - e as demais constituem os genótipos $\epsilon 2\epsilon 2$ (2), $\epsilon 2\epsilon 3$ (3), $\epsilon 3\epsilon 3$ (4), $\epsilon 3\epsilon 4$ (5), $\epsilon 2\epsilon 4$ (6) e $\epsilon 4\epsilon 4$ (7), respectivamente.

4.5 Análise estatística

Todas as informações foram armazenadas em um banco de dados elaborado para este estudo com o auxílio do programa Excel e, posteriormente, convertido para análises no programa “Statistical Package of the Social Sciences” (SPSS) versão 13.0. Todos os dados foram analisados quanto à distribuição normal pelo teste Shapiro Wilks. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão (DP) quando apresentaram distribuição normal e, como mediana e intervalo interquartil, quando a sua distribuição não foi normal. Foram utilizados inicialmente os seguintes testes para comparação entre grupos: ANOVA, Kruskal Wallis, Mann Whitney, Qui-quadrado de Pearson assintótico (20% do valor esperado entre 1 e 5 e 80% do valor esperado maior que 5) e Qui-quadrado de Pearson exato (menos de 80% do valor esperado maior que 5). A análise dos resíduos ajustados foi utilizada para localizar a associação quando a tabela foi maior dimensão que 2x2, após o teste Qui-quadrado de Pearson assintótico ou exato foram significativos ao nível de 0,05. Para o valor mais frequente o resíduo ajustado foi maior que +1,96 e para o valor menos frequente o resíduo ajustado foi menor que -1,96. Para as análises de comparações múltiplas 2 a 2 foram utilizados LSD (distribuição normal) e teste Mann Whitney corrigindo-se o nível de significância pelo método de Bonferroni. Para investigar quais variáveis estavam significativamente associadas ao desenvolvimento de DA, empregou-se um modelo de regressão logística múltipla em que a medida de associação foi a *Odds ratio* (OR). Todas as variáveis do estudo foram ajustadas por meio de modelos bivariados e as variáveis que apresentaram valores de $p \leq 0,20$ foram candidatas ao modelo multivariado. A qualidade do modelo foi avaliada pelo teste de Hosmer & Lemeshow.

5. RESULTADOS

5.1 Características dos participantes do estudo

Os indivíduos selecionados para o estudo foram divididos em três grupos, de acordo com o diagnóstico. Foram estudados 59 pacientes com diagnóstico de DA provável. Todos os pacientes foram considerados CDR leve ou moderado (CDR:1 e 2) pelos critérios do Clinical Dementia Rating (HUGHES et al., 1982). O CDR investiga a gravidade da demência ao contemplar avaliação de atividades básicas, instrumentais e cognitivas. Estes pacientes foram comparados aos grupos controle e CCL, cada um com 59 idosos. Os indivíduos do grupo controle apresentavam ausência de doenças neurológicas e psiquiátricas, sem queixa de declínio de memória e independentes para realizar as atividades da vida diária (AVDs). A partir das informações coletadas na ficha clínica preenchida pelos médicos, foram levantadas as características físicas e clínicas dos participantes desse estudo. As características dos três grupos são mostradas na Tabela 2 de acordo com a idade, o gênero, escolaridade e o valor do MEEM.

Tabela 2 - Descrição da amostra e distribuição dos indivíduos envolvidos no estudo

Variável	C	CCL	DA	P
Idade (anos)	(n=59) 73,44±5,61	(n=59) 75,03±7,34	(n=59) 75,92±6,04	0,105 ¹
Gênero	(n=59)	(n=59)	(n=59)	0,012 ³
Feminino	48 (39,3 %)	41 (33,6 %)	33 (27 %)	
Masculino	11 (20 %)	18 (32,7 %)	26 (47,3 %)	
Escolaridade(anos)	(n=25) 11 (9)	(n=38) 4 (4)	(n=22) 2 (4)	<0,0001 ^{2*}
MEEM	(n=59) 29 (2)	(n=41) 25 (7)	(n=25) 19 (7)	<0,0001 ^{2**}

Abreviaturas: (n) número de indivíduos, (C) controle, (CCL) comprometimento cognitivo leve, (DA) doença de Alzheimer, (MEEM) minixame do estado mental. 1.ANOVA (valores expressos como média e desvio padrão). 2.Método Kruskal Wallis (valores expressos como mediana e intervalo interquartil: Q3 – Q1). 3 - Teste Qui-quadrado de Pearson Assintótico. Os valores do gênero estão expressos como frequência absoluta e relativa.

* correção Bonferroni no teste Mann Whitney, valores significativos p<0,017: Controle x DA, p <0,0001*; Controle x CCL,p<0,0001*; CCL x DA, p = 0,042.

** correção Bonferroni no teste Mann Whitney, valores significativos p<0,017: Controle x DA, p <0,0001*; Controle x CCL,p<0,0001*; CCL x DA, p<0,0001*.

A idade média dos indivíduos envolvidos no estudo não foi diferente entre os grupos. Quanto ao sexo, todos os grupos apresentaram um maior número de mulheres. A maioria dos estudos não relata qualquer diferença nas taxas de declínio cognitivo entre homens e mulheres. Em contrapartida, as mulheres apresentam maior longevidade do que os homens. Assim, julgou-se que a diferença no sexo não tenha interferido nos resultados e poderia representar a distribuição encontrada na população idosa. A escolaridade foi avaliada quanto aos anos de estudo e os grupos DA e CCL apresentaram medianas próximas e diferentes do grupo controle que apresentou aproximadamente 11 anos de escolaridade. Para o MEEM foi observado um melhor desempenho do grupo controle quando comparado com os grupos de CCL e DA. Cabe ressaltar que nem todas as análises foram realizadas com o número total de participantes para cada grupo, ou seja, 59 indivíduos, uma vez que para alguns parâmetros não foi possível conseguir a informação como escolaridade e MEEM para todos os participantes. Contudo, a avaliação do MEEM foi realizada em todos os indivíduos pela equipe de geriatras e neuropsicólogos do HC-UFMG para diagnóstico e separação dos indivíduos nos três grupos.

Além dos dados apresentados anteriormente, foram registradas informações dos idosos sobre outras co-morbidades como Hipertensão Arterial, Diabetes Mellitus, Dislipidemia e Hipotireoidismo (Tabela 3).

Tabela 3 - Relação de co-morbidades dos indivíduos envolvidos no estudo

Co-morbidades	C (%)	CCL (%)	DA (%)	p
Hipertensão Arterial	40 (29,2)	48 (35)	49 (35,8)	0,095
Diabetes Mellitus	10 (29,4)	12 (35,3)	12 (35,3)	0,864
Dislipidemia	26 (42,6)	19 (31,1)	16 (26,2)	0,139
Hipotireoidismo	6 (33,3)	6 (33,3)	6 (33,3)	1,0

Abreviaturas: (C) controle, (CCL) comprometimento cognitivo leve, (DA) doença de Alzheimer (DA). Teste Qui-quadrado de Pearson Exato. Os valores estão expressos como frequência absoluta e relativa.

Foi feito o levantamento dos medicamentos tendo em vista o objetivo de conhecer o perfil de uso dos mesmos entre os indivíduos do estudo, para caso fosse necessário, realizar uma análise posterior tendo o medicamento como uma covariável dos resultados laboratoriais (Tabela 4).

Tabela 4 - Perfil de uso de medicamentos pelos participantes do estudo

Medicamento	C (%)	CCL (%)	DA (%)	P
Antihipertensivo	40 (29,2)	48 (35)	49 (35,8)	0,095 ¹
Hipoglicemiante	10 (28,6)	13 (37,1)	12 (34,3)	0,841 ²
Insulina	3 (50)	1 (16,7)	2 (33,3)	0,872 ²
Hipolipemiante	19 (39,6)	14 (29,2)	15 (31,3)	0,549 ¹
Antidepressivo	8 (14,3)	13 (23,2)	35 (62,5) [▲]	<0,0001 ^{1*}
AAS	9 (29)	8 (25,8)	14 (45,2)	0,298 ¹

Abreviaturas: (C) controle, (CCL) comprometimento cognitivo leve, (DA) doença de Alzheimer (DA), (AAS) ácido acetil salicílico. 1- Teste Qui-quadrado de Pearson Assintótico. 2 - Teste Qui-quadrado de Pearson exato. Os valores estão expressos como frequência absoluta e relativa. * análise de resíduos ajustados (> + 1,96[▲]; < - 1,96).

5.2 Molécula de adesão intercelular solúvel (sICAM-1)

Uma alíquota de 20µL de soro foi destinada à determinação da molécula de adesão sICAM-1. Em função do número restrito de “kits” disponíveis só foi possível realizar as dosagens de 58 indivíduos do grupo controle, 53 com CCL e 48 com DA (Tabela 5).

Tabela 5 - Níveis plasmáticos da molécula de adesão sICAM-1, pelo método ELISA

Grupo	sICAM -1 (ng/mL)	P
Controle (n=58)	272,95 (102,69)	0,001*
CCL(n=53)	303,24 (146,49)	
DA (n=48)	356,8 (174,23)	

Abreviaturas: (n) número de indivíduos, (C) controle, (CCL) comprometimento cognitivo leve, (DA) doença de Alzheimer (DA). Método Kruskal Wallis (valores expressos como mediana e intervalo interquartil: Q3 – Q1). *correção Bonferroni no teste Mann Whitney, valores significativos p<0,017: Controle x DA, p <0,0001*; Controle x CCL,p=0,071; CCL x DA, p=0,052.

Dentre as amostras selecionadas, os indivíduos do grupo DA apresentaram valores acima daquele considerado normal para pacientes adultos hígidos (115 a 306 ng/mL).

5.3 Níveis plasmáticos de homocisteína (Hcy)

A concentração plasmática da Hcy foi determinada por CLAE com detecção fluorimétrica. O perfil cromatográfico obtido por CLAE para o plasma dos indivíduos do estudo indicou quatro picos mais intensos apresentados na Figura 8.

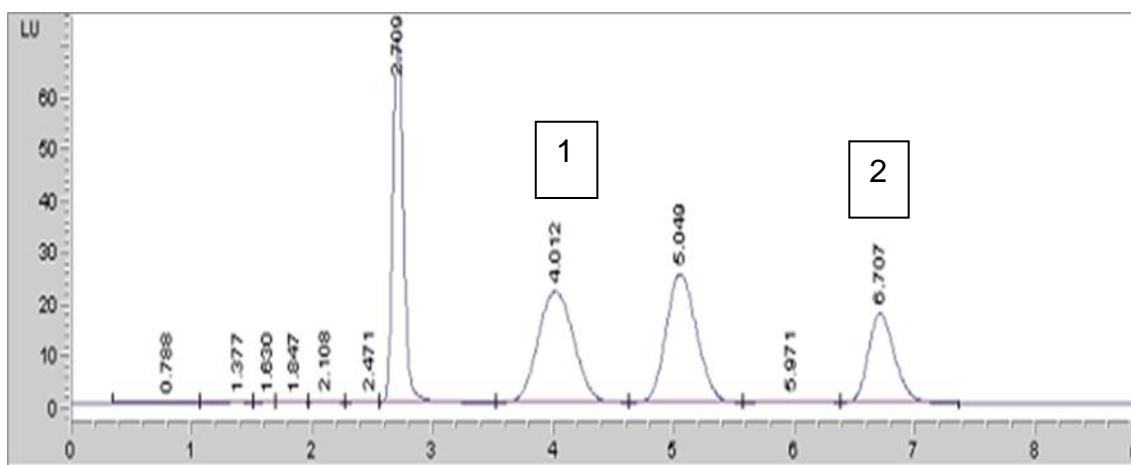


Figura 8 - Perfil cromatográfico, obtido por CLAE, para análise de Homocisteína no plasma. Pico 1: Hcy, Pico 2: Padrão interno/Cistamina, com os respectivos tempo de retenção e área

Os limites aceitáveis dos níveis plasmáticos de Hcy variam de 5 a 15 $\mu\text{mol/L}$. A hiperhomocisteinemia é comum e os níveis elevados de Hcy podem ser leve (16-30 $\mu\text{mol/L}$), moderado (31-100 $\mu\text{mol/L}$) ou grave (>100 $\mu\text{mol/L}$) (REFSUM et al., 1998). Não houve diferença significativa no valor da Hcy entre os três grupos estudados, conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Níveis plasmáticos de homocisteína nos três grupos estudados, utilizando a técnica de CLAE com detecção fluorimétrica

Grupo	Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	P
Controle	14,95 (4,81)	0,704
CCL	14,78 (10,30)	
DA	13,75 (8,24)	

Abreviaturas: (C) controle, (CCL) comprometimento cognitivo leve, (DA) doença de Alzheimer (DA). Teste Kruskal Wallis (valores expressos como mediana e intervalo interquartil: Q3-Q1).

5.5 Micropartículas plaquetárias (MPPs)

Os resultados obtidos mostraram um percentual de MPPs (%) igual ao valor absoluto (MPP/ μ L) obtido através do cálculo $MP/\mu l = (N \times 400) / (60 \times 100)$, conforme descrito no item 4.4.3. A Figura 9 mostra uma correspondência entre os valores de MPPs obtidos em % e aqueles obtidos / μ L.

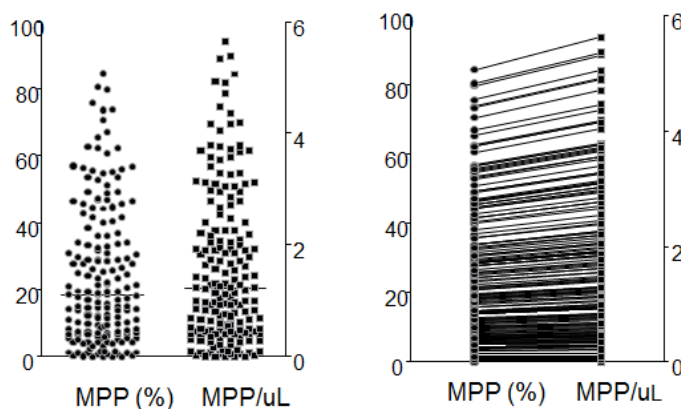


Figura 9 – Apresentação dos valores de micropartículas plaquetárias em porcentagem [MPP (%)] e valor absoluto (MPP/ μ L)

Observa-se pela Figura 10 que não houve diferença significativa nos valores de MPPs (%) entre os grupos controle e DA. Contudo, foi possível observar diferença para os valores encontrados para o grupo CCL em comparação com os outros dois grupos.

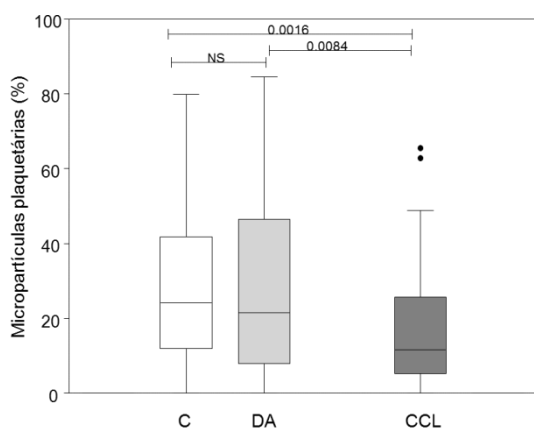


Figura 10 – Resultados das análises de micropartículas plaquetárias nos três grupos estudados

Abreviaturas: (C) controle, (CCL) comprometimento cognitivo leve, (DA) doença de Alzheimer.

5.6 Perfil lipídico e das apolipoproteínas A-1, B e Lp(a)

Os parâmetros analisados para a determinação do perfil lipídico foram CT, HDLc, LDLc, TG, Apo A-I, Apo B e Lp(a). Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 7. Foi possível verificar diferenças significativas entre os grupos para os parâmetros de CT, HDLc, TG e Apo B.

Tabela 7 - Perfis lipídicos convencional e não convencional dos indivíduos do estudo

Variáveis (mg/dL)	Controle	CCL	DA	P
n	59	59	59	
CT	175,29 ± 35,68	164,28±35,83	155,92 ±28,39	0,008 ^{1*}
HDLc	48,61 (16,61)	42,46 (18,80)	44,56 (18,5)	0,003 ^{2**}
LDLc	93,15 ± 38,3	98,13±45,5	94,44 ±27,9	0,825 ¹
TG	126,9 (67,5)	119,4 (87,4)	68,82 (37,2)	<0,0001 ^{2***}
Apo A-1	152 (54)	159 (44)	151 (51)	0,889 ²
Apo B	101 (26)	113 (42)	101 (27)	0,007 ^{2****}
Lp (a)	22,8 (60,6)	22,1 (44,7)	31,4 (57,9)	0,526 ²

Abreviaturas: (n) número de indivíduos, (C) controle, (CCL) comprometimento cognitivo leve, (DA) doença de Alzheimer (DA), (CT) colesterol total, (HDLc) Lipoproteína de alta densidade; (LDLc) Lipoproteína de baixa densidade, (TG) triglicérides; (Apo A-1) apolipoproteína A-1; (Apo B) apolipoproteína B; [Lp(a)] lipoproteína(a). 1- ANOVA (valores expressos como média e desvio padrão). 2- Método Kruskal Wallis (valores expressos como mediana e intervalo interquartil: Q3-Q1).

* teste LSD, valores significativos p<0,017: Controle x DA, p=0,002*; Controle x CCL, p=0,077; CCL x DA, p=0,177.

** correção Bonferroni no teste Mann Whitney, valores significativos p<0,017: Controle x DA, p=0,072; Controle x CCL, p=0,001*; CCL x DA, p=0,108.

*** correção Bonferroni no teste Mann Whitney, valores significativos p<0,017: Controle x DA, p <0,001*; Controle x CCL, p=0,645; CCL x DA, p=0,001*.

**** correção Bonferroni no teste Mann Whitney, valores significativos p<0,017: Controle x DA, p= 0,743; Controle x CCL, p=0,004*; CCL x DA, p=0,011*.

A Tabela 8 mostra os valores do perfil lipídico para os indivíduos em uso de medicamento hipolipemiante. Com base nestes dados, foi possível verificar diferenças significativas entre todos os grupos para o parâmetro HDLc, sendo os seus valores reduzidos em relação ao grupo controle. Para triglicérides, os indivíduos com DA apresentaram níveis também significativamente menores em relação aos indivíduos do grupo controle e aqueles com CCL.

Tabela 8 - Perfil lipídico dos indivíduos em uso de medicamentos hipolipemiantes

Variável (mg/dL)	Controle	CCL	DA	P
n	17	14	15	
CT	165,36 ± 33,88	158,36 ± 36,14	152,99 ± 26,91	0,545 ¹
HDLc	53,16 ± 12,81	37,59 ± 9,86	46,28 ± 8,18	0,001 ^{1*}
LDLc	86,64 ± 30,29	88,99 ± 31,87	93,67 ± 28,22	0,795 ¹
TG	110,20 (72,3)	137,75 (130,7)	63,54 (9,8)	< 0,001 ^{2*}
Apo A-I	166,89 ± 35,38	154,86 ± 33,68	158,93 ± 35,79	0,604 ¹
Apo B	97,00 (30,00)	115,00 (52,0)	96,00 (24,0)	0,066 ²
Lp (a)	15,90 (26,10)	47,2 (57,0)	28,4 (94,00)	0,496 ²

Abreviaturas: (n) número de indivíduos, (C) controle, (CCL) comprometimento cognitivo leve, (DA) doença de Alzheimer (DA), (CT) colesterol total, (HDLc) Lipoproteína de alta densidade; (LDLc) Lipoproteína de baixa densidade, (TG) triglicérides; (Apo A-1) apolipoproteína A-1; (Apo B) apolipoproteína B; (Lp(a)) lipoproteína (a). 1- ANOVA (valores expressos como média e desvio padrão). 2- Método Kruskal Wallis (valores expressos como mediana e intervalo interquartil: Q3-Q1).

Teste LSD: Controle x DA, p= 0,069; Controle x CCL, p<0,0001; CCL x DA, p=0,034*.

** correção Bonferroni no teste Mann Whitney, valores significativos p<0,017: Controle x DA, p<0,0001*; Controle x CCL, p=0,466; CCL x DA, p=0,001*.

5.7 Polimorfismo da Apo E

Após a determinação genotípica da Apo E, os indivíduos do estudo foram distribuídos de acordo com o genótipo, nos seguintes subgrupos: $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 4/\epsilon 4$ e $\epsilon 2/\epsilon 2$. A Tabela 9 apresenta os resultados do perfil genético da Apo E das amostras dos participantes deste estudo analisadas de acordo com os grupos controle, CCL e DA.

Tabela 9 - Diferentes genótipos (em números absolutos) e frequência genotípica para a Apo E calculada para o estudo

Grupo	$\epsilon 3/\epsilon 3$ (%)	$\epsilon 3/\epsilon 4$ (%)	$\epsilon 2/\epsilon 4$ (%)	$\epsilon 2/\epsilon 3$ (%)	$\epsilon 2/\epsilon 2$ (%)	$\epsilon 4/\epsilon 4$ (%)	p
Controle	40(67,8) [▲]	12(20,3) [▼]	1(1,7) [▼]	4(6,8)	1(1,7)	1(1,7)	<0,0001*
CCL	19(32,2) [▼]	21(35,6)	11(18,6) [▲]	3(5,1)	4(6,8) [▲]	1(1,7)	
DA	22(37,3)	25(42,4)	2(3,4)	4(6,8)	0 (0)	6(10,2) [▲]	

Observação: Teste Qui-quadrado de Pearson Exato. Os valores estão expressos como frequência absoluta e relativa. * análise de resíduos ajustados (> + 1,96 [▲]; < - 1,96 [▼])

Foi possível observar um aumento significativo do alelo $\epsilon 4$ em homozigose nos indivíduos do grupo DA. O alelo $\epsilon 3$ foi o mais presente nos três grupos conforme descrito na literatura.

Posteriormente, foi realizada a comparação da frequência do alelo $\epsilon 4$ entre os indivíduos do grupo controle e de DA (Tabela 10). Não foi observada diferença entre os grupos CCL e DA com relação ao alelo $\epsilon 4$.

Tabela 10 - Números absolutos referentes aos alelos $\epsilon 4$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 2$ da apolipoproteína E (Apo E)

Variável	Controle (%)	CCL (%)	DA (%)	P
$\epsilon 4$	14 (17,5) ▼	33 (41,3)	33 (41,3)	<0,0001*
$\epsilon 2$	6 (20,0)	18 (60,0) ▲	6 (20,0)	0,003**
$\epsilon 3$	57 (37,7)	43 (28,5)	51 (33,8)	0,156

Teste Qui-quadrado de Pearson Exato. Os valores estão expressos como frequência absoluta e relativa.

* análise de resíduos ajustados (> + 1,96; < - 1,96 ▼). ** análise de resíduos ajustados (> + 1,96 ▲; < - 1,96).

5.8 Possíveis diferenças intragrupos em indivíduos carreadores do alelo $\epsilon 4$ da Apo E (genótipos $\epsilon 3/\epsilon 4$ e $\epsilon 4/\epsilon 4$)

Com o objetivo de investigar quais variáveis não genéticas estariam associadas ao desenvolvimento da DA, buscou-se comparar as diferentes variáveis, entre os três grupos estudados, porém considerando como integrantes dos grupos apenas os participantes (ou pacientes) carreadores do alelo $\epsilon 4$ na forma homozigota ou heterozigota (Tabela 11), uma vez que este alelo já se encontra descrito como o fator genético mais importante para o desenvolvimento da DA esporádica. Dessa forma, buscou-se eliminar a influência do fator genético.

Tabela 11 - Comparação das diferentes variáveis entre os 3 grupos em apenas indivíduos portadores do alelo $\epsilon 4$ da ApoE (genótipos $\epsilon 3/\epsilon 4$ ou $\epsilon 4/\epsilon 4$)

Variável	Controle	CCL	DA	P
	$\epsilon 3/\epsilon 4$ $\epsilon 4/\epsilon 4$	$\epsilon 3/\epsilon 4$ $\epsilon 4/\epsilon 4$	$\epsilon 3/\epsilon 4$ $\epsilon 4/\epsilon 4$	
n	13	33	31	
Idade (anos)	75,79 ± 6,03	74,33 ± 8,11	75,52 ± 6,23	0,728 ¹
Escolaridade ϕ	8 (9)	4 (4)	3 (9)	0,045 ^{2*}
CT (mg/dL)	173,45 ± 30,74	159,00 ± 28,66	154,95 ± 31,39	0,178 ¹
HDLc (mg/dL)	42,97 (14,61)	42,46 (18,53)	44,22 (19,95)	0,673 ²
ICAM-1 (ng/mL)	259,38 ± 138,59	297,49 ± 101,49	365,60 ± 144,58	0,029 ^{1**}
Hcy (μ mol/L)	16,72 (9,39)	13,89 (7,45)	13,60 (7,06)	0,462 ²
Sexo	F 10 (18,9%) M 4 (14,8%)	F 19 (35,8%) M 14 (51,9%)	F 24 (45,3%) M 9 (33,3%)	0,387 ³
Hipertensão	13 (19,1%)	27 (39,7%)	28 (41,2%)	0,661 ⁴
Diabetes	3 (18,8%)	7 (43,8%)	6 (37,5%)	0,943 ³
Dislipidemia	5 (20,8%)	10 (41,7%)	9 (37,5%)	0,845 ³

Abreviaturas: (n) número de indivíduos, (C) controle, (CCL) comprometimento cognitivo leve, (DA) doença de Alzheimer (DA), (CT) colesterol total, (HDLc) Lipoproteína de alta densidade; (Hcy) homocisteína; (ICAM-1) Molécula de adesão intercelular. 1- ANOVA (valores expressos como média e desvio padrão). 2- Método Kruskal Wallis (valores expressos como mediana e intervalo interquartil: Q3-Q1). 3-Teste Qui-quadrado de Pearson Assintótico (valores estão expressos como frequência absoluta e relativa). 4-Teste Qui-quadrado de Pearson Exato (valores estão expressos como frequência absoluta e relativa).

ϕ controle (n=10); CCL (n=18); DA (n=9)

* correção Bonferroni no teste Mann Whitney, valores significativos $p < 0,017$: Controle x DA, $p = 0,096$; Controle x CCL, $p = 0,012^*$; CCL x DA, $p = 0,643$.

** teste LSD, valores significativos $p < 0,017$: Controle x DA, $p < 0,0015^*$; Controle x CCL, $p = 0,364$; CCL x DA, $p = 0,044^*$.

Com base nos dados apresentados na Tabela 11, uma vez analisadas as variáveis nos três grupos com igual genótipo para a Apo E, observou-se que apenas as variáveis escolaridade e níveis plasmáticos de ICAM-1 apresentaram diferença significativa. O nível de escolaridade foi significativamente menor nos pacientes com DA, enquanto os níveis plasmáticos de ICAM-1 foram significativamente mais elevados nestes pacientes, ambos em relação ao controle.

Ainda com o objetivo de investigar quais variáveis analisadas estariam associadas ao desenvolvimento da DA além da presença do alelo $\epsilon 4$, buscou-se comparar as diferentes variáveis entre os participantes do grupo controle portadores do genótipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ ou $\epsilon 4/\epsilon 4$ e os participantes do grupo com DA com o alelo $\epsilon 4$ (genótipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ ou

$\epsilon 4/\epsilon 4$) e sem o alelo $\epsilon 4$ (genótipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ ou $\epsilon 3/\epsilon 2$). Os dados com a respectiva análise estatística estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Comparação entre o grupo Controle e grupo com DA na presença e ausência do alelo $\epsilon 4$

Variável	Controle		DA		P
	$\epsilon 3/\epsilon 4$	$\epsilon 4/\epsilon 4$	$\epsilon 3/\epsilon 4$	$\epsilon 3/\epsilon 3$	
			$\epsilon 4/\epsilon 4$	$\epsilon 3/\epsilon 2$	
n	13		31	26	
Idade (anos)	75,54 ± 6,20		75,71 ± 6,16	76,42 ± 5,88	0,875 ¹
Escolaridade ϕ	8 (9)		3 (9)	0,5 (4,0)	0,008 ^{2*}
CT (mg/dL)	175,93 ± 31,62		157,60 ± 29,52	157,14 ± 24,62	0,154 ¹
HDLc (mg/dL)	42,98 (14,76)		44,56 (20,42)	46,53 (16,47)	0,537 ²
ICAM-1 (ng/mL)	245,89 ± 135,55		371,14 ± 144,49	393,55 ± 155,81	0,020 ^{1**}
Hcy (μ mol/L)	16,78 (8,38)		13,60 (7,90)	14,16 (8,87)	0,383 ²
Sexo	F 9 (18,4%)		F 23 (46,9%)	F 17 (34,7%)	0,768 ³
	M 4 (19,0%)		M 8 (38,1%)	M 9 (42,9%)	
Hipertensão	12 (20,0%)		27 (45,0%)	21 (35,0%)	0,737 ⁴
Diabetes	2 (14,3%)		6 (42,9%)	6 (42,9%)	0,846 ³
Dislipidemia	5 (23,8%)		9 (42,9%)	7 (33,3%)	0,750 ³

Abreviaturas: (n) número de indivíduos, (C) controle, (DA) doença de Alzheimer (DA), (CT) colesterol total, (HDLc) Lipoproteína de alta densidade; (Hcy) homocisteína; (ICAM-1) Molécula de adesão intercelular. 1- ANOVA (valores expressos como média e desvio padrão). 2- Método Kruskal Wallis (valores expressos como mediana e intervalo interquartil: Q3-Q1). 3- Teste Qui-quadrado de Pearson Assintótico (valores estão expressos como frequência absoluta e relativa). 4- Teste Qui-quadrado de Pearson Exato (valores estão expressos como frequência absoluta e relativa).

Φ controle (n=10); DA ($\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 4/\epsilon 4$) (n=9); DA($\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 2$) (n=10)

* correção Bonferroni no teste Mann Whitney, valores significativos $p < 0,017$: Controle x DA (E4), $p = 0,096$; Controle x DA (E3), $p = 0,003^*$; DA (E4) x DA (E3), $p = 0,114$.

**Teste LSD, valores significativos $p < 0,017$: Controle x DA (E4), $p = 0,018^*$; Controle x DA (E3), $p = 0,007^*$; DA (E3) x DA (E4), $p = 0,605$.

Uma vez analisados os dados contidos na Tabela 12, observou-se que os resultados obtidos foram muito similares àqueles apresentados na Tabela 11, ou seja, apenas as variáveis escolaridade e níveis plasmáticos de ICAM-1 continuaram apresentando diferença significativa entre indivíduos controles portadores do alelo $\epsilon 4$ e pacientes com DA portadores ou não do alelo $\epsilon 4$, nas formas heterozigota ou homozigota.

Analisando as variáveis estudadas em um modelo de regressão logística múltipla, observou-se que apenas a idade, o uso de antidepressivo e presença do alelo $\epsilon 4$ da Apo E estariam associados ao déficit cognitivo de forma independente (Tabela 13). Cumpre ressaltar que a variável escolaridade não pode ser inserida nesta análise, uma vez que não foi possível a obtenção deste dado de todos os participantes do estudo.

Tabela 13 - Modelo de regressão logística múltipla para a presença de DA em função das variáveis selecionadas

Variável	Controle	DA	OR	IC 95% OR	P	
Idade(anos)	≤ 75	39 (59,1)	27 (40,9)	1,00		
	≥ 76	20 (38,5)	32 (61,5)	2,31	1,10; 4,86	0,027
HAS	Sim	40 (44,9)	49 (55,1)	2,33	0,97; 5,57	0,058
	Não	19 (65,5)	10 (34,5)	1,00		
DM	Sim	10 (45,5)	12 (54,5)	1,25	0,49; 3,17	0,637
	Não	49 (51,0)	47 (49,0)	1,00		
Dislipidemia	Sim	26 (61,9)	16 (38,1)	0,472	0,22; 1,02	0,056
	Não	33 (43, 4)	43 (56,6)	1,00		
Hipolipemiantes	Sim	19 (55,9)	15 (44,1)	0,720	0,32; 1,60	0,417
	Não	40 (47,6)	44 (52,4)	1,00		
Antidepressivos	Sim	8 (18,6)	35 (81,4)	9,30	3,75; 23,06	<0,0001
	Não	51 (68,0)	24 (32,0)	1,00		
Hcy (μmol/L)	≤ 15 ¹	30 (45,5)	36 (54,5)	1,00		
	≥16	29 (55,8)	23 (44,2)	0,66	0,32; 1,37	0,267
ICAM-1(ng/mL)	≤ 211	14 (70,0)	6 (30,0)	1,00		
	>211	44 (51,2)	4 (48,8)	2,23	0,78; 6,34	0,133
MPPs (μL)	≤ 2,70	43 (48,3)	46 (51,7)	1,00		
	>2,70	16 (55,2)	13 (44,8)	0,76	0,33; 1,76	0,522
CT(mg/dL)	≤ 200	46 (45,1)	56 (54,9)	1,00		
	>200	12 (80,0)	3 (20,0)	0,21	0,06; 0,77	0,019
HDL(mg/dL)	≤55	53 (50,5)	52 (49,5)	0,84	0,27; 2,67	0,769
	>55	6 (46,2)	7 (53,8)	1,00		
LDL(mg/dL)	≤100	34 (49,3)	35 (50,7)	1,00		
	>100	25 (51,0)	24 (49,0)	0,93	0,45; 1,94	0,852
TG(mg/dL)	≤ 150	39 (40,6)	57 (59,4)	1,00		
	> 150	20 (90,9)	2 (9,1)	0,068	0,02; 0,31	<0,0001
Lp (a) (mg/dL)	≤ 30	45 (63,4)	26 (36,6)	1,00		
	>30	14 (29,8)	33 (70,2)	4,08	0,56; 2,63	0,521
Apo E (ε4)	Ausência	45 (63,4)	26 (36,6)	1,00		
	Presença	14 (29,8)	33 (70,2)	4,08	1,85; 8,99	<0,0001

Abreviaturas: (DM) diabetes mellitus, (DA) doença de Alzheimer (DA), (CT) colesterol total, (HDLc) Lipoproteína de alta densidade; (Hcy) homocisteína, (LDLc) Lipoproteína de baixa densidade, (TG) triglicérides, (MPPs) micropartículas plaquetárias, [Lp(a)] lipoproteína (a), (OR) *odds ratio*, (IC) intervalo de confiança de 95% da OR, (ICAM-1) Molécula de adesão intercelular. A variável MPPs foi categorizada pelo valor de Q3.

Com base no resultado da análise de regressão multivariada, Tabela 13, a idade avançada, o uso de medicamentos antidepressivos e a presença do alelo $\epsilon 4$ foram fatores de risco significativos para o desenvolvimento da doença. A idade revelou um fator de risco importante, de tal forma que a frequência da doença cresceu exponencialmente com a idade. A presença do alelo $\epsilon 4$ aumenta o risco em 3,37 vezes e o uso de antidepressivos foi o mais importante fator de risco com OR de 9,21. Há fortes indícios de interação entre DA e os fatores de risco de doença cardiovascular, particularmente na doença de DA tardia. Contudo no presente estudo, não foi possível observar associação significativa nos marcadores de lesão vascular estudados em relação a DA. Este modelo é útil para se avaliar a probabilidade de se ter a doença em função das co-variáveis analisadas neste modelo. A Tabela 14 mostra as variáveis significativamente associadas a DA, após ajuste de Hosmer & Lemeshow, com valor de $p=0,821$, o que significa que o modelo se encontra bem ajustado aos dados.

Tabela 14 - Fatores de risco/variáveis para DA encontrados no presente estudo

Variável	Controle	DA	OR	IC 95% OR	P
Idade (anos)					
≤ 75	39 (59,1)	27 (40,9)	1,00		
≥ 76	20 (38,5)	32 (61,5)	2,31	1,05; 6,19	0,039
Antidepressivos					
Sim	8 (18,6)	35 (81,4)	9,21	3,49; 24,35	<0,0001
Não	51 (68,0)	24 (32,0)	1,00		
Apo E ($\epsilon 4$)					
Ausência	45 (63,4)	26 (36,6)	1,00		
Presença	14 (29,8)	33 (70,2)	3,37	1,37; 8,27	0,008

Abreviaturas: (DA) doença de Alzheimer (DA), (OR) *odds ratio*, (IC) intervalo de confiança de 95% da OR. Hosmer & Lemeshow $p=0,821$.

6. DISCUSSÃO

6.1 Características dos grupos incluídos no estudo

A partir das informações coletadas na ficha preenchida pelos médicos, foram levantadas as características clínicas dos indivíduos desse estudo (Tabela 2).

Houve predominância do sexo feminino com 122 pacientes (68,9%) em relação aos 55 (31,1%) do sexo masculino. Entretanto, um dos aspectos do envelhecimento populacional é a “feminilização da velhice” que se deve à sua maior taxa de crescimento em relação ao segmento masculino. Em 1996, dos 12,5 milhões de idosos, 54,4% eram do sexo feminino. Como consequência, quanto “mais velha” for a população estudada, maior a proporção de mulheres (CAMARANO, 2002). Assim, julgou-se que a diferença no sexo não tenha interferido nos resultados e poderia representar a distribuição encontrada na população idosa.

No entanto, não se pode deixar de questionar o papel dos hormônios femininos no desenvolvimento da DA predominantemente neste sexo. O estrogênio pode ter efeito neurotrófico e aumentar a síntese de acetilcolina através do aumento da colinoacetiltransferase (CUMMINGS et al., 1998). Apesar de estudos retrospectivos demonstrarem benefício sintomático ou redução de risco de DA em mulheres após a menopausa, em uso de estrógenos, trabalhos prospectivos e aleatórios não comprovaram alteração cognitiva ou quaisquer outros benefícios (HENDERSON et al., 2000; MULNARD et al., 2000; THAL et al., 2003). Cabe ressaltar que as mulheres durante o climatério apresentam inúmeras queixas de memória coincidindo com a falência ovariana, fato que parece impactar desfavoravelmente a memória (MUNOZ & FELDMAN, 2000). Uma metanálise concluiu que o uso de estrogênios não é indicado para melhora cognitiva em mulheres com DA (HOGERVORST et al., 2002).

Assim como existem os fatores de risco para a DA existem fatores protetores. A escolaridade é identificada como um fator protetor em inúmeros estudos, provavelmente pelo consequente aumento da densidade sináptica de regiões

corticais e pela maior capacidade de compensação de deficiências intelectuais dos indivíduos com maior escolaridade (CUMMINGS et al., 1998).

De acordo com a hipótese da reserva cognitiva na DA, o cérebro de indivíduos com maior escolaridade e maior demanda ocupacional lidaria melhor com os danos provocados pela doença, devido à maior complexidade do seu circuito cerebral (STERN, 1994). No entanto, um importante viés dos estudos que apoiam essa hipótese é que indivíduos mais instruídos têm melhor desempenho quando realizam os testes utilizados para o diagnóstico de demência (ALMEIDA, 1998; MUNOZ & FELDMAN, 2000).

No estudo realizado em Catanduva (HERRERA et al., 1998), observou-se relação inversamente proporcional entre a prevalência de demência e a escolaridade. Nos indivíduos com oito anos ou mais de escolaridade a prevalência foi de 3,5%, enquanto que nos analfabetos foi de 12,2%.

Assim, devido às características de heterogeneidade educacional de nossa população, no presente estudo, os testes neuropsicológicos aplicados para avaliar os indivíduos de escolaridade alta tiveram um nível de corte diferente, de acordo com o estudo desenvolvido por Brucki e colaboradores em 2003. Dessa forma, buscou-se minimizar a ocorrência de possível viés relacionado ao grau de instrução, tornando os nossos dados mais confiáveis com relação ao diagnóstico de demência.

Neste estudo, a escolaridade foi avaliada quanto aos anos de estudo dos indivíduos e os grupos DA e CCL apresentaram medianas próximas e diferentes do grupo controle que apresentou aproximadamente 11 anos de escolaridade (Tabela 2). Diante deste achado preliminar, pode-se admitir que realmente a escolaridade possa funcionar como um fator de proteção. Em concordância com esta afirmativa, os dados da Tabela 11 vem corroborar com esta ideia, uma vez que a comparação de diferentes variáveis analisadas entre os três grupos contendo apenas participantes portadores do alelo $\epsilon 4$, fator genético predisponente a DA, revelou que o nível de escolaridade daqueles que não desenvolveram a doença é significativamente mais elevado do que aqueles que desenvolveram a doença. Os participantes do grupo

CCL, também portadores do alelo $\epsilon 4$, à exemplo dos pacientes com DA, também apresentaram nível de escolaridade significativamente inferior aos participantes do grupo controle que também apresentavam o fator genético predisponente.

De forma similar, os dados apresentados na Tabela 12, sugerem fortemente a importância do nível de escolaridade sobre o desenvolvimento da DA, uma vez que o nível de escolaridade continuou sendo um fator diferencial entre o grupo controle e pacientes com DA, com ou sem fator genético predisponente (presença ou não do alelo $\epsilon 4$).

Guardadas as devidas limitações inerentes ao tamanho amostral deste estudo, os achados atuais permitem confirmar prévios estudos acerca da importância do nível educacional sobre o desenvolvimento da DA. Por outro lado, uma análise reflexiva dos dados contidos nas Tabelas 11 e 12, considerando que foram incluídos apenas indivíduos controles portadores do alelo $\epsilon 4$ (ou seja, aqueles que envelheceram de forma saudável apesar da presença do fator genético predisponente), em comparação com pacientes com ou sem o alelo $\epsilon 4$, permite inferir sobre a possível importância do nível de escolaridade sobre o fator genético mais importante, até o momento, para a DA esporádica.

Foram observadas, entre os indivíduos do estudo, características clínicas tais como hipertensão arterial, dislipidemia e diabetes mellitus, sendo estas consideradas fatores de risco para DA. Entre os idosos na faixa etária do estudo (60 a 90 anos) é comum a incidência de, pelo menos, uma dessas doenças o que dificultou a seleção de indivíduos que não apresentassem as mesmas. Assim, devido à dificuldade de encontrar idosos que não possuíssem qualquer fator de risco para lesão endotelial, foram incluídos no estudo idosos que apresentavam alguns destes fatores, como relacionados na Tabela 3. No entanto, não houve diferença significativa para as características clínicas (hipertensão, diabetes mellitus, dislipidemia e hipotireoidismo) entre os três grupos, o que vem minimizar possível viés em decorrência destas condições.

Vários estudos têm sugerido que a hipertensão predispõe os indivíduos para o desenvolvimento do CCL seguido de demência, depois de um período que pode variar de alguns anos para várias décadas. A presença do alelo $\epsilon 4$ da Apo E aumenta consideravelmente o risco de hipertensão. Por outro lado, tratamentos com fármacos anti-hipertensivos têm mostrado reduzir o risco de desenvolvimento de deficiência cognitiva (KIVIPERTO et al., 2001; NAGAI et al., 2010) e, em alguns estudos, de desenvolver DA (PEILA et al., 2001). No entanto, devido à dificuldade de se obter informações confiáveis, tais como dados sobre a data de início da hipertensão nos pacientes e nos controles, foi impossível fazer qualquer alusão ao efeito da hipertensão sobre o desenvolvimento da DA.

Uma análise do perfil de uso de medicamentos pelos participantes dos três grupos revelou que os participantes do grupo com DA usavam significativamente mais antidepressivos do que os outros grupos. No entanto, este dado foi obtido no momento de coleta e pode não refletir o uso deste medicamento durante parte significativa da vida destes indivíduos. Também não foi possível saber quando os pacientes iniciaram o uso deste medicamento que, em teoria, sinalizaria para a presença de processo depressivo durante a vida útil destes indivíduos.

Neste contexto, estudos realizados em ambientes clínicos confirmaram a elevada prevalência de sintomas neuropsiquiátricos na DA. Dentre estes, destaca-se o estudo realizado por Lyketsos e colaboradores, em 2002, que avaliaram 362 pacientes com demência, em 4 estados americanos, encontrando sintomas neuropsiquiátricos em 75% dos casos. As síndromes mais frequentes foram apatia (36%), depressão (32%) e agitação/agressividade (30%). Mais recentemente, em estudo populacional realizado em São Paulo, no qual foram avaliados 41 pacientes com DA, a apatia foi a alteração neuropsiquiátrica mais prevalente, sendo identificada em 56,1% dos pacientes, seguida de sintomas depressivos em 48,8% (TATSCH 2005).

6.2 Níveis plasmáticos da molécula de adesão solúvel (sICAM-1)

As lesões vasculares e a DA são achados comuns, em especial entre idosos. Portanto, pode-se esperar que a ocorrência conjunta desses dois distúrbios não seja um fenômeno raro. Estudos epidemiológicos sugerem que fatores de risco para doença vascular em geral estão associados com CCL e DA, e que a presença de doença cerebrovascular intensifica a presença e a gravidade dos sintomas clínicos da DA (BRETELER, 2000).

As moléculas de adesão solúveis apresentam um papel estabelecido como mediadores importantes da resposta inflamatória. No entanto, poucos estudos analisando o perfil plasmático da molécula de adesão solúvel sICAM-1, incluindo pacientes com DA, existem na literatura. Assim, neste estudo buscou-se estabelecer os níveis plasmáticos da molécula de adesão solúvel (sICAM-1) e seu perfil nos indivíduos do estudo.

Com relação aos níveis plasmáticos de sICAM-1 neste estudo, um marcador de lesão microvascular, estes se mostraram gradativamente aumentados nos pacientes com DA quando comparados aos níveis do grupo controle ($P < 0,0001$), o que vem reforçar a ideia que a lesão microvascular está associada ao desenvolvimento desta doença. Todavia, com estes dados não foi possível inferir como as alterações microvasculares sistêmicas se relacionam com as doenças cerebrovasculares e neuronal, no caso deste estudo, doença de Alzheimer.

Rentzos e colaboradores, em 2004, estudando 25 pacientes com DA, 54 sem doença inflamatória neurológica e 15 controles, encontraram níveis mais elevados de sICAM-1 em pacientes com DA em comparação com os outros dois grupos. Estes autores atribuíram a presença de valores elevados para sICAM-1 a processos imunológicos envolvidos na fisiopatologia da DA.

O aumento de substância beta-amilóide (A β) e os emaranhados neurofibrilares nos pacientes com DA parecem agir como irritantes, causando a ativação do complemento, marcando o início de mudanças nas células microgliais, bem como a liberação de produtos potencialmente neurotóxicos. Provas de imunohistoquímica e moleculares indicam que o cérebro apresenta um sistema imunológico endógeno ativo e que a inflamação crônica pode desempenhar um papel importante na morte neuronal (MCGEER & MCGEER, 1998).

Estudos realizados por Magaki e colaboradores, em 2007, colocam a hipótese de que a inflamação é um evento inicial, em vez de uma consequência tardia da DA. Crescente evidência sugere que as modificações periféricas em função de fatores inflamatórios podem ocorrer durante os primeiros anos no desenvolvimento da DA. Contudo, no presente estudo, não foi possível observar qualquer diferença nos níveis de sICAM-1 para os pacientes do grupo CCL em relação ao controle.

6.3 Homocisteína (Hcy)

Há evidências crescentes de que um nível elevado de Hcy no sangue é um fator de risco para doenças cardiovasculares bem como para as doenças cerebrovasculares e acidente vascular cerebral (SACHDEV, 2004). Um evento chave na patogênese da DA é a formação da A β e este processo é favorecido por uma condição de hiperhomocisteinemia (GENEDANI et al., 2010).

Diversos estudos vêm sendo realizados visando avaliar a relação da hiperhomocisteinemia e o déficit cognitivo característico das síndromes demenciais. No entanto, os resultados obtidos são conflitantes.

Clarke et al (1998) examinaram 164 pacientes com doença de Alzheimer (DA), 76 deles com confirmação histológica, e encontraram níveis plasmáticos de homocisteína significativamente mais elevados, enquanto os níveis de ácido fólico e de vitamina B12 foram menores nos pacientes com confirmação histológica de DA em relação aos indivíduos controles. Também foi observado que níveis plasmáticos

de homocisteína acima de 11.1µmol/L se mostraram associados com a progressão mais rápida da DA, avaliada pela diminuição do tamanho do lobo temporal.

Smith (2008) avaliou setenta e sete estudos transversais com mais de 34.000 indivíduos e 33 estudos prospectivos com mais de 12.000 indivíduos e todos demonstraram uma associação entre o déficit cognitivo e concentrações elevadas de homocisteína, ou deficiências de vitaminas do complexo B.

Cunha et al (1995) investigaram os possíveis efeitos da reposição de vitamina B12 sobre a função cognitiva de pacientes com demência leve manifestada a menos de dois anos. Foi avaliado um total de 181 pacientes, sendo que apenas 46 apresentavam deficiência de vitamina B12. O tratamento com B12 resultou na melhora da função cognitiva de apenas três pacientes.

Contrariamente, Locascio et al., (2008) em um estudo coorte envolvendo 122 pacientes com diagnóstico de DA não encontraram relação entre níveis elevados de Hcy e declínio cognitivo. Tal relação também não foi observada nos estudos realizados por Regan et al. (2006), bem como em estudo recente, realizado nos Estados Unidos, considerando o ponto de corte de homocisteína plasmática de 11.5 µmol/L, não tendo sido observada associação do declínio cognitivo e elevação de Hcy (TANGNEY et al., 2009).

Recentemente, Oulhaj et al. (2010) concluíram um estudo no qual foi analisado o declínio cognitivo global de 97 pacientes com DA, a cada seis meses, num período de 1,5 a 9,5 anos. Estes autores concluíram que quanto mais alto os níveis de homocisteína, mais rápido foi o declínio cognitivo, especialmente para os pacientes com idade menor que 75 anos e que não apresentavam história de doença vascular.

Porém, vários fatores devem ser levados em conta ao comparar os estudos encontrados na literatura que buscam a associação de déficit cognitivo e hiperhomocisteinemia, como a faixa etária dos pacientes avaliados e o ponto de corte da homocisteína, bem como o grau de demência dos pacientes, o tempo de

manifestação dos sintomas e a história de doença vascular. Tais fatores podem justificar a ausência de consistências entre os vários estudos.

Quanto aos níveis de Hcy encontrados nos três grupos do presente estudo, estes foram similares, contrariamente ao esperado. Todavia, como muitos dos pacientes com DA e CCL faziam uso de vitaminas no momento da coleta de sangue, atribuiu-se a ausência de diferença entre os grupos para os níveis de Hcy, parâmetro potencialmente indutor de lesão microvascular, à ingesta de vitamina B12, que reduz os níveis deste aminoácido. É importante ressaltar, todavia, que níveis elevados de homocisteína, em algum momento, na fase produtiva da vida destes pacientes poderão ter contribuído para o desenvolvimento de lesão microvascular facilitando a instalação da DA.

Assim, vários pesquisadores relataram uma melhor recuperação da função cognitiva nos casos em que a suplementação de vitamina B₁₂ foi feita em pacientes com o diagnóstico inicial da DA (CUNHA et al., 1995). No entanto, não há ainda dados suficientes para comprovar a correlação entre suplementação de vitamina B₁₂ e a melhora da função cognitiva em pessoas com demência e níveis plasmáticos reduzidos dessa vitamina. Estudos clínicos aleatórios bem definidos com relação à faixa etária dos pacientes, o grau de demência, o tempo de manifestação dos sintomas, a história de doença vascular, bem como o ponto de corte da homocisteína são necessários para elucidar a relação causa/efeito entre hiperhomocisteinemia e síndromes demenciais.

6.5 Micropartículas plaquetárias (MPPs)

O aumento do número de MPPs tem sido observado em pacientes que possuem uma maior ativação plaquetária como na doença de Alzheimer. Como as plaquetas são uma importante fonte da APP, pois contêm mais de 95% da APP circulante (DI LUCA et al, 2000), justifica-se a inclusão do estudo deste parâmetro no presente estudo.

Em um estudo realizado por Di Luca e colaboradores, em 1998, observou-se que as isoformas da APP de plaquetas estão alteradas em pacientes com DA. Esta alteração correlacionou positivamente com a progressão dos sintomas clínicos, apoiando a possibilidade de considerar este parâmetro periférico como um marcador de progressão da DA.

No presente estudo, as MPPs isoladamente não foram diferentes para os grupos controle e DA, havendo considerável sobreposição entre os valores de MPPs dos grupos controle e DA. Este estudo mostrou apenas evidência de diferença significativa nos valores de MPPs dos pacientes com CCL quando comparados ao grupo controle. Todavia, nenhuma explicação para tal fato pode ser aventada.

Os nossos resultados estão de acordo com a constatação anterior de Sevush e colaboradores (1998) que também não observaram diferença significativa na frequência de MPPs entre os pacientes com DA e idosos controles ($p = 0,77$).

6.6 Perfil lipídico

Estudos epidemiológicos examinando a associação entre lípidos e demência têm reportado resultados conflitantes. A elevação dos níveis plasmáticos de colesterol total tem sido associado com ambos, aumento e diminuição no risco de DA e/ou demência vascular (DV) (LEPARA et al., 2009) enquanto outros estudos não encontram qualquer associação (KIVIPELTO & SOLOMON, 2006; ARVANITAKIS et al., 2008).

Segundo alguns investigadores (NOTKOLA et al., 1998; KIVIPELTO et al., 2002; DUFOUIL et al., 2005), a elevação dos níveis séricos de colesterol na meia-idade podem aumentar o risco de desenvolvimento da DA décadas depois. Além disso, a regulação da homeostase do colesterol parece também ser perturbada pela presença do alelo $\epsilon 4$ da Apo E, identificado como importante fator de risco para a DA (SELKOE et al., 2001).

Para avaliação do perfil lipídico dos participantes envolvidos neste estudo, foram dosados os parâmetros colesterol total, HDL, LDL, TG, Apo A-I, Apo B e Lp(a). O perfil lipídico dos idosos em uso de hipolipemiantes foi similar para todos os parâmetros avaliados, exceto para níveis plasmáticos de HDLc e TG. No caso do HDLc, esse parâmetro apresentou uma tendência à redução nos grupos CCL e DA em comparação ao grupo controle, fato que atribui importância à redução do HDL no desenvolvimento da DA. Cabe ressaltar neste contexto que o uso de hipolipemiantes, em geral, não contribui para o aumento do HDLc, mas sim para uma notável redução do LDLc, não tendo sido observada diferença significativa para os níveis de LDLc entre os três grupos. No entanto, os níveis de TG se mostraram significativamente reduzidos no grupo com DA em relação ao grupo com CCL e controles, o que pode ser atribuído à dieta balanceada e restritiva oferecida aos pacientes com DA por familiares e/ou cuidadores.

O Estudo Honolulu teve como objetivo comparar a história natural das mudanças do colesterol total no decorrer de 26 anos. Participaram do estudo 1027 homens americanos – japoneses que tiveram o nível de colesterol medido 5 vezes entre 1965 e 1993 e testes para demência realizados em duas ocasiões entre 1991 e 1996. A alteração observada ao longo de 26 anos na mudança nos níveis séricos de CT foi estimada por uma análise de medidas repetidas, cujos resultados foram comparados entre os homens com demência incidente (n=56) e naqueles sem demência (n=971) ao final do período de avaliação. O estudo teve como conclusão que níveis de colesterol nos homens que desenvolveram demência e, em particular, naqueles com DA, haviam reduzido pelo menos 15 anos antes do diagnóstico e permaneceram abaixo dos níveis, quando comparados aos níveis apresentados nos homens sem demência durante todo esse período. Este estudo concluiu que um declínio nos níveis séricos de colesterol total pode estar associado a estágios iniciais do desenvolvimento de demência (STEWART et al., 2007). Por outro lado, Zambon e colaboradores, em 2010, concluíram que indivíduos com hipercolesterolemia familiar eram mais susceptíveis do que pessoas saudáveis, de desenvolver déficit cognitivo leve, a forma amnésica sinalizando comumente para um prenúncio de DA.

Após os resultados destes estudos diversos consensos surgiram, os quais correlacionam a presença de altos níveis de colesterol com risco aumentado de desenvolver DA. Porém, alguns resultados relatados não se enquadram nessa conclusão. Por exemplo, Reitz e colaboradores (2004), constataram que altos níveis de CT em pessoas com mais de 77 anos diminuiu o risco de DA. Um estudo posterior também desenvolvido por Reitz et al., (2008) demonstrou que altos níveis de CT ou LDLc foram associados com uma diminuição do risco de desenvolver déficit cognitivo leve em pessoas com 65 anos ou mais. Da mesma forma, Mielke et al (2005) descobriu que um alto nível de CT entre 70 e 79 anos reduziu o risco de desenvolver demência entre a idade de 79 e 88 anos.

Duas ressalvas importantes devem ser consideradas ao avaliar os estudos epidemiológicos do nível de colesterol e o risco de DA. Primeiro, muitos desses estudos medem apenas o CT e não conseguem detectar os efeitos distintos de HDLc e LDLc. Segundo, quando os participantes já têm DA no início do estudo, pode ser difícil determinar se uma mudança no nível de colesterol está levando a um efeito sobre a progressão da doença ou, inversamente, se as alterações fisiopatológicas que acompanham a DA estão alterando o nível de colesterol.

Apesar de algumas diferenças significativas entre grupos observadas no presente estudo (TABELAS 7 e 8), uma análise do perfil lipídico como um todo, não permite inferir sobre a contribuição dos parâmetros lipídicos analisados sobre o desenvolvimento da DA. O uso de estatinas por parte de muitos participantes do estudo e, eventualmente, de outros hipolipemiantes, a ausência de informações sobre aspectos dislipidêmicos durante a vida pregressa dos participantes, o impacto da mudança nos hábitos de vida em decorrência da doença e o limitado número de amostras analisadas em cada grupo, são alguns dos fatores que dificultam a obtenção de dados que possam suportar neste estudo o estabelecimento de associação convincente entre alterações do perfil lipídico e desenvolvimento da DA.

6.7 Polimorfismo da Apo E

No presente estudo e, em consonância com a literatura (FUZIKAWA et al., 2007), o alelo mais frequente observado no grupo DA foi o $\epsilon 3$ (56,7%), seguido pelo $\epsilon 4$ (36,7%). Também em concordância com os dados obtidos em outros estudos, o alelo $\epsilon 2$ foi o de menor frequência, com apenas 6,6%.

A frequência do alelo $\epsilon 4$ foi significativamente maior no grupo de pacientes com DA (36%) do que no grupo de controle (15%), o que confirma a presença deste alelo como um fator de risco para a DA, conforme demonstrado em outras populações. No entanto, a proteção atribuída ao alelo $\epsilon 2$ não foi observada na amostra analisada, possivelmente porque é um alelo raro na população.

O estudo do polimorfismo da Apo E revelou que os pacientes com CCL e DA apresentaram uma frequência significativamente maior do alelo $\epsilon 4$ em comparação aos idosos que envelheceram de forma saudável ($P < 0,0001$), o que vem reforçar a ideia de que este alelo predispõe ao desenvolvimento de DA, embora não seja patognomônico desta.

No entanto, foi possível observar neste estudo uma maior frequência do alelo $\epsilon 4$, quando comparado a outros estudos. Nos outros estudos a grande maioria das populações apresentava frequência menor do que 15% para este alelo (FUZIKAWA et al., 2008). Embora haja variações genéticas significativas entre populações de diferentes origens e etnias, a maior frequência do alelo $\epsilon 4$ encontrada nos indivíduos desse estudo sugere concordância com os relatos da literatura que indicam associação deste alelo com o desenvolvimento da DA e CCL (OJOPI et al., 2004).

6.8 Possíveis diferenças intragrupos em indivíduos portadores do mesmo genótipo da Apo E ($\epsilon 3/\epsilon 4$ e $\epsilon 4/\epsilon 4$)

Foram identificados vários fatores que predispõem o desenvolvimento da DA como a idade, a história familiar, fatores genéticos, ocorrência anterior de traumatismo craniano, indivíduos com síndrome de Down, hipertensão arterial, níveis elevados de homocisteína, diabetes mellitus, baixo nível de escolaridade e o consumo de álcool e tabagismo em demasia. As patologias características da idade avançada (como arteriosclerose) são também fatores de risco para o desenvolvimento da DA (BRETELER, 2000; TORRE 2004).

À luz do conhecimento de que a DA constitui uma doença resultante de múltiplos fatores, buscou-se no presente estudo conhecer as variáveis que se mostraram associadas ao desenvolvimento da DA. Dessa forma, para investigar inicialmente quais variáveis não genéticas estariam associadas ao desenvolvimento da DA, buscou-se comparar as diferentes variáveis entre os três grupos estudados, porém considerando como integrantes dos grupos apenas os participantes (ou pacientes) carreadores do alelo $\epsilon 4$ na forma homozigota ($\epsilon 4/\epsilon 4$) ou heterozigota ($\epsilon 3/\epsilon 4$) (Tabela 11), uma vez que este alelo já se encontra descrito como o fator genético mais importante para o desenvolvimento da DA esporádica. Dessa forma, buscou-se eliminar a influência do fator genético.

Os resultados desta análise revelaram que apenas o nível de escolaridade e os níveis plasmáticos de ICAM-1 foram significativamente diferentes do grupo controle. Considerando que os componentes do grupo controle possuíam a mesma predisposição genética para o desenvolvimento da doença que os pacientes com DA, em termos do alelo $\epsilon 4$ ($\epsilon 3/\epsilon 4$) e ($\epsilon 4/\epsilon 4$), pode-se sugerir que outros fatores podem ter maior contribuição no desenvolvimento da DA. Particularmente neste estudo, dois fatores investigados, o baixo nível educacional e o aumento da lesão microvascular, atestada por altos níveis de ICAM-1 (nos pacientes com DA comparados ao grupo controle) (Tabela 11) parecem contribuir de forma preponderante sobre a presença do fator genético. Uma análise dos dados da

Tabela 12, onde as diversas variáveis foram analisadas nos pacientes com DA portadores de genótipos que favorecem o desenvolvimento da DA ($\epsilon 3/\epsilon 4$ e $\epsilon 4/\epsilon 4$) ou não ($\epsilon 3/\epsilon 3$ e $\epsilon 3/\epsilon 2$), vem corroborar com a ideia acima no que se refere à presença de outros fatores potencialmente importantes para o desenvolvimento da DA, no caso o nível educacional e o grau de lesão microvascular. Ressalta-se que o grupo controle apesar de portador do polimorfismo predisponente a DA, envelheceu de forma saudável (idade comparável a dos pacientes), porém apresentou o mais alto nível de escolaridade com mediana de 8 anos. Contrariamente, os pacientes com DA não portadores do fator genético (e alguns até com o fator genético teoricamente de proteção, como os casos de $\epsilon 3/\epsilon 2$), apresentaram o mais baixo nível de escolaridade com uma mediana menor que 1 ano. Já os pacientes com DA portadores do fator genético predisponente ($\epsilon 3/\epsilon 4$ e $\epsilon 4/\epsilon 4$) se tornaram dementes com uma média de escolaridade superior quando comparada àquela apresentada pelos pacientes com DA sem o fator genético predisponente.

Após o exposto acima, pode-se inferir que para um universo de pessoas igualmente portadoras do polimorfismo da Apo E, na forma do alelo $\epsilon 4$ em homozigose ou heterozigose, o nível de escolaridade e o grau de lesão microvascular assumem grande importância no desenvolvimento da doença. Por outro lado, quando se comparam dois universos de pessoas com DA, com e sem o fator genético predisponente, aqueles sem o fator genético também podem se tornar dementes, cuja doença parece ser dependente do baixo nível educacional, dentre outros possíveis fatores. Já para aqueles pacientes com DA portadores do fator genético predisponente, a manifestação da doença parece ser menos dependente do nível educacional (Tabela 12), uma vez que um nível de escolaridade um pouco mais avançado não impediu a manifestação da doença. Em outras palavras, nos indivíduos com o mesmo nível de escolaridade a doença é mais prevalente naqueles portadores do fator genético alelo $\epsilon 4$. Em suma, os dados mostrados nesse estudo (Tabela 12) reforçam a ideia de que o grau de escolaridade pode ser inversamente proporcional ao desenvolvimento da DA. Todavia, naqueles portadores de fator genético predisponente à doença, comparados aos não portadores, a DA pode-se instalar à despeito de certo grau educacional, indicando que a presença do fator genético constitui um fator facilitador, mas não decisivo.

A escolaridade mostrou correlação positiva para o grupo controle como um fator protetor contra a DA. No entanto, quando se toma em conta os relatórios do IBGE para o ano de 2008 (IBGE, 2008), o nível médio de educação para a população de 60 anos ou mais foi de 4,1 anos para todo o país e 4,9 anos para a região Sudeste. O menor nível de escolaridade (2 anos) do nosso grupo com DA está provavelmente relacionado com o local de seleção dos pacientes.

Os níveis aumentados de ICAM-1 no plasma do grupo DA sugere a existência de disfunção endotelial. A disfunção endotelial está estritamente associada com a expressão aumentada no plasma de moléculas de adesão e citocinas e, recentemente, foi relatada a presença de um "baixo grau" de inflamação sistêmica em idosos afetados por demência (ZULIANI et al., 2007). Em consequência, elevados níveis ICAM-1 poderia refletir a presença de doença aterosclerótica avançada. No presente estudo verificou-se que os níveis de ICAM-1 foram mais elevados no grupo com DA. Estes resultados sugerem que os níveis plasmáticos de ICAM-1 podem ser igualmente aumentados nos indivíduos mais velhos com DA e, por conseguinte, independente da presença do alelo $\epsilon 4$.

Com base no resultado da análise de regressão multivariada (Tabela 14), a idade avançada, o uso de medicamentos antidepressivos e a presença do alelo $\epsilon 4$ foram fatores de risco independentes para o desenvolvimento da DA. A idade revelou um fator de risco importante, de tal forma que a frequência da doença cresceu exponencialmente com a idade. A presença do alelo $\epsilon 4$ aumenta o risco em 3,37 vezes e o uso de antidepressivos foi o mais importante fator de risco com OR de 9,21. Há fortes indícios de interação entre DA e os fatores de risco de doença cardiovascular, particularmente na doença de DA tardia. Contudo no presente estudo, não foi possível observar associação significativa nos marcadores de lesão vascular estudados em relação a DA. Cabe ressaltar que não foi possível fazer a análise de regressão multivariada com a escolaridade, uma vez que não foi possível obter este dado de todos os indivíduos do estudo.

6.9 Limitações do estudo e perspectivas

Este estudo pretende ter respondido os objetivos propostos, mesmo apresentando algumas limitações. Admite-se que o pequeno número amostral, bem como o caráter multifatorial da doença de Alzheimer, o uso de medicamentos e a presença de doenças intercorrentes tenham ocasionado o achado de resultados inesperados, dificultando a devida interpretação para alguns biomarcadores avaliados. Todavia, cabe ressaltar que apesar da seleção criteriosa dos indivíduos do grupo controle, os mesmos foram recrutados no SESC, o que pode ter contribuído para a ocorrência de viés relacionado à dieta e à realização de exercícios físicos regulares, constituindo fatores que podem modificar positivamente a história natural da DA. Outra limitação importante está relacionada à heterogeneidade dos participantes do estudo, principalmente no que tange ao nível educacional, uma vez que os outros dois grupos, DA e CCL, foram selecionados no HC-UFMG. Como mostra a Tabela 1, a média de escolaridade dos indivíduos do grupo controle foi significativamente maior do que a média observada nos grupos DA e CCL. Para minimizar as discrepâncias entre os três grupos, já que a procedência do grupo controle foi diferente, foi realizado um levantamento de todos os medicamentos em uso pelos indivíduos, além de doenças intercorrentes.

Outra limitação apresentada pelo estudo foi a não realização da dosagem de creatinina sérica como um dos critérios de exclusão na seleção dos indivíduos para a avaliação dos níveis de homocisteína, considerando que os níveis plasmáticos de homocisteína podem ser influenciados por insuficiência renal, ingestão inadequada de vitamina B12 e/ou ácido fólico. A realização da dosagem de creatinina sérica seria um parâmetro importante de avaliação para a seleção dos indivíduos, visto que aproximadamente dois terços dos idosos apresentam declínio do *clearance* de creatinina. Isso ocorre devido às alterações do envelhecimento e presença de afecções, tais como nefroesclerose e diabetes (REFSUM et al., 2004).

Cumprindo ainda ressaltar que os resultados obtidos neste estudo sinalizam para a existência de fatores de risco fortemente associados ao desenvolvimento da DA,

notadamente a ocorrência de lesão microvascular, nível de escolaridade baixo e o componente genético predisponente representado pela presença do alelo $\epsilon 4$. Os dois primeiros fatores mencionados são passíveis de modificação mediante orientação adequada. Assim, as intervenções possíveis no estilo de vida e no controle rigoroso dos fatores de risco associados à lesão microvascular, tais como os fatores que favorecem processos ateroscleróticos, devem ser estimulados e efetivamente incorporados ao cotidiano dos indivíduos, bem como uma melhor conscientização dos riscos inerentes a tais fatores para toda a população. Estímulo à educação, orientação da dieta, realização de exercícios físicos, uso de antiagregantes plaquetários e de hipolipemiantes, tratamento adequado das comorbidades associadas e acompanhamento rigoroso dos pacientes por equipe multidisciplinar, são algumas das medidas estratégicas que contribuirão decisivamente para a melhoria da qualidade de vida dos indivíduos de forma global o que poderá repercutir favoravelmente no desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas de modo geral.

A adoção das medidas citadas anteriormente, possibilitando a correção de diferentes variáveis clínicas e laboratoriais talvez traga importantes insights na epidemiologia da DA, doença essa de caráter multifatorial. Tais medidas parecem promissoras e devem ser incentivadas em nosso meio.

Ao longo da execução deste estudo, outros aspectos relevantes foram vislumbrados motivando interessantes discussões, novas ideias para pesquisas e melhoramentos na condução experimental. O grupo de estudos pretende, em breve, avaliar os perfis hemostático e inflamatório, além de outros aspectos moleculares diferentes do polimorfismo da apolipoproteína E, nas amostras obtidas dos integrantes do presente estudo.

7. CONCLUSÕES

A análise conjunta dos dados obtidos no presente estudo permite concluir que:

- a elevação gradativa dos níveis plasmáticos de ICAM-1, um biomarcador de lesão microvascular, parece estar associada a DA;
- a frequência do alelo $\epsilon 4$ se mostrou desproporcionalmente elevada em pacientes com DA e CCL em comparação ao grupo de idosos sem demência;
- em consonância com estudos anteriores, a simples presença do alelo $\epsilon 4$ da Apo E não é suficiente para o desenvolvimento da DA, o qual apenas aumenta o risco de DA, indicando que existem outros fatores ambientais e genéticos importantes no desenvolvimento da mesma;
- Indivíduos do grupo controle apresentaram níveis plasmáticos de HDLc significativamente mais altos quando comparados aos indivíduos dos grupos DA e CCL, enquanto os níveis de Apo B foram significativamente mais elevados no grupo CCL em comparação aos grupos controle e DA;
- os níveis plasmáticos de homocisteína e de micropartículas plaquetárias no grupo com DA não se mostraram significativamente diferentes quando comparados aos níveis observados para os grupos controle e CCL.

8. BIBLIOGRAFIA

AGRELL B; DEHLIN O. The clock-drawing test. *Age and Ageing*, v. 27, p. 399-403, 1998.

ALMEIDA O P. Mini exame do estado mental e o diagnóstico de demência no brasil. *Arq Neuropsiquiatr*, v. 56 (3-B), p. 605-612, 1998.

ALUISE C D; SOWELL R A; BUTTERFIELD D A. Peptides and proteins in plasma and cerebrospinal fluid as biomarkers for the prediction, diagnosis, and monitoring of therapeutic efficacy of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. V. 1782; p. 549–558; 2008.

ALZHEIMER A. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie. *Psychisch-gerichtliche Medizin*, v. 64, p. 146-148, 1907. In: SMITH M A C. Doença de Alzheimer. *Revista brasileira de psiquiatria*, SII 3-SII 7. Genética: Suplemento II (21), 1999.

ANDREASEN N; BLENNOW K. β - amyloid (A β) protein in cerebrospinal fluid as a biomarker for Alzheimer's disease. *Peptides*. v. 23, p. 1205 – 1214, 2002.

APA. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association, 1994.

APRAHAMIAN I; MARTINELL J E; YASSUDA M S. Doença de Alzheimer: revisão da epidemiologia e diagnóstico. *Rev Bras Clin Med*, v. 7, p. 27-35, 2009.

ARVANITAKIS Z; SCHNEIDER J A; WILSON R S; et al. Statins, incident Alzheimer disease, change in cognitive function, and neuropathology. *Neurology*, V. 70, p. 1795-1802, 2008.

BACH-NGOHOU K; GIRAUD F; KREMPF M; BARD J M. Influence of remnant accumulation markers on plasma concentrations of two lipoprotein (a) subspecies (containing or free of APOE). *Metabolism*, v.50, p.277-282, 2001.

BALLATORE C; LEE V Y; TROKANOWSKI J Q. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, p.663 – 672, 2007.

BARBER R C. Biomarkers for early detection of Alzheimer disease. **J Am Osteopath Assoc.**, v. 110, p. S10-S15, 2010.

BARRY O P; PRATICO D; SAVANI R C; FITZGERALD G A. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. **J Clin Invest.** v. 102, p.136-44, 1998.

BEARD C M; KOKMEN E; O'BRIEN P C; KURLAND L T. The prevalence of dementia is changing over time in Rochester, Minnesota. **Neurology.** v.45, p. 75-79, 1995.

BEISIEGEL U. Lipoprotein metabolism. **Eur Heart J**, v.19. p. s 20-23, 1998.

BEKRIS L M; YU C E; BIRD T D; TSUANG D W. Genetics of AD. **J Geriatr Psychiatry Neurol.**, v. 23, p. 213-227, 2010.

BERTOLUCCI P H F et al. O mini-exame do estado mental em uma população geral: impacto da escolaridade. **Arq. Neuropsiquiatria**, v. 52, p.1-7, 1994.

BERTOLUCCI P H F. Instrumentos para o Rastreamento de Demências. In: FORLENZA O V; CARAMELLI P; editors. **Neuropsiquiatria Geriátrica**. São Paulo: Atheneu, p. 65-79, 2000.

BERTOLUCCI P H F; NITRINI R. Proposta de uma versão brasileira para a escala adcs-cgic. **Arq Neuropsiquiatr.**, v. 61, p. 881-890, 2003.

BERTOLUCCI P H, OKAMOTO I H, BRUCKI S M, SIVIERO M O, TONIOLO J NETO, RAMOS LR. Applicability of the CERAD neuropsychological battery to Brazilian elderly. *Arq Neuropsiquiatr*; v. 59, p. 532-536, 2001.

BIRGE S J. The role of estrogen in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurology*. v. 48, p.36-41, 1997.

BOFFA M B; MARCOVINA S M. Inhibition of plasminogen activation by lipoprotein(a): critical domains in apolipoprotein(a) and mechanism of inhibition on fibrin and degraded fibrin surfaces. *J Biol Chem*, v. 278, p. 260-9, 2003.

BOWMAN G L, et al., Dyslipidemia and Blood-Brain Barrier Integrity in Alzheimer's Disease. *Current Gerontology and Geriatrics Research.*, 2012.

BRETELER M M B. Vascular risk factors for Alzheimer's disease: An epidemiologic perspective. *Neurobiology of Aging*. v. 21, p. 153–160, 2000.

BROWN S A; MORRISETT J; PATSCH J R et al. Influence of short term dietary cholesterol and fat on human plasma Lp(a) and LDL level. *J Lipid Res*; v.32, p. 1281-1289, 1991.

BRUCKI S M D; NITRINI R; CAMELLI P; BERTOLUCCI P H F; OKAMOTO I H. Sugestões para o uso do Mini-Exame do Estado Mental no Brasil. *Arq Neuropsiquiatr*, v. 61, p. 777-781, 2003.

BRUCKI S M D, MALHEIROS S M F, OKAMOTO I H, BERTOLUCCI P H F. Dados normativos para o uso do teste de fluência verbal em nosso meio. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, v. 55, p. 56-61, 1997.

BUTLER S M; ASHFORD J W; SNOWDON D A. Age, education, and changes in the Mini-Mental State Exam scores of older women: findings from the Nun Study. *J Am Geriatr Soc*, v. 44, p. 675-681, 1996.

CACABELOS R. Pharmacogenetic basis for therapeutic optimization in Alzheimer's disease. *Mol Diag Ther.*, v. 11, n. 6, p.385-405, 2007.

CAIN W J; MILLAR J S; HIMEBAUCH A S; TIETGE U J F; MAUGEAIS C; USHER D; RADER D J. Lipoprotein(a) is cleared from the plasma primarily by the liver in a process mediated by apolipoprotein(a). *Journal of Lipid Research*, v.46, p.2681-2691, 2005.

CAMARANO A A. Envelhecimento da população brasileira: uma contribuição demográfica. In: Freitas E V, et al. *Tratado de Geriatria e Gerontologia*. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 58-71, 2002.

CAMPOS F M F et al. Augmented plasma microparticles during acute Plasmodium vivax infection. *Malaria Journal*, v. 9:327, 2010.

CARAMELLI P; BARBOSA M T. Como diagnosticar as quatro causas mais frequentes de demência? *Rev. Bras. Psiquiatr.* São Paulo, Associação Brasileira de Psiquiatria, v.24, p. 23- 28, 2002.

CASOLI T; STEFANO G D; BALIETTI M; SOLAZZI M; GIORGETTI B; FATTORETTI P. Peripheral inflammatory biomarkers of Alzheimer's disease: the role of platelets. *Biogerontology*. v. 5, 2010.

CHARCHAT H; NITRINI R; CARAMELLI P; SAMESHIMA K. Investigação de Marcadores Clínicos dos Estágios Iniciais da Doença de Alzheimer com Testes Neuropsicológicos Computadorizados. *Psicologia: Reflexão e Crítica*. v. 14, p. 305-316, 2001.

CHARCHAT-FICHMAN H; CARAMELLI P; SAMESHIMA K; NITRINI R. Declínio da capacidade cognitiva durante o envelhecimento. *Rev. Bras. Psiquiatr.* v. 27 (1), 2005.

CIABATTONI G; PORRECA E; DI FEBBO C; DI IORIO A; et al. Determinants of platelet activation in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. v. 28, p.336-42, 2007.

CLARKE R; SMITH D A; JOBST K A; REFSUM H; SUTTON L; UELAND P M. Folate, vitamin B12, serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer's disease. *Arch Neurol*; v. 55, p. 1449-55, 1998.

CORDER E H, SAUNDERS AM, STRITTMATTER WJ, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, v. 261(5123), p. 921–3, 1993.

CORDER E H; LANNFELT L; BOGDANOVIC N; FRATIGLIONI L; MORI H. The role of APOE polymorphisms in late-onset dementias. *Cell Mol Life Sci*, v. 54; p. 928-34, 1998.

CUMMINGS J L; VINTERS H V; COLE G M; et al. Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. *Neurology*, v. 51(1), p. S2-S67, 1998.

CUNHA UGV; et al. Vitamin B, Deficiency and Dementia. *International Psychogeriatrics*, v. 7, 1995.

CZYZEWSKI K; PFEFFER A; BARCIKOWSKA M. Apolipoprotein E function in the nervous system. *Neurol Neurochir Pol*, v. 32, p. 125-32, 1998.

DAFFNER K R. Current Approaches to the Clinical Diagnosis of Alzheimer's Disease. In: SCINTO L F M; DAFFNER K R. Early Diagnosis of Alzheimer's Disease. *New Jersey: Humana Press*, p. 29-64, 2000.

DE-ANDRADE F M; LARRANDABURU M; CALLEGARI-JACQUES S M; GASTALDO G; HUTZ M H. Association of apolipoprotein E polymorphism with

plasma lipids and Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population. **Braz J Med Biol Res.**, v. 33, p. 529-537, 2000.

DESAI A K; GROSSBERG G T; CHIBNALL J T. Healthy brain aging: a road map. **Clin Geriatr Med.**, v. 26, p. 1-16, 2010.

DI LUCA M, PASTORINO L, BIANCHETTI A, PEREZ J, VIGNOLO LA, LENZI GL, TRABUCCHI M, CATTABENI F, PADOVANI A. Differential level of platelet amyloid beta precursor protein isoforms: an early marker for Alzheimer disease. **Arch Neurol.** v. 55(9), p.1195-200, 1998.

DI LUCA M; COLCIAGHI F; PASTORINO L; BORRONI B; PADOVANI A; CATTABENI F. Platelets as a peripheral district were to study pathogenetic mechanisms of Alzheimer disease: the case of amyloid precursor protein. **European Journal of Pharmacology.**, v. 405, p.277 – 283, 2000.

DIAZ R. New biochemical markers in Alzheimer disease. **Arch Neurol.**, v.58, p.354-56, 2001.

DUFOUIL C; RICHARD F; FIEVET N; et al. APOE genotype, cholesterol level, lipid-lowering treatment, and dementia: the Three-City Study. **Neurology**, v. 64(9), p. 1531–8, 2005.

DURIEZ P; DALLONGEVILLE J; FRUCHART J C. Lipoprotein(a) as a marker for coronary heart disease. **Br J Clin Pract**, v. 77, p. S54-61, 1996.

DURON E & HANON O. Vascular risk factors, cognitive decline, and dementia. **Vasc Health Risk Manag.**, v. 4, p. 363-381, 2008.

ELLINSON M et al. A critical evaluation of the relationship between serum vitamin B, folate and total homocysteine with cognitive impairment in the elderly. **J. Hum. Nutr. Diet.** v. 17, p. 371-83, 2004.

EVIN G; ZHU A; DAMIAN HOLSINGER R M; MASTERS C L; LI Q X. Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein in brain and platelets. **Journal of Neuroscience Research**, v. 74, p. 386 – 392, 2003.

EWBANK D C. A multistate model of the genetic risk of Alzheimer's disease. **Exp Aging Res**, v. 28, p. 477-499, 2002.

EWERS M; MIELKE M M; HAMPEL H. Blood-based biomarkers of microvascular pathology in Alzheimer's disease. **Experimental Gerontology** 2009.

FARRER L A; CUPPLES L A; HAINES J L; HYMAN B; KUKULL W A; MAYEUX R; MYERS R H; PERICAK-VANCE M A; RISCH N; VAN DUIJN C M. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. **JAMA**, v. 278, n. 16, p. 1349-1356, 1997.

FASSBENDER A K; MASTERSB C; BEYREUTHERC K. Alzheimer's disease: An inflammatory disease? **Neurobiology of Aging**. v. 21, p. 433–436, 2000.

FOLSTEIN M F et al. Mini-mental state: a practical method for grading the cognitive state off patients for the clinician. **Journal of Psychiatric Research**, v.12, p.189-198, 1975.

FORLENZA O V. Transtornos depressivos na doença de Alzheimer: diagnóstico e tratamento. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 22, p. 87-95, 2000.

FRANK P G; MARCEL Y L. Apolipoprotein A1: structure-function relationships. **J Lipids Res**, v. 41, p. 853-872, 2000.

FRIDMAN C; GREGÓRIO S P; OJOPI É P B; DIAS NETO E. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. **Rev. Psiq. Clín.**, v. 31, p.19-25, 2004.

FRIEDEWALD WT; LEVY R I; FREDRICKSON D S. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, p. 499-552, 1972.

FROTA N A F; NITRINI R; DAMASCENO P B; FORLENZA O; TOSTA D E; SILVA B A; JUNIOR B A; MAGALDI M R. Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer. Consenso do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. **Dement Neuropsychol**; v. 5, p. 5-10, 2011.

FUZIKAWA, A.K.; PEIXOTO, S.V.; TAUFER, M.; MORIGUCHI, E.H.; LIMA-COSTA, M.F. Apolipoprotein E polymorphism distribution in an elderly Brazilian population: the Bambuí Health and Aging Study. **Braz J Med Biol Res**. v.40, n.11, p.1429-1434, 2007.

FUZIKAWA, A.K.; PEIXOTO, S.V.; TAUFER, M.; MORIGUCHI, E.H.; LIMA-COSTA, M.F. Association of ApoE polymorphisms with prevalent hypertension in 1406 older adults: the Bambuí Health Aging Study (BHAS). **Braz J Med Biol Res**. v.41, p.89-94, 2008.

GAUTHIER S; REISBERG B; ZAUDIG M. et al. Mild Cognitive Impairment. **Lancet**, v. 367, p. 1262-70, 2006.

GEBARA K S; MATIOLI G. Relação da hiperhomocisteinemia com a doença cardiovascular e a doença de Alzheimer. **Rev Bras Nutr Clin**; v. 21, p. 239-43, 2006.

GENEDANI S; AGNATI L F; LEO G; BUZZEGA D; MACCARI F; CARONE C; ANDREOLI N; FILAFERRO M; VOLPI N. β -Amyloid Fibrillation and/or Hyperhomocysteinemia Modify Striatal Patterns of Hyaluronic Acid and Dermatan Sulfate: Possible Role in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Current Alzheimer Research**. v. 7, p. 150-157, 2010.

GOODMAN I J. Practical utility of urinary assay in the diagnosis of Alzheimer's disease:AlzheimerAlert™. **Expert Rev.Mol. Diagn.**, v.8(1), p.21-8, 2008.

GRALLE M; FERREIRA S T. Structure and functions of the human amyloid precursor protein:The whole is more than the sum of its parts. **Progress in Neurobiology**. v. 82, p. 11–32, 2007.

HACHINSKI V C; ILIFF L D; ZILHKA E et al. Cerebral blood flow in dementia. **Arch Neurol.**, v. 32(9), p. 632-637, 1975.

HACHINSKI V C; et al., Optimizing the Hachinski Ischemic Scale. **Arch Neurol.**, v. 69(2), p. 169-75, 2012.

HENDERSON V W; PAGANINI-HILL A; MILLER B L et al. Estrogen for Alzheimer's disease in women: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Neurology**, v. 54, p. 295-301, 2000.

HERRERA E JR; CARAMELLI P; NITRINI R. Estudo epidemiológico populacional de demência na cidade de Catanduva, estado de São Paulo. **Rev Psiq Clin**,v.25, p. 70- 73, 1998.

HERRMANN W; OBEID R. Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases. **Clin Chem Lab Med.**, v. 49, p. 435-441, 2011.

HEYMAN A; PETERSON B; FILLENBAUM G; PIEPER C. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part XIV: Demographic and clinical predictors of survival in patients with Alzheimer's disease. **Neurology**, v.46(3), p.656-660, 1996.

HO PI; COLLINS S C; DHITAVAT S; ORTIZ D; ASHLINE D; ROGERS E; SHEA T. Homocysteine potentiates b-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. **J Neurochem**; v. 78, p. 249-253, 2001.

HOFF H F; O'NEIL J; YASHIRO A. Partial characterization of lipoproteins containing Apo(a) in human atherosclerotic lesions. **J Lipid Res**, v. 34, p. 789-798, 1993.

HOGERVORST E; YAFFE K; RICHARDS M et al. Hormone replacement therapy to maintain cognitive function in women with dementia. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 3, 2002.

HOLANDA M M A; FILIZOLA R G; COSTA M J C; ANDRADE R V C L; SILVA J A G. A comparison between diabetic and non-diabetic patients with acute ischemic stroke. **Arq Neuropsiquiatr**, v.62, p. 233-236, 2004.

HORSTMAN L L; AHN Y S. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. **Crit. Rev Oncol Hematol**; v. 30, p. 111-42, 1999.

HUEB T. O. Doença de Alzheimer / Alzheimer's disease. **Rev. Bras. Med.**, v. 65, p. 90-95, 2009.

HUGHES C P; BERG L; DANZINGER W L; COBEN L A; MARTIN R L. A new clinical scale for the staging of dementia. **British Journal of Psychiatry**, v. 140, p. 566-572, 1982.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios, 2008.

JASINSKA-MYGA B; OPALA G; GOETZ C; TUSTANOWSKI J; OCHUDLO S; GORZKOWSKA A; TYRPA J. Apolipoprotein E gene polymorphism, total plasma cholesterol level and Parkinson disease dementia. **Arch Neurol.**, v. 64, p. 261-265, 2007.

JELLINGER K A; JANETZKY B; ATTEMS J; KIENZL E. Biomarkers for early diagnosis of Alzheimer disease: ALZheimer ASsociated gene – a new blood biomarker? **J. Cell. Mol. Med.**, v. 12, p. 1094-1117, 2008.

JOOP K; BERCKMANS R J; NIEUWLAND R; BERKHOUT J; ROMIJN F P; HACK C E et al. Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms. **Thromb Haemost**, v. 85, p. 810-20, 2001.

JORST B C; GROSSBERG G T. The natural history of Alzheimer's disease: a brain bank study. **J Am Geriatr Soc**; v. 43, p. 1248–1255, 1995.

KAGEYAMA M et al. Relationship between genetic polymorphism, serum folate and homocysteine in Alzheimer's disease. **Asia Pac. J. Public Health**. v. 20, p.111-7, 2008.

KAR S; SLOWIKOWSKI S P M; WESTAWAY D; MOUNT H T J. Interactions between β amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. **J. Psychiatry Neurosci.**, v. 29 (6), p. 427 – 441, 2004.

KAWANO M; KAWAKAMI M; OTSUKA M. Marked decrease of plasma apolipoprotein AI and AII in Japanese patients with late-onset non-familial Alzheimer's disease. **Clin Chim Acta**, v. 239, p. 209-11, 1995.

KIVIPELTO M; et al. Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment a population-based study. **Neurology**, v. 56, p. 1683–1689, 2001.

KIVIPELTO M; HELKALA E L; LAAKSO M P et al. Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. **Ann Intern Med**, v. 137, p. 149-155, 2002.

KIVIPELTO M; SOLOMON A. Cholesterol as a risk factor for Alzheimer's disease epidemiological evidence. **Acta Neurol Scand Suppl.**, v. 185, p. 50-57, 2006.

KORENZYN A D. Homocysteine, Stroke and Dementia Neurology. **Stroke**; v. 33, p. 2343-2344, 2002.

KORNHUBER J. Prevention of Alzheimer's disease. **Fortschritte neurologie: psychiatrie**, v. 73(6), p. 315-316, 2005.

KOSCHINSKY M L. Lipoprotein(a) and the link between atherosclerosis and thrombosis. **Can J Cardio**, v. 20, p. 37B-43B, 2004.

KOSUNE N; TALASNIE M; LIE HTOVIRTA M et al. Relation of coronary atherosclerosis and apolipoprotein E genotypes in Alzheimer patients. **Stroke**, v. 26, p. 743-8, 1995.

KREMPLER F; KOSTNER G M; BOLZANO K et al. Lipoprotein(a) is not a metabolic product of other lipoproteins containing apolipoprotein B. **B Bioch Bioph Acta**; v. 575, p. 63-70, 1979.

KURIYAMA M; TAKAHASHI K; YAMANO T. Low levels of serum apolipoprotein A I and A II in senile dementia. **J Psychiatry Neurol**, v. 48, p. 589-93, 1994.

LAWSON C; AINSWORTH M; YACOUB M; ROSE M. Ligation of ICAM-1 on endothelial cells leads to expression of VCAM-1 via a nuclear factor-kB-independent mechanism. **J Immunol**, v. 162, p. 2990-6, 1999.

LEDUC V; JASMIN-BÉLANGER S; POIRIER J. APOE and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease. **Trends Mol Med.**, v.16, n. 10, 2010.

LEPARA O, VALJEVAC A, ALAJBEGOVIĆ A, ZAĆIRAGIĆ A, NAKAS-ÍĆINDIĆ E. Decreased serum lipids in patients with probable Alzheimer's disease. **Bosn J Basic Med Sci.**; v. 9(3), p. 215-20, 2009.

LOCASCIO JJ *et al.* Plasma amyloid {beta}-protein and C-reactive protein in relation to the rate of progression of Alzheimer disease. **Arch Neurol**, v. 65, p. 776–785, 2008.

LOPES M A; BOTTINO C M C. Prevalência de demência em Diversas regiões do mundo - Análise dos estudos epidemiológicos de 1994 a 2000. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 60(1), p. 61-69, 2002.

LOVESTONE S; MCLOUGHLIN D M. Protein aggregates and dementia: is there a common toxicity? **J. Neurol. Neurosurg Psychiatry**. v. 72, p. 152– 161, 2002.

LUCATELLI J F; BARROS A C; MALUF S W; ANDRADE F M. Influência genética sobre a doença de Alzheimer de início precoce. **Rev Psiq Clín**. v. 36, p. 25-30, 2009.

LYKETSOS C G; LOPEZ O; JONES B; FITZPATRICK A L; BREITNER J; DEKOSKY S. Prevalence of neuropsychiatric symptoms in dementia and mild cognitive impairment: results from the cardiovascular health study. **JAMA**, v. 288(12), p. 1475-83, 2002.

MAGAKI S, MUELLER C, DICKSON C, KIRSCH W. Increased production of inflammatory cytokines in mild cognitive impairment. *Experimental Gerontology*, v. 42, p. 233–240, 2007.

MAHLEY W . Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. **Science**, v. 240, p. 622-30, 1988.

MARCOVINA S M; KOSCHINSKY M L; ALBERT J J *et al.* Report of The National Heart, Lung and Blood Institute Workshop on Lipoprotein(a) and Cardiovascular Disease: recent advances and future directions. **Clin Chem**; v. 49, p. 1.785-1.796, 2003.

MAYEUX R; SAUDERS A M; SHEA S. Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of alzheimer's disease . **N. Engl. Med**, v. 338, p. 1325, 1998.

MCGEER E G; MCGEER P L. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer Disease. **Experimental Gerontology**. v. 33, p. 371–378, 1998.

MCKHANN G M; KNOPMAN D S; CHERTKOW H et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recomedations from the National Institute on Aging and Alzheimer's Association workgroup. **Alzheimer's & Dementia**. In press, p. 1–7, 2011.

MESRI M; ALTIERI D C. Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. **J Immunol**, v. 161, p. 4382-7; 1998.

MIELKE MM, ZANDI PP, SJOGREN M. High total cholesterol levels in late life associated with a reduced risk of dementia. **Neurology** 2005; 64:1689.

MILIONIS J, ANTHONY F W. Lipoprotein (a) and stroke. **J Clin Pathol**; v. 53, p. 487-496, 2000.

MILLER J W. Homocisteine, Alzheimer Disease, and Cognitive Function. **Nutrition**; v.16, p. 675-677, 2000.

MOOSER V. Lipoprotein(a) in Alzheimer atherosclerosis. **Rev Med Suisse romande**, v. 120, p. 903-906, 2000.

MORAES E N. Princípios Básicos de Geriatria e Gerontologia. Belo Horizonte: Coopmed. 700 p. 2008.

MORRIS J C, HEYMAN A, MOHS R C, et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's disease (CERAD): Part 1. Clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. **Neurology**; v. 39, p. 1159-1165, 1989.

MULNARD R A; COTMAN C W; KAWAS C et al. Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer disease: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 283, p. 1007-1015, 2000.

MUNOZ D G; FELDMAN H. Causes of Alzheimer's disease. **CMAJ**, v. 162, p. 65-72, 2000.

MUNOZ D G; HACHINSKI V; MERSKEY H; DEL-SER T. Education and dementia: perspectives from pathology. **J Neuropathol Exp Neurol**; v. 56, p.578, 1997.

NAGAI M; HOSHIDE S; KARIO K. Hypertension and Dementia. **Am J Hypertens**; v. 23, p. 116-124, 2010.

NALBANTOGLU J; GILFIX BM, BERTRAND P et al. Predictive value of apolipoprotein E genotyping in Alzheimer's disease: results of an autopsy series and an analysis of several combined studies. **Ann Neurol**, v. 36, p. 889-95, 1994.

NIEUWLAND R; BERCKMANS R J; MCGREGOR S; BOING A N; ROMIJN F P; WESTENDORP R G et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. **Blood**; v. 95, p. 930-5, 2000.

NITRINI R; CARAMELLI P; BOTTINO C M C; DAMASCENO B P; DOZZI BRUCKI S M; ANGHINAH R. Diagnóstico de Doença de Alzheimer no Brasil avaliação cognitiva e funcional. **Arq Neuropsiquiatr** ,v. 63, p. 720-727, 2005.

NIXON R A; WEGIEL J; KUMAR A; YU W H; PETERHOFF C; CATALDO A; CUERVO A M. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immunoelectron microscopy study. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** V. 64, p. 113-122, 2005.

NIXON R. A. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. ***Journal of Cell Science*** v. 120, p. 4081-4091, 2007.

NOMURA S; TANDON N N; NAKAMURA T; CONE J; FUKUHARA S; KAMBAYASHI J. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. ***Atherosclerosis***; v. 158, p. 277-87, 2001.

NOTKOLA I L; SULKAVA R; PEKKANEN J et al. Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. ***Neuroepidemiology***, v. 17(1), p. 14–20, 1998.

OJOPI E P B; BERTONCINI A B.; DIAS NETO E. Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer. ***Rev. Psiq. Clín.*** v. 31, p. 26-33, 2004.

OULHAJ A; REFSUM H; BEAUMONT H; WILLIAMS J; KING E; JACOBY R; SMITH A D. Homocysteine as a predictor of cognitive decline in Alzheimer's disease. ***Int J Geriatr Psychiatry***; v.25, p. 82–90, 2010.

PACKARD C J; SHEPHERD J. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. ***Arterioscler Thromb Vasc Biol***, v. 17, p. 3542–56, 1997.

PADOVANI A; BORRONI B; COLCIAGHI F; PASTORINO L; ARCHETTI S; COTTINI E; CAIMI L; CATTABENI F; DI LUCA M. Platelet amyloid precursor protein forms in AD: a peripheral tool and a pharmacological target. ***Mechanisms of Ageing and Development***. V. 122, p.1997 – 2004, 2001.

PANZA F; SOLFRIZZI V; D'INTRONO A; CAPURSO C; COLACICCO A M; TORRES F; ALTOMARE E; CAPURSO A. Genetics of late-onset Alzheimer's disease: vascular risk and beta-amyloid metabolism. ***Recenti Prog Med***, v. 9, p. 489-97, 2002.

PAPPOLLA M A; BRYANT-THOMAS T K; HERBERT D et al. Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. **Neurology**. V. 61, p. 199-205, 2003.

PAPPOLLA M A; SMITH M A; BRYANT-THOMAS T et al. Cholesterol, oxidative stress, and Alzheimer's disease: expanding the horizons of pathogenesis. **Free Radic Biol Med**. V. 33, p. 173-181, 2002.

PEILA R. et al. Joint effect of the APOE gene and midlife systolic blood pressure on late-life cognitive impairment: the Honolulu–Asia aging study. **Stroke**, v. 32, p. 2882–2889, 2001.

PETERSEN R C; STEVENS J C; GANGULI M. et al. Practice parameter: early detection of dementia: Mild cognitive impairment (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology**, v. 56, p. 1133-1142, 2001.

PFEIFFER C M; HUFF L D; GUNTER W. Rapid and Accurate HPLC Assay for Plasma Total Homocysteine and Cysteine in a Clinical Laboratory Setting. **Clinical Chemistry**, v. 45, p.290-292, 1999.

POIRIER J. Apolipoprotein E and cholesterol metabolism in the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. **TRENDS in Molecular Medicine**, v.9, 2003.

POIRIER J. et al. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. **Lancet**, v. 342, p. 697–699, 1993.

REFSUM H; SMITH DA; UELAND PM; NEXO E; CLAKE R; McPARTLIN J, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: na expert opinion. **Clin Chem**; v. 50, p. 3-32, 2004.

REFSUM H; UELAND P M; NYGARD O; VOLLSET S E. Homocysteine and cardiovascular disease. **Annu Rev Med**; v. 49. p. 31-62; 1998.

REGAN C *et al.* Relationship of vascular risk to the progression of Alzheimer disease. **Neurology**, v. 67, p. 1357–1362, 2006.

REITZ C, TANG MX, LUCHSINGER J. Relation of plasma lipids to Alzheimer disease and vascular dementia. **Arch Neurol**; v. 61, p. 705-14, 2004.

REITZ C, TANG MX, MANLY J, SCHUPF N, MAYEUX R, LUCHSINGER JA. Plasma lipid levels in the elderly are not associated with the risk of mild cognitive impairment. **Dement Geriatr Cogn Disord.**, v. 25(3), p. 232-237, 2008.

RENTZOS M; MICHALOPOULOU M; NIKOLAOU C; CAMBOURI C; ROMBOS A; DIMITRAKOPOULOS A; KAPAKI E; VASSILOPOULOS D. Serum Levels of Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 and Soluble Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1 in Alzheimer's Disease. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**. v. 17, 2004.

RESUMO das IV diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 88, supl. 1, p. 1-18, 2007.

RIBEIRO A Q; ROZENFELD S; KLEIN C H; CÉSAR C C; ACURCIO F A. Inquérito sobre o uso de medicamentos por idosos aposentados, Belo Horizonte, MG. **Rev. Saúde Pública**, v.42, São Paulo, 2008.

RIFAI N; BACHORIK P S; ALBERTS J J. lipids, lipoprotein, and apolipoprotein. In: BurtisCA, Ashwood Er (ED). **Tietz - Textbook of clinical chemistry**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, p.809-861, 1999.

RITCHIE K; LOVESTONE S. The dementias. **Lancet**, v. 360, p. 1759-1766; 2002.

SACHDEV P. Homocisteína e transtornos psiquiátricos. **Rev. Bras. Psiquiatr**, v. 26, p. 50-6, 2004.

SAMAIA H P B; VALLADA FILHO H P. Aspectos genéticos da Doença de Alzheimer. **Revista Psiquiatr. Clínica** (São Paulo), v. 27, p. 104 -110, 2000.

SBC (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA). III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretrizes de Prevenção da Aterosclerose. **Arq Brás Cardiol**, v. 77, p. 1- 48, 2001.

SCHACHTER F; FAURE-DELANEF L; GUENOT F et al. Genetic associations with human longevity at the Apo E and ACE loci. **Nature Genet**, v. 6: p. 29-33, 1994.

SCHACHTER M. Lipoprotein(a) and cardiovascular risk. **Int J Cardiol**, v. 74, p. 169-170, 2000.

SCHIAVO M; LUNARDELLI A; OLIVEIRA J R. Influência da dieta na concentração sérica de triglicerídeos. **J Bras Patol Med Lab**, v. 39, n. 4, p. 283-288, 2003.

SELKOE DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiol Ver.**; v. 81(2), p. 741-66, 2001.

SERENIKI A; VITAL M A B F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e Farmacológicos. **Rev Psiquiatr RS**. v. 30, 2008.

SEVUSH S et al. Platelet activation in Alzheimer disease. **Arch. Neurol**. v. 55, p. 530-6, 1998.

SHARP D S; BURCHFIEL C M; RODRIGUEZ B L. Apolipoprotein A-1 predicts coronary heart disease only at low concentrations of high-density lipoprotein cholesterol: an epidemiological study of Japanese-Americans. **Int J Clin Lab Res**, v. 30, p. 39-48, 2000.

SKOOG I; KALARIA R N; BRETELER M B. Vascular factors and Alzheimer disease. *Alzheimer disease and associated disorders*, v. 13, p. S106-114, 1999.

SMITH M A C. Doença de Alzheimer. *Revista brasileira de psiquiatria*, SII 3-SII 7. Genética: Suplemento II (21), 1999.

SNIDERMAN A D; BLANK D; ZAKARIAN R; BERGERON J; FROHLICH J. Triglycerides and small dense LDL: The twin Achilles heels of the Friedewald formula. *Clin. Biochem.* V. 36(7), p. 499–504, 2003.

SNOWDON D A; GREINER L H; MORTIMER J A; RILEY K P et al. Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease: the Nun Study. *JAMA*, v. 277, p. 813-7, 1997.

SOLFRIZZI V; PANZA F; D'INTRANO A; COLACICCO A M; CAPURSO C; BASILE A M; CAPURSO A. Lipoprotein(a), apolipoprotein E genotype, and risk of Alzheimer's disease. *J Neurol neurosurg Psychiatry*, v. 72, p. 732-736, 2002.

SOUZA D R; DE GODOY M R; HOTTA J; TAJARA E H; BRANDÃO A C; PINHEIRO JUNIOR S; TOGNOLA W A; DOS SANTOS J E. Association of apolipoprotein E polymorphism in late-onset Alzheimer's disease and vascular dementia in Brazilians. *Braz J Med Biol Res*, v. 36, p. 919-23, 2003.

SPARKS D L; MARTIN T A; GROSS D R; HUNSAKER J C 3rd. Link between heart disease, cholesterol, and Alzheimer's disease: a review. *Microsc Res Tech.* v. 50, p. 287-290, 2000.

STERN Y, GURLAND B, TATEMACHI TK, et al. Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *JAMA*; v. 271, p. 1004,1994.

STEWART R. Twenty-six-year change in total cholesterol levels and incident dementia: the Honolulu-Asia Aging Study. *Arch Neurol*, v. 64, p.103-10, 2007.

STRITTMATTER W J et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to b-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 90, p. 1977–1981, 1993.

TABERT M H; MANLY J J; LIU X; PELTON G H; ROSENBLUM S; JACOBS M; ZAMORA D; GOODKIND M; BELL K; STERN Y; DEVANAND D P. Neuropsychological prediction of conversion to Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. **Arch. Gen. Psychiatr.**, v. 63, p. 916– 924, 2006.

TANGNEY CC *et al.* Biochemical indicators of vitamin B12 and folate insufficiency and cognitive decline. **Neurology**, v. 72, p. 361–367, 2009.

TANZI R E & BERTRAM L. New frontiers in Alzheimer's disease genetics. **Neuron**, v. 32, p. 181–184, 2001.

TATSCH M F. Sintomas psicológicos e comportamentais em pacientes com demência de amostra representativa da comunidade de São Paulo: prevalência, relação com gravidade de demência e com estresse do cuidador [tese]. São Paulo (SP): Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

THAL L J; THOMAS R G; MULNARD R et al. Estrogen levels do not correlate with improvement in cognition. **Arch Neurol**, v. 60, p. 209-212, 2003.

TORRE J C. Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma and dialectics. **Lancet Neurology**, v. 3, p. 184-190. 2004.

TSAI M S; TANGALOS E G; PETERSEN R C et al. Apolipoprotein E: risk factor for Alzheimer disease. **Am J Hum Genet.** v. 54, p. 643-649, 1994.

TSUKAMOTO K; WATANABE Y; MATSUSHIMA T; KJNOSHJTA M; KATO H; HASHIMOTO Y; KUROKAWA K; TERAMOTO T. Determination by PCR-RFLP of

apo E genotype in a japanese population. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 121, n. 4, p. 598-602, 1992.

VALE F A C et al. Alzheimer's disease. **Lancet**, p. 368 - 387, 2006.

VAN B & MAMOTTE S. Apolipoprotein E homozygosity in young men with coronary heart disease. **Lancet** , v. 340, p.879-80, 1992.

WALLDIUS G & JUNGER I. Is there a better marker of cardiovascular risk than LDL cholesterol? Apolipoproteins B and A1- new risk factors and targets for therapy, nutrition, metabolism and cardiovascular diseases. v.17, p. 565-571. 2007.

WALLDIUS G. The APO B/APOA1 ratio is better than cholesterol ratios to estimate the balance between plasma proatherogenic and anti atherogenic lipoproteins and to predict coronary risk. **Clin. Chem. Lab. Med.**, V.42, p.1355-1363, 2004.

WEBER A A; KOPPEN H O; SCHROR K. Platelet-derived microparticles stimulate coronary artery smooth muscle cell mitogenesis by a PDGF-independent mechanism. **Thrombosis Res**; v. 98, p. 461-6, 2000.

WILTFANG J; LEWCZUK P; RIEDERER P; GRÜNBLATT E et al. Consensus Paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers of Dementia: The role of CSF and blood analysis in the early and differential diagnosis of dementia. **Rev. Psiq Clín**; v. 36(1), p. 1-16; 2009.

WINBLAD B; PALMER K; KIVIPELTO M et al. Mild Cognitive Impairment – beyond controversies, towards a consensus: report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. **Journal of Internal Medicine**, v. 256, p. 240-246, 2004.

WRAGG R E; JESTE D V. Overview of depression and psychosis in Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry*. v, 146, p.577-87, 1989.

ZAINAGHI I A; FORLENZA O V; GATTAZ W F. Abnormal APP processing in platelets of patients with Alzheimer.'s disease: correlations with membrane fluidity and cognitive decline. *Phychopharmacology.*, v. 192, p. 547 – 553, 2007.

ZAMBÓN D; QUINTANA M; MATA P et al. Higher Incidence of Mild Cognitive Impairment in Familial Hypercholesterolemia. *The American Journal of Medicine*, v. 123, 2010.

ZULIANI G; CAVALIERI M; GALVANI M; PASSARO A; MUNARI M R; BOSI C et al. Markers of endothelial dysfunction in older subjects with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia. *J. Neurol. Sci.* v. 272, p.164–170, 2008.

ZULIANI G; RANZINI M; GUERRA G; ROSSI L; MUNARI M R; ZURLO A et al. Plasma cytokines profile in older subjects with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia. *J Psychiatr Res*; v. 41, p.686–93, 2007.

9. ANEXOS

Anexo 1 - Aprovação do COEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0118.0.203.000-10

Interessado(a): Profa. Maria das Graças Carvalho
Departamento Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 22 de junho de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação de potenciais biomarcadores da Doença de Alzheimer"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - Paciente

PROJETO DE PESQUISA: “AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES NA DOENÇA DE ALZHEIMER”

Prezado Paciente,

Você está sendo convidado para participar desta pesquisa como voluntário, sem custo algum pelos exames realizados. O objetivo deste projeto é estudar potenciais marcadores em pacientes com déficit cognitivo leve e doença de Alzheimer. Este conhecimento contribuirá para o diagnóstico precoce e tratamento da doença de Alzheimer.

Se você quiser participar, poderá fazê-lo doando 15 mL de seu sangue e a primeira urina da manhã. A coleta de sangue será realizada por um profissional com capacidade técnica e experiência para estancar eventual sangramento. Será utilizado material descartável de boa qualidade, visando o êxito da coleta. Esses cuidados serão tomados porque a coleta de amostras de sangue venoso apresenta baixo risco de acidente de punção, representado principalmente por extravasamento sanguíneo subcutâneo de pequena gravidade que pode resultar em leve dor localizada e formação de pequeno hematoma.

Todos os dados gerados nessa pesquisa serão mantidos em sigilo e apenas a equipe de pesquisadores terá acesso a eles. Cada participante será identificado por um código. Seu nome e os resultados dos exames serão mantidos em segredo. Você poderá ter acesso aos resultados individuais.

Serão armazenadas amostras de DNA extraídas do sangue coletado, por um período de cinco anos, no Banco de Material Biológico do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia. Essas amostras poderão ser eventualmente utilizadas em futuras análises para avanços científicos no tratamento da doença de Alzheimer.

A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento sem afetar seu acompanhamento médico em andamento.

Se no transcorrer da pesquisa você tiver alguma dúvida, ou por qualquer outro motivo necessitar de orientações, poderá procurar um dos pesquisadores: Professora Maria das Graças Carvalho ou Gisele Santos Gonçalves no telefone (31) 3499-6881 da Faculdade de Farmácia da UFMG. Além disso, para outros esclarecimentos, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa - COEP/UFMG, situado à Av. Antonio Carlos 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, Belo Horizonte – 31270-901, telefone 3499-4592.

Ao assinar esse termo de consentimento você não está abrindo mão de seus direitos legais.

Declaro que concordo em participar como voluntário do projeto de pesquisa “AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES NA DOENÇA DE ALZHEIMER” e autorizo a doação de meu sangue, urina e amostras de DNA que serão armazenadas para eventuais futuras análises sobre a doença de Alzheimer e que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 20__

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Responsável Legal

PROJETO DE PESQUISA: “AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES NA DOENÇA DE ALZHEIMER”

Prezado Responsável Legal,

O paciente está sendo convidado para participar desta pesquisa como voluntário, sem custo algum pelos exames realizados. O objetivo deste projeto é estudar potenciais marcadores em pacientes com déficit cognitivo leve e doença de Alzheimer. Este conhecimento contribuirá para o diagnóstico precoce e tratamento da doença de Alzheimer.

Se você concordar com a participação do paciente, ele poderá participar da pesquisa doando 15mL de seu sangue e a primeira urina da manhã. A coleta de sangue será realizada por um profissional com capacidade técnica e experiência para estancar eventual sangramento. Será utilizado material descartável de boa qualidade, visando o êxito da coleta. Esses cuidados serão tomados porque a coleta de amostras de sangue venoso apresenta baixo risco de acidente de punção, representado principalmente por extravasamento sanguíneo subcutâneo de pequena gravidade que pode resultar em leve dor localizada e formação de pequeno hematoma.

Todos os dados gerados nessa pesquisa serão mantidos em sigilo e apenas a equipe de pesquisadores terá acesso a eles. Cada participante será identificado por um código. O nome do paciente e os resultados dos exames serão mantidos em segredo. Você poderá ter acesso aos resultados individuais do paciente.

Serão armazenadas amostras de DNA extraídas do sangue coletado, por um período de cinco anos, no Banco de Material Biológico do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia. Essas amostras poderão ser eventualmente utilizadas em futuras análises para avanços científicos no tratamento da doença de Alzheimer.

A sua autorização da participação do paciente neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar a participação do paciente a qualquer momento sem afetar seu acompanhamento médico em andamento.

Se no transcorrer da pesquisa você tiver alguma dúvida, ou por qualquer outro motivo necessitar de orientações, poderá procurar um dos pesquisadores: Professora Maria das Graças Carvalho ou Gisele Santos Gonçalves no telefone (31) 3499-6881 da Faculdade de Farmácia da UFMG. Além disso, para outros esclarecimentos, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa - COEP/UFMG, situado à Av. Antonio Carlos 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, Belo Horizonte – 31270-901, telefone 3499-4592.

Ao assinar esse termo de consentimento você e o paciente não estarão abrindo mão de seus direitos legais.

Declaro que concordo que o paciente participe como voluntário do projeto de pesquisa “AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES NA DOENÇA DE ALZHEIMER” e autorizo a doação de seu sangue, urina e amostras de DNA que serão armazenadas para eventuais futuras análises sobre a doença de Alzheimer e que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 20__

Nome do paciente: _____

Nome do responsável legal: _____

Assinatura do responsável legal: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - Controle

PROJETO DE PESQUISA: "AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES NA DOENÇA DE ALZHEIMER"

Prezado Paciente,

Você está sendo convidado para participar desta pesquisa como voluntário no grupo controle, sem custo algum pelos exames realizados. O objetivo deste projeto é estudar potenciais marcadores em pacientes com déficit cognitivo leve e doença de Alzheimer. Este conhecimento contribuirá para o diagnóstico precoce e tratamento da doença de Alzheimer.

Se você quiser participar, poderá fazê-lo doando 15 mL de seu sangue e a primeira urina da manhã. A coleta de sangue será realizada por um profissional com capacidade técnica e experiência para estancar eventual sangramento. Será utilizado material descartável de boa qualidade, visando o êxito da coleta. Esses cuidados serão tomados porque a coleta de amostras de sangue venoso apresenta baixo risco de acidente de punção, representado principalmente por extravasamento sanguíneo subcutâneo de pequena gravidade que pode resultar em leve dor localizada e formação de pequeno hematoma.

Todos os dados gerados nessa pesquisa serão mantidos em sigilo e apenas a equipe de pesquisadores terá acesso a eles. Cada participante será identificado por um código. Seu nome e os resultados dos exames serão mantidos em segredo. Você poderá ter acesso aos resultados individuais.

Serão armazenadas amostras de DNA extraídas do sangue coletado, por um período de cinco anos, no Banco de Material Biológico do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia. Essas amostras poderão ser eventualmente utilizadas em futuras análises para avanços científicos no tratamento da doença de Alzheimer.

A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento sem afetar seu acompanhamento médico em andamento.

Se no transcorrer da pesquisa você tiver alguma dúvida, ou por qualquer outro motivo necessitar de orientações, poderá procurar um dos pesquisadores: Professora Maria das Graças Carvalho ou Gisele Santos Gonçalves no telefone (31) 3499-6881 da Faculdade de Farmácia da UFMG. Além disso, para outros esclarecimentos, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa - COEP/UFMG, situado à Av. Antonio Carlos 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, Belo Horizonte – 31270-901, telefone 3499-4592.

Ao assinar esse termo de consentimento você não está abrindo mão de seus direitos legais.

Declaro que concordo em participar como voluntário do projeto de pesquisa "AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES NA DOENÇA DE ALZHEIMER" e autorizo a doação de meu sangue, urina e amostras de DNA que serão armazenadas para eventuais futuras análises sobre a doença de Alzheimer e que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 20__

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____



QUEM
SE PREPARA,
NÃO PARA.

DECLARAÇÃO

DECLARAMOS, para instruir no Curriculum Vitae, que o artigo intitulado “ALELO ϵ 4 DA APOLIPOPROTEÍNA E: fator de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer”, submetido pela autora **GISELE SANTOS GONÇALVES** foi aceito para publicação na 6ª Edição da revista eletrônica do Programa de Pós-Graduação do Centro Universitário Newton Paiva – Pós em Revista - ISSN: 2176-7785.

Belo Horizonte, 04 de outubro de 2012

RDRocha

Roberta Dias Rodrigues Rocha

Editora geral da Pós em Revista - ISSN: 2176-7785
Centro Universitário Newton Paiva



Anexo 4 – Artigo 1 – Publicado na Revista da Pós-Graduação Newton Paiva

ALELO ϵ 4 DA APOLIPOPROTEÍNA E: *fator de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer*

Gisele Santos Gonçalves – MSc

Vivian Proença Lara – Farmacêutica

Arthur Gonçalves Assini - Farmacêutico

Ana Paula Fernandes - PhD

Karina Braga Gomes - PhD

Josianne Nicácio Silveira - PhD

Maria das Graças Carvalho - PhD

Resumo: A doença de Alzheimer (DA) é um problema de saúde pública em razão do envelhecimento populacional, cujo desenvolvimento está relacionado a fatores genéticos e ambientais. Até o momento, uma das principais alterações moleculares associadas com o estabelecimento da DA consiste no polimorfismo da apolipoproteína E (ApoE). Existem três alelos principais do gene *ApoE* chamados de ϵ 2, ϵ 3 e ϵ 4. O alelo da *ApoE* ϵ 4 é mais frequentemente encontrado em pacientes com DA, quando comparado com indivíduos saudáveis, tendo sido associado com maior risco da doença, com idade menor para início dos sintomas em ambas as formas familiar e esporádica e com maior déficit cognitivo. No entanto, cabe ressaltar que a variante ϵ 4 do gene *ApoE* é um fator de risco e não uma causa determinante de DA. Dessa forma, existem indivíduos que possuem os dois alelos de *ApoE* na forma ϵ 4 e não apresentam DA, como também indivíduos que apresentam apenas alelos ϵ 2 ou ϵ 3, e encontram-se acometidos pela DA.

Palavras-chave: doença de Alzheimer. apolipoproteína E. demência. genética.

Introdução

Nos últimos anos, o Brasil vem apresentando um novo padrão demográfico que se caracteriza pela redução da taxa de crescimento populacional e por transformações profundas na composição de sua estrutura etária, com um significativo aumento do contingente de idosos (IBGE). Juntamente com o envelhecimento populacional, aumenta a prevalência de doenças intimamente relacionadas à senescência, como as coronariopatias, as neoplasias, a osteoporose e as demências (APRAHAMIAN et al., 2009).

A demência é uma síndrome caracterizada pela perda ou déficit das habilidades cognitivas, como memória e linguagem, por mudanças comportamentais e por um declínio significativo na realização de atividades diárias (DESAI et al, 2010). Dentre as diversas causas de demência, a Doença de Alzheimer (DA) é a principal, sendo responsável por, pelo menos, metade dos casos.

A DA é considerada um distúrbio poligênico e multifatorial. Diversos genes têm sido associados à doença, como o gene da proteína precursora amilóide (APP) e das presenilinas 1 e 2 (PS1 e PS2), com grande importância nos casos de DA familiar. No entanto, é o gene da apolipoproteína E (*ApoE*), que codifica uma glicoproteína envolvida no metabolismo e transporte de lipídios no organismo, que tem sido relatado como o principal fator de risco genético para a doença de instalação tardia, particularmente nos indivíduos que possuem o alelo $\epsilon 4$ (OJOPI et al, 2004; CACABELOS, 2007a). O alelo $\epsilon 4$ foi encontrado com uma frequência de 39% em portadores da DA, valor cerca de quatro vezes maior que o encontrado nos indivíduos saudáveis no sul do Brasil (DE-ANDRADE et al., 2000).

Outros fatores de risco para a DA, comumente citados na literatura, são idade avançada, história familiar de demência, sexo feminino, síndrome de Down e os fatores de risco para a doença cardiovascular, como hipertensão arterial, diabetes mellitus, dislipidemia e tabagismo (MUNOZ & FELDMAN, 2000).

Diante desse contexto, torna-se fundamental o conhecimento de fatores genéticos e ambientais potencialmente associados ao desenvolvimento da DA, a fim de que sejam identificados precocemente os indivíduos sob risco de desenvolvimento da doença ou mesmo para a adoção de medidas profiláticas

cabíveis visando retardar o aparecimento da mesma. Muita atenção deve ser prestada aos fatores de risco ambientais, uma vez que estes podem ser modificados, o que reverterá indubitavelmente em algum benefício às pessoas que apresentam a predisposição genética.

A genética da Doença de Alzheimer

A etiologia da DA é multifatorial, devido a uma complexa combinação de fatores genéticos, pessoais e ambientais. Na sua forma familiar, é transmitida sob um padrão de herança autossômico dominante, mas a forma familiar representa apenas 5% dos casos. Aproximadamente 50% das pessoas com história familiar de DA acabam por desenvolver a doença. Os casos hereditários têm tendência para se manifestarem particularmente cedo, na meia-idade, e não na velhice. Contudo, a patologia é indistinguível clinicamente dos casos esporádicos. Apesar dos casos hereditários e dos esporádicos terem origem nos mesmos processos biológicos, a ocorrência de mutações pode provocar acelerações na patogênese (MONTE et al, 1997).

Do ponto de vista anatomopatológico, os achados na DA incluem perda neuronal com atrofia cerebral; degeneração sináptica; placas neuríticas (ou senis) contendo depósitos extracelulares de proteína beta-amilóide ($A\beta$), originados da clivagem anormal da proteína precursora beta-amilóide (APP); além de emaranhados neurofibrilares localizados normalmente no citoplasma perinuclear e composto de proteínas “tau” anormalmente fosforiladas (SAMAIA & VALLADA FILHO, 2000; BARROS et al., 2009).

Segundo a hipótese da cascata amiloidal, a APP é uma proteína transmembrana que sofre clivagem por α -, β - e γ -secretases, produzindo o fragmento peptídico $A\beta$, cuja forma mais comum é um fragmento de 40 aminoácidos. A neurodegeneração na DA é causada pela clivagem proteolítica anormal da APP, determinada por β - e γ -secretases, que favorecem a produção de um fragmento de 42 aminoácidos. Esse fragmento apresenta maior capacidade de agregação e deposição na parte extracelular dos neurônios, levando conseqüentemente à formação de fibras amilóides e placas senis (LUCATELLI et al, 2009; BEKRIS et al, 2010). Além disso, ocorre a formação de novelos neurofibrilares, que consistem em filamentos helicoidais da proteína *tau* hiperfosforilada que se acumulam no citoplasma neuronal

(MUNOZ & FELDMAN, 2000). A função normal dessa proteína é estabilizar os microtúbulos neurais, papel que, na DA, estaria prejudicado (PARIHAR & TARUNA, 2004; RUDY et al, 2010).

Já segundo a hipótese colinérgica, a DA ocorre devido à degeneração dos neurônios colinérgicos no prosencéfalo basal e déficit dos marcadores colinérgicos devido à: inibição da liberação de acetilcolina, redução da captação da colina, e diminuição da concentração intracelular de acetilcolina e da atividade da colina acetiltransferase. O declínio da neurotransmissão colinérgica resultante desses fatores causa deterioração da função cognitiva e manifestações neuropsiquiátricas da doença (AULD et al, 2002).

O gene da Apolipoproteína E

O gene humano *ApoE*, localizado no braço longo do cromossomo 19 (19q13.2), codifica uma glicoproteína de 317 aminoácidos, que constitui uma das muitas classes de apolipoproteínas que transportam lipídios no plasma e em outros fluidos corpóreos. Seu papel é fundamental na redistribuição de triglicerídios e de colesterol em diferentes tecidos (OJOPI et al, 2004). Esse gene é composto de três alelos comuns ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$). Esses alelos são definidos por 2 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos resíduos 7412 e 429358 (BARBER, 2010; BEKRIS et al, 2010).

As isoformas protéicas produzidas por esses alelos diferem na composição de aminoácidos nas posições 112 e/ou 158. O alelo $\epsilon 2$ possui o aminoácido cisteína em ambas as posições da proteína; o $\epsilon 3$, cisteína na posição 112 e arginina na 158 e o alelo $\epsilon 4$ possui arginina nas duas posições (OJOPI et al, 2004). Essa substituição cisteína-arginina afeta a estrutura tridimensional e as propriedades de ligação aos lipídios entre as isoformas (BERKIS et al, 2010).

A ApoE é também a principal apolipoproteína encontrada no cérebro (OJOPI et al, 2004). Ela coordena a mobilização e a redistribuição do colesterol da mielina e das membranas neuronais (LEDUC et al, 2010). Além disso, está envolvida no reparo sináptico em resposta à injúria tecidual, na manutenção da estrutura neuronal e na função colinérgica (MUNOZ & FELDMAN, 2000).

As combinações dos três alelos dão origem a seis genótipos diferentes e sua frequência varia entre diferentes grupos étnicos. O alelo mais comumente encontrado na população caucasiana é $\epsilon 3$, correspondendo a aproximadamente 78% dos indivíduos. A frequência dos alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 4$ é aproximadamente de 8% e de 14%, respectivamente na mesma população (MUNOZ & FELDMAN, 2000).

Um estudo feito na região sul do Brasil identificou uma forte associação entre ApoE $\epsilon 4$ e DA, tendo sido o alelo $\epsilon 4$ encontrado com uma frequência de 39% em portadores da DA, valor cerca de quatro vezes maior que o encontrado nos indivíduos saudáveis da mesma localidade (DE-ANDRADE et al., 2000). Outro estudo com 126 indivíduos brasileiros (SOUZA et al., 2003) mostrou que a frequência do alelo $\epsilon 2$ foi consideravelmente menor no grupo de pacientes com DA (1%; n = 68); as frequências do alelo ApoE $\epsilon 3$ e do genótipo ApoE $\epsilon 3/\epsilon 3$ foram maiores nos controles (84% e 72%, respectivamente; n = 58), enquanto as frequências do alelo ApoE $\epsilon 4$ e do genótipo ApoE $\epsilon 3/\epsilon 4$ foram maiores nos indivíduos com DA (25% e 41%, respectivamente).

Independentemente da etnia, o alelo $\epsilon 4$ é mais frequentemente encontrado em pacientes com DA, quando comparado ao grupo controle, tendo sido associado a um maior risco do desenvolvimento da doença, com idade menor para início dos sintomas em ambas as formas familiar e esporádica e com maior déficit cognitivo (DURON & HANON, 2008; BEKRIS et al, 2010).

A presença do alelo $\epsilon 4$ demonstrou uma maior associação com o número de placas senis e placas vasculares, além de uma redução da função colinérgica em cérebros de pacientes portadores de DA (SAMAIA & VALLADA FILHO 2000; OJOPI et al., 2004). Além disso, os portadores do alelo $\epsilon 4$, conforme dito anteriormente, tendem a desenvolver os sintomas de DA mais precocemente, efeito ainda mais evidente nos homocigotos. Em contraste, o alelo $\epsilon 2$ pode conferir um discreto efeito protetor porque sua frequência é menor entre indivíduos com DA quando comparado à população geral, mas este resultado não tem se reproduzido sistematicamente. Quando indivíduos com alelos $\epsilon 2/\epsilon 3$ apresentam DA, a idade de início é mais avançada que nos carreadores de $\epsilon 4$ (TSAI et al., 1994; OJOPI et al., 2004; VALE, 2006; SERENIKI & VITAL, 2008; HUEB, 2009).

Estudos epidemiológicos demonstraram que, em indivíduos com DA, a frequência do alelo $\epsilon 4$ é desproporcionalmente elevada, com valores geralmente situados entre 25% e 40%. Pessoas com um alelo $\epsilon 4$ têm entre 2,2 e 4,4 mais chance de desenvolver DA que pessoas com alelos $\epsilon 3/\epsilon 3$, enquanto os homocigotos para o alelo $\epsilon 4$ têm de 5,1 a 34,3 maior chance (FARRER et al, 1997; OJOPI et al., 2004; VALE, 2006; SERENIKI & VITAL, 2008; HUEB, 2009).

Schachter e colaboradores (1994) demonstraram que pessoas que possuem o alelo $\epsilon 2$ têm maior probabilidade de se tornarem centenárias que aquelas com o alelo $\epsilon 3$, que, por sua vez, parecem ter maior sobrevivência que pessoas com o alelo $\epsilon 4$.

Os mecanismos pelos quais o alelo $\epsilon 4$ poderia influenciar na patologia da DA são incertos. No entanto, têm sido sugeridos: atuação no metabolismo da APP e no acúmulo do peptídeo A β em placas senis e vasculares, aumento da hiperfosforilação da proteína *tau* e formação de novos neurofibrilares, redução da função colinérgica cerebral, aumento de processos oxidativos, inflamatórios ou de apoptose neuronal e alteração do metabolismo e do transporte lipídicos, assim como da biossíntese de membranas neuronais (CORDER et al., 1998; CZYZEWSKI et al., 1998; CACABELOS, 2007b; DURON & HANON, 2008).

Além da influência exercida na DA, essas isoformas têm sido relacionadas com os níveis plasmáticos de lipídios e com o risco de doença cardiovascular, sendo que os alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 4$ frequentemente têm exercido efeitos opostos (DE-ANDRADE et al, 2000). O alelo $\epsilon 4$ tem sido associado com altos níveis plasmáticos de colesterol total e de LDL, ambos considerados fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose. É também provável que esse polimorfismo influencie o desenvolvimento de demência por meio de processos neurodegenerativos e de aterogênese (JASINSKA-MYGA et al, 2007).

Um estudo realizado por de-Andrade e colaboradores (2000) no sul do Brasil demonstrou a associação do alelo $\epsilon 2$ com baixos níveis de triglicérides e de colesterol total e não-HDL em homens e mulheres. Inversamente, o alelo $\epsilon 4$ foi associado com altos níveis desse lipídio, mas a relação só foi observada em mulheres.

A contribuição da presença do alelo $\epsilon 4$ no desenvolvimento da DA está presente em ambos os sexos, etnias e em todas as idades, embora a força de associação pode variar dependendo destes fatores (MUNOZ & FELDMAN 2000). A idade possui um papel particularmente importante no desenvolvimento de DA, uma vez que o risco de desenvolver a doença parece aumentar com a idade até certo ponto, a partir do qual cai vertiginosamente. A presença de dois alelos $\epsilon 4$ é responsável por uma grande diminuição na idade de início da doença, enquanto que a presença de apenas um alelo $\epsilon 4$ é responsável por uma diminuição menos acentuada (PANZA et al., 2002). Um estudo recente avaliou o grau de risco conferido pelos diferentes genótipos de apoE entre indivíduos da mesma faixa etária. Os resultados mostram que indivíduos com idade de 80 anos que apresentam $\epsilon 3/\epsilon 4$ possuem uma taxa de incidência de DA aumentada em 3,4 vezes em relação a indivíduos $\epsilon 3/\epsilon 3$. Indivíduos que são $\epsilon 4/\epsilon 4$ possuem taxa de incidência aumentada 9,4, enquanto os que possuem a isoforma $\epsilon 2$ apresentam redução de 43% no risco apresentado por um indivíduo $\epsilon 3/\epsilon 3$, sugerindo um papel protetor do alelo $\epsilon 2$ (EWBANK, 2002).

Diversos estudos confirmam que a simples presença da isoforma $\epsilon 4$ de ApoE não é suficiente para o desenvolvimento da DA. No entanto, os alelos da apoE são fatores importantes que, de acordo com sua variação, têm o efeito de induzir ou proteger contra a doença no processo de instauração da doença. Neste sentido, alguns grupos vêm estudando o papel dos polimorfismos da região promotora do gene *ApoE* e sua influência no desenvolvimento da DA. Polimorfismos na região promotora dos genes podem alterar a sua transcrição, gerando diferentes quantidades do RNA mensageiro e da respectiva proteína. Na região promotora do gene da apoE, já foram identificados polimorfismos nas regiões -219 G/T, -427 C/T e -491 A/T (OJOPI et al., 2004).

Embora o estudo da genética da DA já esteja avançado, muitas lacunas ainda existem sobre os seus mecanismos de instauração, desenvolvimento e fatores de risco associados, quer sejam eles genéticos ou ambientais. Os futuros avanços e achados da genética poderão ser utilizados no diagnóstico precoce da doença, no seu tratamento ou mesmo na elaboração de estratégias de prevenção. Deve-se ressaltar que há um consenso na comunidade científica: a determinação das isoformas de ApoE ainda é insuficiente como método diagnóstico.

Considerações finais

A Doença de Alzheimer (DA) está relacionada a alguns fatores genéticos, sendo a associação com os polimorfismos da apolipoproteína E (ApoE) bem caracterizada em várias populações. A presença do alelo $\epsilon 4$ é um fator de risco para o desenvolvimento da doença. Seja qual for o mecanismo pelo qual a presença de $\epsilon 4$ leva ao desenvolvimento da DA, ao menos um ponto já está claramente estabelecido: indivíduos carreadores do alelo $\epsilon 4$ apresentam risco aumentado de desenvolvimento da doença. Entretanto, algumas questões sobre seus efeitos neurotóxicos ainda precisam ser comprovadas, podendo-se destacar o papel específico da ApoE na formação de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares. Porém, deve-se enfatizar que a variante $\epsilon 4$ do gene *ApoE* é um fator de risco e não uma causa determinante de DA. Existem indivíduos que possuem os dois alelos na forma $\epsilon 4$ e não apresentam DA, e também indivíduos que apresentam apenas alelos $\epsilon 2$ ou $\epsilon 3$, mas encontram-se acometidos pela doença.

Referências:

1. APRAHAMIAN, I.; MARTINELLI, J. E.; YASSUDA, M. S. *Doença de Alzheimer: revisão da epidemiologia e diagnóstico*. **Revista Brasileira Clínica Médica**, v.7, p. 27-35, 2009.
2. AULD, D. S.; KORNECOOK, T. J.; BASTIANETTO, S.; QUIRION, R. *Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition and treatment strategies*. **Progress Neurobiology**, v. 68, n. 3, p. 209-245, 2002.
3. BARBER, R. C. *Biomarkers for early detection of Alzheimer disease*. **The Journal of the American Osteopathic Association**, v. 110, n. 9, sup. 8, p. S10-S15, 2010.
4. BARROS, A. C., LUCATELLI, J. F., MALUF, S. W., ANDRADE, F. M. *Influência genética sobre a doença de Alzheimer de início tardio*. **Revista Psiquiatria Clínica**. v. 36; p. 16-24, 2009.
5. BEKRIS, L. M.; YU, C.E.; BIRD, T. D., TSUANG, D. W. *Genetics of AD*. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, v. 23, n. 4, p. 213-227, 2010.
6. CACABELOS, R. *Donepezil in Alzheimer's disease: from conventional trials to pharmacogenetics*. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 3, n. 3, p. 303-333, 2007a.
7. CACABELOS, R. *Pharmacogenetic basis for therapeutic optimization in Alzheimer's disease*. **Molecular Diagnosis Therapy**, v. 11, n. 6, p.385-405, 2007b.

8. CORDER, E.H.; LANNFELT, L.; BOGDANOVIC, N.; FRATIGLIONI, L.; MORI, H. *The role of APOE polymorphisms in late-onset dementias*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 54; p. 928-34, 1998.
9. CZYZEWSKI, K.; PFEFFER, A.; BARCIKOWSKA, M. *Apolipoprotein E function in the nervous system*. **Neurologia i Neurochirurgia Polska**, v. 32, p. 125-32, 1998.
10. DE-ANDRADE, F. M.; LARRANDABURU, M.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; GASTALDO, G.; HUTZ, M. H. *Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 5, p. 529-537, 2000.
11. DESAI, A. K.; GROSSBERG, G. T.; CHIBNALL, J. T. *Healthy brain aging: a road map*. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 26, p. 1-16, 2010.
12. DURON, E.; HANON, O. *Vascular risk factors, cognitive decline, and dementia*. **Vascular Health and Risk Management**, v. 4, n. 2, p. 363-381, 2008.
13. EBLY, E. M.; HOGAN, D. B.; PARHAD, I. M. *Cognitive impairment in the nondemented elderly: results from the Canadian Study of Health and Aging*. **Archives of Neurology**, v. 52, p. 612-619, 1995.
14. EWBANK, D. C. *A multistate model of the genetic risk of Alzheimer's disease*. **Experimental Aging Research**, v. 28, p. 477-499, 2002.
15. FARRER L. A.; CUPPLES L. A.; HAINES J. L.; HYMAN B.; KUKULL W. A.; MAYEUX R.; MYERS R. H.; PERICAK-VANCE M. A.; RISCH N.; VAN DUIJN C. M. *Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease*. **JAMA**, v. 278, n. 16, p. 1349-1356, 1997.
16. FRIDMAN, C.; GREGÓRIO, S. P.; OJOPI, É.P.B.; DIAS NETO, E. *Alterações genéticas na doença de Alzheimer*. **Revista Psiquiatria Clínica**, v. 31; p.19-25, 2004.
17. HUEB, Thiago Ovanessian. *Doença de Alzheimer / Alzheimer's disease*. **Revista Brasileira Medicina**, V. 65, p. 90-95, 2009.
18. IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Projeção da população do Brasil por sexo e idade – 1980-2050*. *Estudos & Pesquisas*, Rio de Janeiro, 2008. Disponível em:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2008/projecao.pdf>. Acesso em 20 Jun. 2012.
19. JASINSKA-MYGA, B.; OPALA, G.; GOETZ, C.; TUSTANOWSKI, J.; OCHUDLO, S.; GORZKOWSKA, A.; TYRPA, J. *Apolipoprotein E gene polymorphism, total plasma cholesterol level and Parkinson disease dementia*. **Archives of Neurology**, v. 64, p. 261-265, 2007.
20. LAWS, S.M.; HONE, E.; GANDY, S. et al. *Expanding the association between the APOE gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for APOE promoter polymorphisms and alterations in APOE transcription*. **Journal of Neurochemistry**, v. 84, p. 1215-36, 2003.
21. LEDUC, V.; JASMIN-BÉLANGER, S.; POIRIER, J. *APOE and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease*. **Trends in Molecular Medicine**, v.16, n. 10, 2010.
22. LUCATELLI, J. F., BARROS, A. C., MALUF, S. W., ANDRADE, F. M. *Influência genética sobre a doença de Alzheimer de início precoce*. **Revista Psiquiatria Clínica**, v. 36; p. 25-30, 2009.
23. MONTE, SM, GHANBARI K, FREY, WH. *Characterization of the AD7c-NTP e DNA expression in Alzheimer's disease and measurement of a 41-KD protein in cerebrospinal fluid*. **The Journal of Clinical Investigation**, V. 100, p. 3093 -3104, 1997.
24. MUNOZ, D. G.; FELDMAN, H. *Causes of Alzheimer's disease*. **Canadian Medical Association Journal**, v. 162, n. 1 p. 65-72, 2000.

25. OJOPI, Elida P. Benquique; BERTONCINI, Alexandre Bruno; DIAS NETO, Emmanuel. *Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer*. **Revista Psiquiatria Clínica**, v. 31, p. 26-33, 2004.
26. PANZA, F.; SOLFRIZZI, V.; D'INTRONO, A.; CAPURSO, C.; COLACICCO, A.M.; TORRES, F.; ALTOMARE, E.; CAPURSO, A. *Genetics of late-onset Alzheimer's disease: vascular risk and beta-amyloid metabolism*. **Recenti Progressi in Medicina**, v. 9, p. 489-97, 2002.
27. PARIHAR, M. S.; TARUNA, H. *Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions*. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 11, n.5, p. 456–467, 2004.
28. RUDY, J. C.; ROLSTON, R. K.; SMITH, M. A. *Alzheimer disease*. **Disease Month**, v. 56, p. 484-546, 2010.
29. SAMAIA, H. P.B. & VALLADA FILHO, H. P. *Aspectos genéticos da Doença de Alzheimer*. **Revista Psiquiatria Clínica** (São Paulo), V. 27, n. 2, p. 104 -110, 2000.
30. SCHACHTER F., FAURE-DELANEF L, GUENOT F et al. *Genetic associations with human longevity at the Apo E and ACE loci*. **Nature Genetics**, v. 6: p. 29-33, 1994.
31. SERENIKI, A., VITAL, M. A. B. F. *A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e Farmacológicos*. **Revista Psiquiatria RS**, v. 30, 2008.
32. SOUZA, D.R.; DE GODOY, M.R.; HOTTA, J.; TAJARA, E.H.; BRANDÃO, A.C.; PINHEIRO JUNIOR, S.; TOGNOLA, W.A.; DOS SANTOS, J.E. *Association of apolipoprotein E polymorphism in late-onset Alzheimer's disease and vascular dementia in Brazilians*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 919-23, 2003.
33. TSAI MS, TANGALOS EG, PETERSEN RC et al. *Apolipoprotein E: risk factor for Alzheimer disease*. **American Journal of Human Genetics**, v. 54: p. 643-649, 1994.
34. VALE, F.A.C., et al. *Alzheimer's disease*. **The Lancet**, p. 368 - 387, 2006.

**Anexo 5 – Artigo 2 – Submetido à Revista ANAIS DA ACADEMIA
BRASILEIRA DE CIÊNCIAS**

DEMENTIA, HOMOCYSTEINE AND B VITAMINS

Gisele Santos Gonçalves – MSc

Flávia Batista Pinto Coelho – Farmacêutica

Maria das Graças Carvalho - PhD

Luci Maria Sant'Ana Dusse¹ – PhD

Abstract

Early diagnosis of dementia allows identification of treatable forms, as well as to prevent and/or minimize the effects of the disease. An association between neuropsychiatric disorders and vitamin B12 deficiency, which may result in hyperhomocysteinemia, has been suggested in the literature. Several investigators have reported a better recovery of cognitive function in cases that vitamin B₁₂ supplementation was performed in patients with initial diagnosis of dementia. However, some questions about neurotoxic effects of hyperhomocysteinemia still have to be established. There are not yet enough data to prove whether vitamin B₁₂ supplementation can improve cognitive functions in subjects with dementia with reduced plasma levels of this vitamin. Randomized clinical studies with well-defined relationship to patient age, degree of dementia, onset time of symptoms, history of vascular disease, and the cutoff of homocysteine are necessary to elucidate the cause/effect relationship between hyperhomocysteinemia and dementia.

Key Words: Dementia; Alzheimer Disease; Hyperhomocysteinemia; B vitamins.

Introduction

Aging of world population is a growing phenomenon with direct implications in the public health systems. The first changes observed during the normal aging process manifest as low deficits in immediate memory. Dementia syndromes are morbidities generally degenerative and progressive, which implicate not only in major mental but also in physical and physiological disorders. Symptoms are characterized by memory reduction and other deficits in the cognitive domains as language, and visuospatial or executive functions, sufficient to interfere socially with the patient (Nitrini et al. 2005).

Dementia syndromes have achieved epidemic proportions, with an estimated number of 4,6 millions of new cases in the world each year. Among these, Alzheimer disease (AD) and ischemic cerebrovascular disease are the most important. Those syndromes are related to atherosclerosis, cerebral microvascular abnormalities and hypertension, conditions frequently associated to patients with AD and vascular disease (Caramelli and Barbosa, 2002).

Although they are strongly associated to the age, dementia syndromes are not an unavoidable part of aging, but are diseases caused by exposure to several nongenetic factors, among them, age and high plasma concentration of homocysteine (Smith 2008).

Early diagnosis of dementia is important, because it allows the identification of treatable forms, as well as to prevent and/or minimize the effects of the disease on patients and their families (Fridman et al. 2004). The obligatory laboratorial exams in the etiologic investigation of a dementia syndrome include routine blood tests, investigation of thyroid, liver and kidney functions, serological tests to syphilis, HIV and dosage of vitamin B₁₂ (Caramelli and Barbosa 2002; Aprahamian et al. 2009).

Homocysteine and its metabolism

Homocysteine is synthesized from the metabolism of methionine, essential amino acid found in meat and derived from animal products. Methionine is converted to S-adenosyl-methionine, which is demethylated to S-adenosyl-homocysteine and then hydrolyzed to adenosine and homocysteine (Scott and Weir 1988).

It is believed that excess of homocysteine in the blood, which features the hyperhomocysteinemia, may predict the formation of blood clots and fat deposits on blood vessels, contributing to the atherosclerotic processes (Gebara and Matioli 2006).

Hyperhomocysteinemia is associated to the activation and platelet aggregation, elastase activation, increase of arterial calcium deposits, formation of highly atherogenic hydroxycholesterol, degradation of polyunsaturated fatty acids, formation of lysolecithin, aldehydic modification of lysine residues, alterations in the receptors of low-density lipoproteins, increase of atheromatous plaque in large arteries, proliferation of vascular smooth muscle cells, increase of LDL oxidation and commitment of the nitric oxide bioavailability (Seshadri and Wolf 2003). Thus, hyperhomocysteinemia increases the risk of cerebral vascular accident and may have a direct neurotoxic effect that may cause cerebral lesion and neuropsychiatric disorders. Hyperhomocysteinemia also presents a potentiating effect of cardiovascular risk when associated to hypertension, smoking and diabetes mellitus (Gebara and Matioli 2006).

Complex B vitamins, including vitamin B₁₂, B₆ e B₉ (folic acid), are essential to the metabolism of homocysteine. This amino acid may be metabolized by the remethylation cycle or by the trans-sulphuration via (Figure 1).

During the remethylation, homocysteine is converted to methionine by two distinct reactions. The first occurs in the liver, where part of homocysteine is remethylated by betaine homocysteine methyltransferase, which acts as a donor of methyl group (Figure 1). The second remethylation reaction occurs in

other tissues and involves the transfer of methyl from N⁵-N¹⁰-methyltetrahydrofolate (5,10 MTHF) to vitamin B₁₂, resulting in methylcobalamin. The enzyme methionine synthase (MS) catalyzes the transfer of a methyl group to homocysteine to form methionine or methyl-homocysteine. After transferring the methyl group, methyltetrahydrofolate (MTHF) is called tetrahydrofolate (THF), which is a major substrate for synthesis of the nitrogenated base thymine, which is essential for DNA replication that precedes cell division (Figure 1) (Guerra-Shinohara et al. 2008).

Methionine is the precursor of S-adenosylmethionine (SAM), universal donor of methyl groups and important during the synthesis of creatine, phospholipids, neurotransmitters, as well as in methylation reactions of DNA and RNA (Figure 1) (Guerra-Shinohara et al. 2008; Selhub and D'Angelo 1997).

During vitamin B₁₂ deficiency, the transfer of the methyl group from MTHF does not occur. Then, there is no formation of tetrahydrofolate, which may compromise DNA synthesis (Guerra-Shinohara et al. 2008).

Vitamin B₁₂ is also active in the isomerization of L-methylmalonyl-coA to succinyl-coA. L-methylmalonyl coenzyme A mutase converts methylmalonyl-coA to succinyl-coA. This biochemical reaction possesses an important role for energy production from fat and proteins and one of the products, the succinyl-coA, is also important for the synthesis of hemoglobin (Guerra-Shinohara et al. 2008).

When the remethylation pathway is saturated or there is necessity of synthesis of cysteine, homocysteine is metabolized for the trans-sulphurated pathway, where occurs the irreversible condensation with a serine, by cystathionine β sintase (CβS), forming cystathionine. Vitamin B₆, constitutes an essential cofactor for this reaction. Subsequently, cystathionine is converted in cysteine, which is metabolized to sulfate and excreted in urine (Figure 1) (Selhub and D'Angelo 1997).

Methionine metabolism is regulated by availability of SAM. CBS enzyme is activated in the presence of SAM, which also inhibits the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), which converts 5,10 MTHF to 5-MTHF. SAM is dependent of glycine methylation that removes the excess of methyl groups and is inhibited by methyltetrahydrofolate (Guerra-Shinohara et al. 2008).

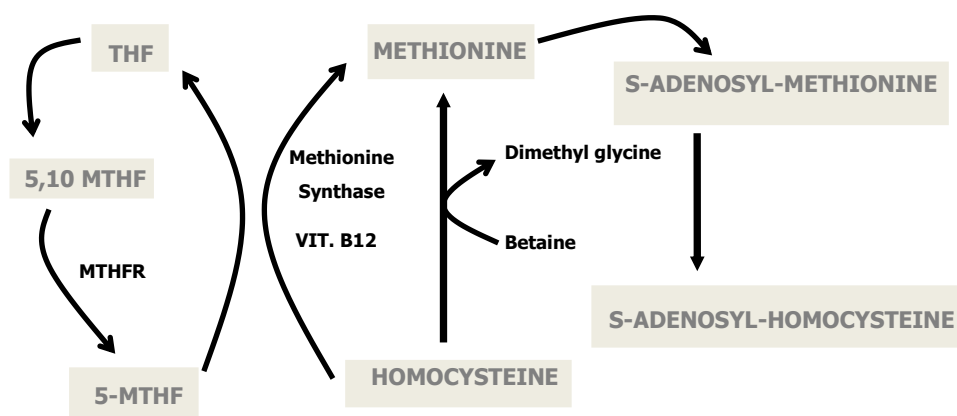


FIGURE 1: Metabolic pathways of homocysteine. THF, tetrahydrofolate; MTHF, methyltetrahydrofolate; MTHFR, methyl tetrahydrofolate reductase.

SAM is the most important donor of methyl groups in the brain and the methylation of homocysteine is related to the integrity and maintenance of myelin, synthesis and inactivation of neurotransmitters, synthesis and methylation of DNA and RNA. The etiology of several psychiatric and neurologic diseases is related to disturbances in the methylation and increased plasma homocysteine levels constitute a risk factor to those diseases (Obeid et al. 2007). Vitamin B₁₂ deficiency is frequently accompanied by neurological or psychiatric disorders, features which may precede megaloblastic anemia development (Loikas et al. 2007).

Vitamin B₆, in the form of pyridoxal phosphate, acts as a cofactor in the regeneration process of acid N5-methyltetrahydrofolate (Guerra-Shinohara et al. 2008) while vitamin B₉ (folic acid or folate) in the form of N5-methyl-

tetrahydrofolate donates a methyl group for the formation of methylcobalamine. Folic acid is an important vitamin for growing and cellular division, as well as for the synthesis of DNA and RNA, mainly during childhood and pregnancy.

Deficiency of folic acid is associated to the impairment of growth, anemia, lost of weight, besides to behavioral and digestive disorders. During pregnancy, this deficiency is suggested as a cause of serious delay in the myelination of the fetal nervous system (Lovblad et al. 1997).

Sources of vitamins B complex

Usual sources of vitamin B₁₂ are animal products, meat, milk, eggs, fish and seafood, and fortified cereals. The bioavailability of vitamin B₁₂ in humans from the intake of fish, mutton and chicken is, respectively, 42%, 56-89% and 61 to 66%. The absorption of this vitamin after eating eggs is reduced compared with the absorption of other products of animal origin (Watabe 2007). Green leafy vegetables, citrus fruits, liver meat and whole grains, chestnut, beans and peas, and fortified cereals are the main sources of folic acid (Watabe 2007), while vitamin B₆ is present in non-citrus-fruits, poultry meat, beans, asparagus, cabbage and artichoke, banana, chestnut, cabbage, spinach, sweet potato, pumpkin, liver meat, whole grains, broccoli, besides other vegetables and fortified cereals (McCully and McCully 2000).

Vitamin B₁₂ in the elderly

People aged over 50 often show impaired absorption of vitamin B₁₂, which requires mainly consumption of foods fortified with this vitamin. Intake of riboflavin (vitamin B₂) may function as a cofactor of the enzyme 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), resulting in a slight reduction of plasma homocysteine levels (McCully and McCully 2000). Vitamin B₁₂ deficiency is particularly common in these people, but often undiagnosed because of its subtle clinical presentation, although it may present serious consequences, specially hematologic and neuropsychiatric manifestations (Loikas et al. 2007).

Boushey et al. (1995) suggested a diet with an increase of 350mg/day in folic acid intake for men, and 280 mg/day for women, and calculated that it would prevent 30,500 and 19,000 deaths annually caused by vascular disease in men and women, respectively.

Reflection of plasma concentration on the intracellular concentration is a complicating factor in the laboratory investigation of vitamin B₁₂. Then, determination of methylmalonic acid appears as a more sensitive marker to detect deficiency of this vitamin. Methylmalonic acid is a dicarboxylic acid from propionic acid, which is obtained after the catabolism of some amino acids and fatty acids. As described before, vitamin B₁₂ participates in the metabolism of methylmalonic acid to succinic acid. As vitamin B₁₂ deficiency occurs, even in situations in which plasma levels are still within the reference range, there is impairment in the methylmalonic acid metabolism. As a consequence, there is increase of its plasma levels, which makes it a more sensitive marker to determinate the vitamin B₁₂ deficiency. Other advantages include its stability (more stable than vitamin B₁₂) and plasma concentration (about a thousand times higher than vitamin B₁₂) (Erdogan et al. 2010). Thus, inclusion of methylmalonic acid determination in the follow-up of elderly people is desirable.

HERP (*homocysteine-inducible endoplasmic reticulum stress protein*)

Recent studies related to a protein known as HERP revealed that this protein leads to an increased amyloide-beta production A β in cell culture. HERP is present in the hippocampal formation and cortical neurons, where its expression is induced by endoplasmic reticulum stress. It is assumed that HERP has a neuroprotective function, because it is elevated in patients with AD. Furthermore, the overexpression of this protein protects neuronal cells culture against induced death by endoplasmic reticulum stress. It's believed that the HERP promotes homeostasis of calcium release by endoplasmic reticulum, which guarantees the neuroprotective action (Ho PI et al. 2001).

Hyperhomocysteinemia and dementia syndromes

Hyperhomocysteinemia is associated to an increased risk of venous and arterial thrombosis, which may be explained by the toxic effect of homocysteine on the vascular endothelium. Homocysteine may also leads to arterial lesion by promoting the oxidation of LDL cholesterol. Oxidized LDL is recognized by receptors on the macrophage membrane, and when it occurs on artery walls, there is development of foamy cells filled with lipid droplets, which corresponds to the first step towards the formation of atheromatous lesions (Pancharuniti 1994).

Hyperhomocysteinemia is also associated to a higher risk of complications during pregnancy, as pre-eclampsia, recurrent abortions and placenta previa, besides fetal malformation (defect in neural tube, heart defect, cleft palate, harelip, etc.) and low birth weight (Lovblad et al. 1997; Alperin et al. 1969; Bower and Stanley 1989; Chanarin 1987; Kirke et al. 1998; Laurence 1992; Lindenbaum et al. 1988; Ray and Laskin 1999).

Several studies have been conducted to evaluate the relation between the hyperhomocysteinemia and the cognitive deficiency, characteristic of dementia syndromes (Herrmann and Obeid 2011). However, the results are conflicting. Cunha et al (1995) investigated possible effects of supplements of vitamin B₁₂ on cognitive function of patients with mild dementia manifested less than two years. They assessed a total of 181 patients, although only 46 patients presented B₁₂ deficiency. Treatment with B₁₂ supplement resulted in improved cognitive function only in three patients.

Clarke et al (1998) examined 164 patients with Alzheimer disease (AD), with histological confirmation in 76 of them, and found that plasma levels of homocysteine were significantly higher, while folic acid and vitamin B₁₂ levels were lower in patients with histological confirmation of AD in relation to control patients. Plasma homocysteine levels above 11.1mmol/L were associated with more rapid progression of AD, as evaluated by decreasing of the temporal lobe size.

An study performed in United Kingdom, which considered the cutoff point of homocysteine of 14.5mmol/L, also revealed an association between the increase of plasma levels of homocysteine with vitamin B₁₂ reduction and increased risk of cognitive decline (Clarke et al. 2007).

Smith (2008) evaluated seventy seven transversal studies with more than 34.000 patients and 33 prospective studies with more than 12.000 patients and all of them have shown an association between cognitive impairment and higher plasma levels of homocysteine, or B vitamins deficiencies. However, other studies have not found this association. Locascio et al. (2008) performed a cohort study with 122 patients with AD. No relationship between high levels of homocysteine and cognitive decline was observed. Similar results were obtained by Regan et al. (2006).

A recent study in United States, which considered the cutoff point of plasma homocysteine of 11.5mmol/L, reported no association between cognitive decline and increase of homocysteine levels (Tangney et al. 2009).

Recently, Oulhaj et al. (2010) conducted a study which examined the global cognitive decline of 97 patients with AD, each six months during a period of 1.5 to 9.5 years. They concluded that higher levels of homocysteine was related to a more rapid cognitive decline, specially for patients younger than 75 years and who had no history of vascular disease.

As some studies in the literature that search the association between cognitive impairment and hyperhomocysteinemia are compared, several factors must be considered such as the age of patients and the cutoff point of homocysteine, as well as the dementia level of patients, time onset of symptoms and history of vascular disease.

The finding that in AD there is a significant reduction of hydrogen sulfide (H₂S), a neuromodulator that produces a response to neuronal excitation, has become closer the relation between homocysteine and this disease. Synthesis of H₂S in

the brain depends on the enzyme cystathionine β synthase (CBS), involved also in the metabolic pathways of homocysteine (Dwyer et al. 2004).

Conclusions

Several reports suggest vascular injury induced by hyperhomocysteinemia. However, some questions about the neurotoxic effects of homocysteine remain to be proven. Investigators have reported a better recovery of cognitive function after supplementation with vitamin B₁₂ in patients with initial diagnostic of AD. However, there are not enough data to prove correlation between the intake of supplements of vitamin B₁₂ and the improvement of cognitive function in patients with dementia and reduced plasma levels of this vitamin. Randomized clinical studies well-defined with relation to the age of patients, the degree of dementia, onset time of symptoms, history of vascular disease, as well as the cutoff point of homocysteine are necessary to elucidate the cause/effect relation between hyperhomocysteinemia and dementia.

Acknowledgements

The authors thank CNPq and FAPEMIG for their financial support.

References

1. ALPERIN JB, HAGGARD ME AND MCGANITY WJ. 1969. Folic acid, pregnancy, and abruptio placentae. *Am J Clin Nutr* 22:1354-61.
2. APRAHAMIAN I, MARTINELLI JE AND YASSUDA MS. 2009. Doença de Alzheimer: revisão da epidemiologia e diagnóstico. *Rev Bras Clin Med* 7:27-35.
3. BOUSHEY CJ *et al.* 1995. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 274:1049- 57.
4. BOWER C AND STANLEY FJ. 1989. Dietary folate as a risk for neural tube defects: evidence from a casecontrol study in western Australia. *Med J Aust* 150: 613-619.
5. CARAMELLI P AND BARBOSA MT. 2002. Como diagnosticar as quatro causas mais freqüentes de demência? *Rev Bras Psiquiatr* 24(Supl I): 7-10.
6. CHANARIN I. 1987. Megaloblastic anemia, cobalamin and folate. *J Clin Pathol* 40: 978-984.
7. CLARKE R *et al.* 1998. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol* 55: 1449–1455.
8. CLARKE R *et al.* 2007. Low vitamin B-12 status and risk of cognitive decline in older adults. *Am J Clin Nutr* 86: 1384–1391.
9. CUNHA UGV *et al.* 1995. Vitamin B, Deficiency and Dementia. *International Psychogeriatrics*, 7 (1), 85-88.
10. DWYER BE *et al.* 2004. Homocysteine and Alzheimer's disease: a modifiable risk? *Free Radic Biol Med* 36(11):1471-1475.
11. ERDOGAN E *et al.* 2010. Evaluation of reference intervals for methylmalonic acid in plasma/serum and urine. *Clin Chim Acta* 411 (21-22):1827-1829.
12. FRIDMAN C *et al.* 2004. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. *Rev. Psiq. Clín* 31: 19-25.

13. GEBARA KS AND MATIOLI G. 2006. Relação da hiperhomocisteinemia com a doença cardiovascular e a doença de Alzheimer. *Rev Bras Nutr Clin* 21: 239-43.
14. GUERRA-SHINOHARA EM *et al.* 2008. Evaluation of nutritional and genetic determinants of total homocysteine, methylmalonic acid and S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine values in Brazilian childbearing-age women. *Clin Chim Acta* 388 (1-2):139-147.
15. HERRMANN W AND OBEID R. 2011. Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases. *Clin Chem Lab Med* 49 (3): 435 – 441.
16. HO PI *et al.* 2001. Homocysteine potentiates b-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J Neurochem* 78: 249-253.
17. KIRKE P, WEIR DG AND SCOTT JM. 1998. Preconception nutrition and prevention of neural tube defects. In: Sadler MJ; Strain JJ; Caballero B - *Encyclopedia of human nutrition*. Academic Press 1609-1619.
18. LAURENCE KM. 1992. The genetics and prevention of neural tube defects and “uncomplicated” hydrocephalus. In: Emery AEH, Rimoin DL. *Principles and Practice of Medical Genetics*. 2.ed. London: Churchill Livingstone 323-346.
19. LINDENBAUM J *et al.* 1988. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *N Engl J Med* 318: 1720-8.
20. LOCASCIO JJ *et al.* 2008. Plasma amyloid {beta}-protein and C-reactive protein in relation to the rate of progression of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 65: 776–785.
21. LOIKAS S *et al.* 2007. Vitamin B12 deficiency in the aged: a population-based study. *Age and Ageing* 36: 177–183.
22. LOVBLAD K *et al.* 1997. Retardation of myelination due to dietary vitamin B12 deficiency: cranial MRI findings. *Pediatr Radiol* 27: 155-158.
23. MCCULLY K AND MCCULLY M. 2000. O Fator Homocisteína: A revolucionária descoberta que mostra como diminuir o risco da doença cardíaca. Mitos e verdades a respeito do colesterol. 1st ed. Rio de Janeiro (RJ): Objetiva.

24. NITRINI R *et al.* 2005. Diagnóstico de Doença de Alzheimer no Brasil avaliação cognitiva e funcional. *Arq Neuropsiquiatr* 63: 720-727.
25. OBEID R *et al.* 2007. Biomarkers of folate and vitamin B₁₂ are related in blood and cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 53(2): 326-333.
26. OULHAJ A *et al.* 2010. Homocysteine as a predictor of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 25(1):82-90.
27. PANCHARUNITI N. 1994. Plasma homocysteine, folate, and vitamin B-12 concentrations and risk for early-onset coronary artery disease *Am J Clin Nut* 59: 940-948.
28. RAY JG AND LASKIN CA. 1999. Folic acid and homocysteine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: a systematic review. *Placenta* 20: 519-529.
29. REGAN C *et al.* 2006. Relationship of vascular risk to the progression of Alzheimer disease. *Neurology* 67: 1357–1362.
30. SCOTT JM AND WEIR DG. 1988. Folic acid, homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry. *J Cardiovasc Risk* 5:223-227.
31. SELHUB J AND D'ANGELO A. 1997. Hyperhomocysteinemia and Thrombosis: Acquired Conditions. *Thrombosis and Haemostasis* 78(1):527-31.
32. SESHADRI S AND WOLF AP. 2003. Homocysteine and the brain: vascular risk factor or neurotoxin? *Lancet* 2:11.
33. SMITH AD. 2008. The worldwide challenge of the dementias: A role for B vitamins and homocysteine? *Food and Nutrition Bulletin* 29:S143- S172.
34. TANGNEY CC *et al.* 2009. Biochemical indicators of vitamin B12 and folate insufficiency and cognitive decline. *Neurology* 72: 361–367.
35. WATABE F. 2007. Vitamin B₁₂: sources and bioavailability. *Exp Biol Med* 232: 1266-1274.
36. BOWMAN G L, KAYE JA., QUINN JF. Dyslipidemia and Blood-Brain Barrier Integrity in Alzheimer's Disease. **Current Gerontology and Geriatrics Research**, ID 184042, 2012.