

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

MONÓCITOS COMO INDICADORES DE ATIVIDADE INFLAMATÓRIA
E OXIDATIVA EM IDOSOS SEM DÉFICIT COGNITIVO E
COM DOENÇA DE ALZHEIMER

LEANDRO GIAVAROTTI

Tese de Doutorado

ORIENTADOR: Profa. Dra. Virginia Berlanga Campos Junqueira

SÃO PAULO, 26 de agosto de 2004.

**“Monócitos como indicadores de
atividade inflamatória e oxidativa em
idosos sem déficit cognitivo e com doença
de Alzheimer”**

LEANDRO GIAVAROTTI

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado(a) por:

Profa. Dra. VIRGINIA BERLANGA CAMPOS JUNQUEIRA
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. EMMANUEL DIAS NETO
FM – USP

Profa. Dra. DULCINEIA SAES PARRA ABDALLA
FCF – USP

Prof. Dr. MARIO MARIANO
UNIFESP

Prof. Dr. REINALDO SALOMÃO
UNIFESP

SÃO PAULO
17 DE DEZEMBRO 2004

AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Virgínia B. C. Junqueira, pela aparentemente infinita paciência e compreensão com as minhas (várias) idiossincrasias e, por todos os anos de aprendizado, amizade e diversão.
- À Karin, que sempre torna o impossível, provável. Você é a luz da minha vida.
- Ao Dr. Luiz Roberto Ramos, por tornar este projeto possível e, pela amizade e companheirismo durante toda sua realização.
- À Dra. Alcione A. V. Souza Moscardi, por seu incansável empenho na organização dos dados clínicos indispensáveis para a seleção e acompanhamento dos pacientes.
- À toda equipe do Centro de Estudos do Envelhecimento: Anne, Vera, Célia, Andréia, Tati e, especialmente, à Dra. Maria Beatriz Marcondes Macedo Montañó, por sua inestimável ajuda na coleta dos dados de CDR e MMSE.
- A todo o pessoal do laboratório que renunciou, em algum momento, ao seu trabalho, lazer ou horas de sono, para contribuir para a realização deste trabalho; em especial ao Tenente Evandro Milton Rodrigues e à Alessandra Ferreira Lima, por, de madrugada, possibilitarem a coleta domiciliar de amostras e pelo conhecimento especializado que possibilitou a realização de grande parte deste trabalho; à Maria Cláudia V. Freitas, pela preciosa contribuição técnica nas últimas fases deste trabalho; à Alyne Maria Xavier, pela dedicação ao laboratório em sua passagem.
- À equipe da DIPA: Dr. Reinaldo Salomão, Dr. Esper Georges Kallás e, em especial, à Dra. Milena Karina Coló Brunialti (juro que escrevi seu nome pensando em letras douradas) por disponibilizar o tempo, o espaço, o equipamento e o conhecimento que possibilitaram a realização dos experimentos de citometria de fluxo que se tomaram o cerne deste trabalho.

- À Dra. Maria Aparecida Dalboni, por orientar a execução das medidas de metabolismo oxidativo de monócitos.
- À Dra. Vânia D'Almeida e ao Paulo Forcina, pelo apoio na realização das medidas de enzima-imunoensaio e, pela longa amizade que torna o caminho mais agradável. A segunda olimpíada do bife de chorizo nos espera!
- Aos colegas e professores da USP e da UNIFESP, pelos conselhos diversos e auxílios freqüentes.
- Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação do Instituto de Química, que não pouparam esforços para evitar que este estudante desgarrado perdesse os prazos importantes.
- Ao apoio financeiro da CAPES, CNPQ e FAPESP, que tornaram este projeto exequível.
- Às CASAS BAHIA, nas pessoas do Sr. Samuel Klein e do Dr. Válder Hamachi, que generosamente financiaram grande parte desse projeto, evidenciando sua preocupação com o bem-estar da população.
- Aos pacientes que participaram desse estudo e seus familiares, por altruisticamente permitirem a coleta das amostras utilizadas, mesmo quando isso acarretava transtornos às suas rotinas.
- A todos os meus amigos, que sempre compreenderam e apoiaram minhas intenções, e me estimularam nas horas certas com as palavras adequadas.

RESUMO

A Doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa progressiva e de início tardio, que compromete principalmente as áreas da cognição, julgamento e estabilidade emocional. Esta doença se caracteriza por dois tipos de lesões cerebrais características: emaranhados neurofibrilares e placas senis. Os emaranhados neurofibrilares são compostos por uma proteína do citoesqueleto (proteína tau) hiperfosforilada e agregada. As placas senis são formadas por agregados da proteína β -amilóide. A doença de Alzheimer é resultado da interação de vários fatores ainda incompletamente elucidados; não obstante, o estresse oxidativo e os processos inflamatórios ocupam posição de destaque dentre esses fatores. Neste trabalho, avaliamos as atividades das enzimas eritrocitárias superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, assim como o conteúdo plasmático de glutathione total, vitamina C, α -tocoferol, β -caroteno, licopeno e coenzima Q₁₀. A esses parâmetros antioxidantes foram contrapostas medidas de oxidação de lipídios e proteínas plasmáticas. Adicionalmente, efetuamos a avaliação das expressões monocitárias de HLA-DR e CD-11b, e das citocinas IL-6, IL-1 α e TNF- α . Nossos resultados mostram que os pacientes de doença de Alzheimer possuem níveis circulantes de α -tocoferol inferiores aos pacientes controles, e possuem monócitos que apresentam maior expressão basal de HLA-DR e maior produção de IL-1 α quando estimulados por LPS. Esses resultados fortalecem a hipótese inflamatória na doença de Alzheimer, de acordo com trabalhos recentes que apontam bons resultados com o α -tocoferol na sua prevenção e tratamento.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is a late-onset, progressive degenerative disease that affects mainly the judgement, emotional stability and memory domains. This disease is characterized by two telltale cerebral lesions: neurofibrillary tangles and senile plaques. Neurofibrillary tangles are constituted by hyperphosphorylated cytoskeleton protein tau aggregates, while senile plaques are mainly composed by β -amyloid protein aggregates. Alzheimer's disease is the outcome of a complex interaction among several factors which are not fully understood yet; nevertheless it is clear that oxidative stress and inflammatory pathways rate high among these factors. In this work, we evaluated the erythrocytic activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, as well as the plasma levels of total glutathione, α -tocopherol, β -carotene, lycopene, and coenzyme Q₁₀. These antioxidant parameters were confronted with plasmatic levels of protein and lipid oxidation products. Additionally, we measured the basal expression of monocyte HLA-DR and CD-11b, as well as the monocyte production of the cytokines IL-1 α , IL-6 and TNF- α . Our results show that Alzheimer's Disease patients show lower plasmatic levels of α -tocopherol when compared to control patients, and have higher basal monocyte HLA-DR expression associated with higher IL-1 α production when stimulated by LPS. These results lend support to the inflammatory theory of Alzheimer's disease, according to recent works that indicate good results of α -tocopherol administration in both its prevention and treatment.

ABREVIATURAS

MMSE	“Mini-Mental State Examination”
EN	emaranhados neurofibrilares
PS	placa senil
P β A	proteína β -amilóide
PPA	proteína precursora de amilóide
kDa	quilodaltos
FHP	filamento helicoidal pareado
ERO	espécies reativas de oxigênio
FCE	fluido cérebro-espinhal
ONOO ⁻	peroxinitrito
O ₂ ⁻	ânion superóxido
NO [•]	óxido nítrico
INOS	óxido nítrico sintase
ERN	espécies reativas de nitrogênio
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
ESR	ressonância de spin eletrônico
Cu,Zn-SOD	superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
TNF- α	fator necrosante tumoral α
IL-1 α	interleucina 1 α
IL-1 β	interleucina 1 β
IL-6	interleucina 6
SOD	superóxido dismutase
IgG	imunoglobulina G
TGF- β	fator de crescimento tumoral β
COX-2	ciclooxigenase-2
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
DNA	ácido desoxirribonucléico
NF- κ B	fator nuclear kappa B
Mn-SOD	superóxido dismutase dependente de manganês
EPIDOSO	Epidemiologia do Idoso
CEE	Centro de Estudos do Envelhecimento
VHS	velocidade de hemossedimentação
PCR	proteína C reativa
NINCDS	“National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke”
ADRDA	“Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association”
INT	grupo de pacientes considerado cognitivamente íntegros
DA	grupo de pacientes com provável Doença de Alzheimer
CAT	catalase
GPx	glutaciona peroxidase
GSH	glutaciona reduzida
GSSG	glutaciona oxidada

SRAT	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HPO ₃	ácido metafosfórico
DNPH	dinitofenilhidrazina
OPD	ortofenildiamina
NaBH ₂	borohidreto de sódio
HOCl	ácido hipocloroso
FITC	isotiocianato de fluoresceína
PerCP	proteína de clorofila peridina
PE	ficoeritrina
APC	aloficocianina
HLA	antígeno leucocitário humano
LPS	lipopolissacarídeo
NaN ₃	azida sódica
PBS	solução tamponante fosfatada
CDR	"Clinical Dementia Rating"
Hb	hemoglobina

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A Doença de Alzheimer.....	1
1.1.1. Características clínicas e evolução.....	1
1.1.2. Caracterização das lesões típicas.....	3
1.1.3. Diagnóstico	13
1.1.4. Fatores de risco	16
1.2. Doença de Alzheimer e Estresse Oxidativo	17
1.3. Inflamação.....	21
1.3.1. Eventos Vasculares	21
1.3.1.1. Mediadores	22
1.3.2. Eventos celulares.....	24
1.4. Doença de Alzheimer e Inflamação.....	25
2. OBJETIVOS GERAIS DO TRABALHO	31
3. SELEÇÃO DOS PACIENTES	32
3.1. Casuística	32
3.2. Avaliação da capacidade cognitiva dos pacientes	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1. Tratamento e coleta das amostras de sangue	35
4.2. Avaliação das enzimas antioxidantes eritrocitárias	35
4.2.1. Preparo do hemolisado	35
4.2.2. Dosagem de Hemoglobina.....	35
4.2.3. Determinação da atividade das enzimas antioxidantes	36
4.2.3.1. Cu,Zn-Superóxido dismutase (E.C. 1.15.1.1)	36
4.2.3.2. Catalase (E.C. 1.11.1.6).....	36
4.2.3.3. Glutaciona peroxidase (E.C. 1.11.1.9).....	36
4.3.1. Medida de α -tocoferol, β -caroteno, licopeno e coenzima Q10.....	37
4.3.1.1. Preparo dos padrões	37
4.3.1.2. Determinação de α -tocoferol, β -caroteno, licopeno e coenzima Q10.	
37	
4.3.2. Medida da concentração plasmática de vitamina C.....	39

4.4.	Medida da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT) no plasma.	40
4.5.	Glutaciona total	40
4.6.	Oxidação de proteínas plasmáticas	40
4.7.	Parâmetros inflamatórios e oxidativos em monócitos	41
4.7.1.	Marcadores de ativação celular em monócitos	41
4.7.2.	Produção intracelular de IL-1 α , IL-6 e TNF- α	41
4.7.3.	Metabolismo oxidativo.....	42
4.7.4.	Aquisição de eventos em citometria de fluxo	42
4.8.	Análise estatística	43
5.	RESULTADOS	44
6.	DISCUSSÃO	55
7.	BIBLIOGRAFIA	64
8.	ANEXO I.....	86
9.	ANEXO II.....	87
10.	ANEXO III	88
11.	ANEXO IV.....	91

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Doença de Alzheimer

1.1.1. Características clínicas e evolução

O envelhecimento na população normal está associado com déficits heterogêneos na função cognitiva. Um estudo de Valdois e cols. (1990) observou, por exemplo, seis subgrupos que diferiam entre si, principalmente, no desempenho cognitivo geral. Estes subgrupos, entretanto, não apresentaram perfis contrastantes de capacidades cognitivas preservadas ou lesadas; as diferenças observadas eram quantitativas, e não qualitativas. O mal de Alzheimer, entretanto, apresenta características de declínio cognitivo que diferem significativamente dos padrões observados no envelhecimento saudável.

O mal de Alzheimer é uma doença degenerativa cerebral devastadora e de aparecimento tardio, que causa demência progressiva, caracterizada por perda de memória, capacidade de julgamento e estabilidade emocional. A progressão da doença em casos relativamente focais é caracterizada pela deterioração contínua do domínio cognitivo afetado (Martin, 1987) juntamente com um gradual alargamento do espectro de sintomas para domínios antes não afetados (Becker e cols., 1988). O fato da doença continuar a progredir dentro de um domínio cognitivo em particular, sugere que a progressão da patologia não é aleatória, mas ao contrário, segue um curso paralelo à organização funcional do sistema afetado.

Os sintomas iniciais da Doença de Alzheimer passam quase que invariavelmente despercebidos. Apenas em uma fase mais avançada, quando as atividades de vida diária começam a ser comprometidas, é que os sintomas se tornam evidentes a parentes e amigos. Usualmente, os familiares tomam para si parte das tarefas atribuídas ao idoso, assumindo que o declínio é passageiro e minimizando a percepção das alterações (Russel & Burns, 1998).

Apesar do curso da doença ser variável, os sintomas precoces geralmente envolvem perda de memória operacional e desorientação temporal e espacial, com comprometimento das funções executivas (Brucki, 2000). Esta perda de memória evolui para a perda das funções de aprendizado e evocação, que pode ser evidenciado em tarefas como a apresentação de listas de palavras para posterior evocação.

Simultaneamente, a memória episódica também começa a ser afetada, assim como a memória semântica, o que se reflete em um pior desempenho no teste de fluência verbal por categorias.

Em relação à memória temporal, a memória recente é a primeira a ser afetada, mas com a evolução da doença, o déficit de memória atinge dimensões globais (Brucki, 2000).

As alterações precoces que acompanham o estabelecimento da Doença de Alzheimer causam aos pacientes alteração de linguagem, empobrecimento do vocabulário e troca ou esquecimento das palavras. Ainda nas fases iniciais, a interpretação de histórias e provérbios é comprometida; estas alterações evoluem, com o agravamento da doença, para alterações fonológicas e sintáticas (Damasceno, 2000).

A Doença de Alzheimer também afeta habilidades viso-espaciais, de maneira branda nas fases iniciais, mas com progressivo aumento de severidade à medida que a doença evolui. Testes neuropsicológicos que envolvem cópias de desenhos evidenciam este déficit (Camargo & Cid, 2000).

A evolução do quadro também propicia o aumento de incidência de apraxias, como a perda da sequência de atos motores e dificuldades de realizar gestos sob comando (Brucki, 2000).

Nas fases iniciais da doença, o paciente pode perceber seus déficits. Esta consciência, entretanto, desaparece em estágios mais avançados. Pode ocorrer, precocemente no curso de evolução da doença, mudança de personalidade e alteração na capacidade de julgamento, o que dificulta as relações familiares. Outros sintomas externos à esfera da cognição podem incluir: depressão, delírio, alucinações, agressividade, perambulação, desinibição sexual e distúrbios de alimentação (Cummings e cols., 1998). Em estágios avançados, aparecem as incontinências urinária e fecal, inicialmente devidas à desorientação, e posteriormente à desinibição (White & Cummings, 1997).

A progressão da doença é geralmente lenta e contínua, com sobrevida bastante variável (2 a 15 anos). Esta sobrevida pode ser influenciada por fatores como:

gravidade da demência, sexo e idade. A evolução independe de raça ou nível sócio-econômico (Brucki, 2000)

Assim, a característica clínica mais marcante da Doença de Alzheimer é sua natureza progressiva. As funções cognitivas, quando medidas por uma escala clínica global como o MMSE (Mini-Mental State Examination) deterioram a uma razão de aproximadamente 10% ao ano (Berg e cols., 1987; Huff e cols., 1987; Salmon e cols., 1990). Este declínio, entretanto, não é linear; nos estágios iniciais e finais da doença, o declínio é consideravelmente mais lento que na fase intermediária (Morris e cols., 1993). Como resultado, a taxa anual esperada de declínio depende, consideravelmente, da severidade da doença no momento da sua detecção.

Esse perfil curvilíneo da evolução da Doença de Alzheimer pode ser uma função da natureza dos testes aplicados, assim como do curso natural da doença. O ritmo acelerado de declínio cognitivo nas fases intermediárias da doença pode ser função do fato que mais funções medidas pelos testes encontram-se em declínio nessas fases, do que no início da doença onde, principalmente, a evocação e as habilidade verbais estão comprometidas, ou no final da doença, onde muitas funções encontram-se abaixo do limite de avaliação dos métodos empregados. Deve-se notar, entretanto, que existe considerável heterogeneidade na evolução da doença entre vários pacientes, e que as descrições aqui apresentadas são baseadas em resultados médios de amplas amostras de pacientes.

1.1.2. Caracterização das lesões típicas

A caracterização das lesões típicas desta doença data de 1907, quando Alois Alzheimer relatou o descobrimento de duas novas lesões no cérebro de uma paciente de 51 anos com um histórico de demência progressiva de 4 anos e meio: emaranhados neurofibrilares (EN) e placas senis (PSs) além de uma perda acentuada de neurônios corticais. Para fazer esta descoberta, ele empregou uma técnica de coloração com prata recentemente desenvolvida por seu colega Max Bielschowski. A coloração de Bielschowski ainda hoje é o método preferencial para o diagnóstico de mal de Alzheimer. Entretanto, este método evidencia apenas alterações neuronais, não as alterações gliais. O advento da imunohistoquímica permitiu que uma perspectiva completamente diferente da arquitetura das lesões básicas fosse demonstrada, através

da presença e orientação das células gliais. Nas PSs, pode-se detectar a presença de astrócitos reativos formando uma camada externa em volta da lesão, com fibrilas se estendendo para a parte interna da lesão (Wisniewski & Wegiel, 1991), enquanto a microglia é visualizada como um agrupamento interno ao redor do núcleo. Este núcleo, chamado de estrela amilóide, é constituído de uma massa de fibrilas insolúveis de proteína amilóide. Axônios e dendritos tendem a ficar presos nas regiões externas, ou halo, da PS madura (McGeer & McGeer, 1995).

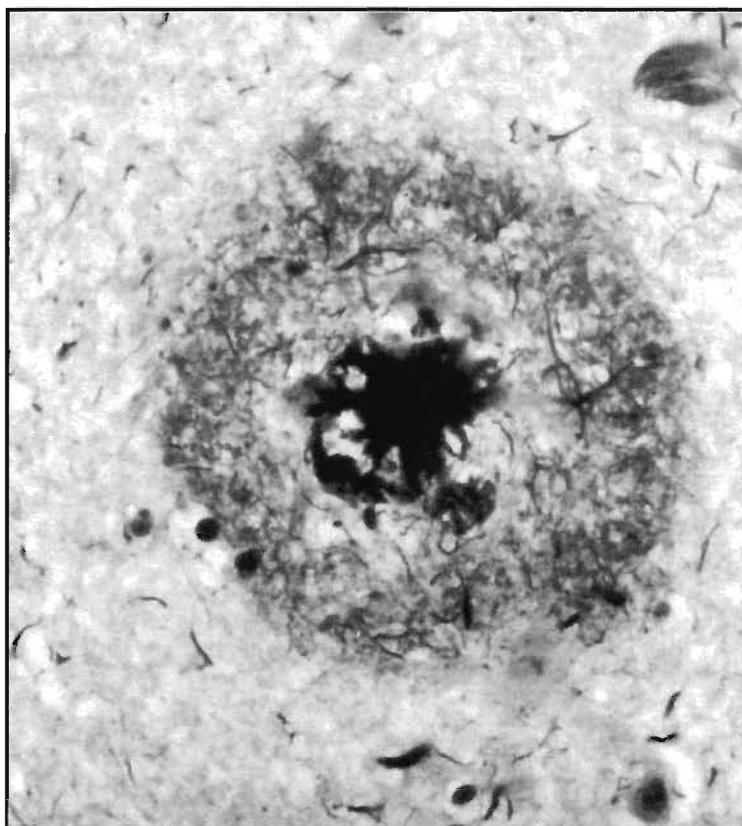


Figura 1. Placa senil (PS) madura. Notar a deposição amilóide no centro da placa.

(<http://www.pathology.vcu.edu/WirSelfInst/dementias.html>)

A proteína doadora para a forma de amilóide relacionada ao mal de Alzheimer é a proteína β -amilóide ($P\beta A$). Esta proteína é um fragmento de 4.5 kDa da proteína precursora de amilóide (PPA), que é amplamente distribuída no organismo. No mal de Alzheimer, a $P\beta A$ precipita para formar os depósitos amilóides, conhecidos como

placas senis. Dois tipos principais de placas senis podem ser observados no cérebro humano.

As *placas difusas* são formadas por P β A na forma filamentosa e dispersa de maneira pouco estruturada. Não são observados neurônios danificados associados a estas placas, portanto são considerados benignas. Estas placas coram-se com corantes de prata, mas não com S-tioflavina, e não estão relacionadas com a severidade da demência, sendo encontradas principalmente nos indivíduos mais idosos (Hauw e cols., 1986).

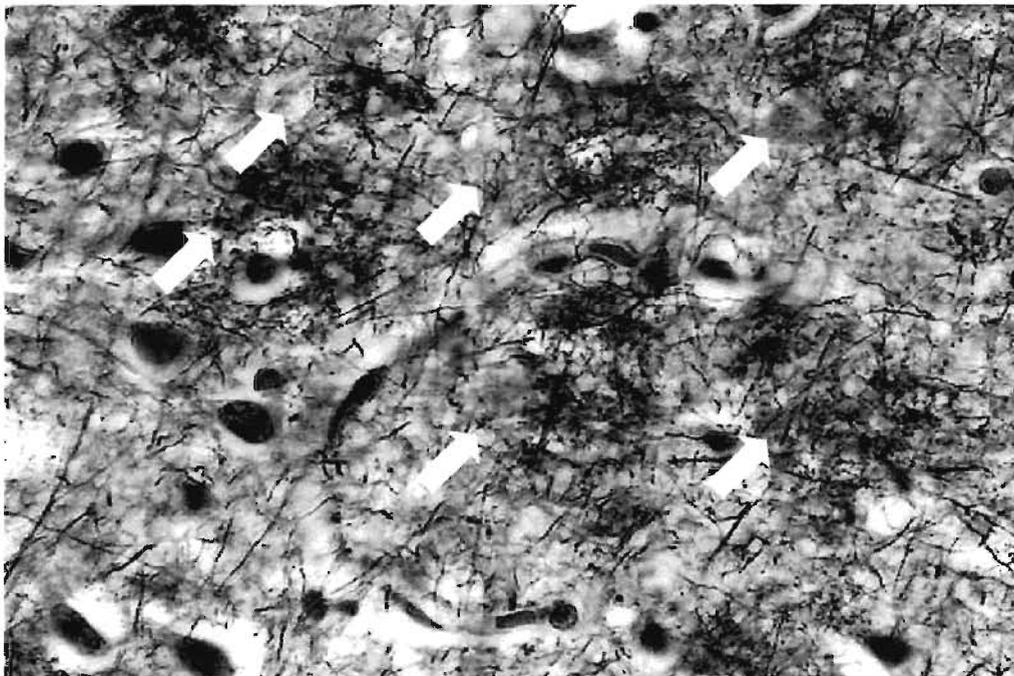


Figura 2. Seis ou mais placas difusas adjacentes. Coloração de Bielschowski.
(<http://www.pathology.vcu.edu/WirSelfInst/dementias.html>)

As *placas neuríticas*, em contraste, contêm feixes densos de fibrilas amilóides que se coram com S-tioflavina, e neuritos distróficos. As placas neuríticas podem ser subdivididas em *placas primitivas*, que não apresentam um núcleo denso de P β A; e *placas clássicas*, que possuem um núcleo central amilóide cercado por axônios em degeneração, arborizações dendríticas, e elemento gliais (Dickson, 1997; Wisniewski & Silverman, 1997; Knowles e cols., 1998).

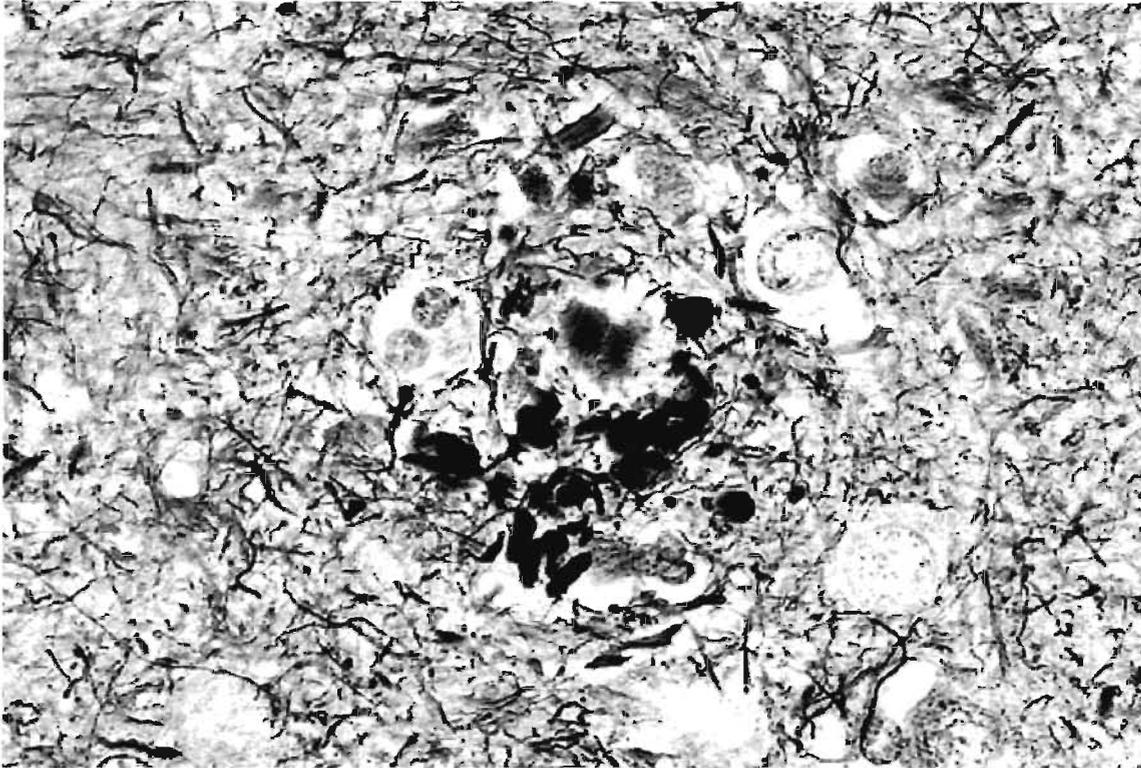


Figura 3. Placa neurítica clássica. Coloração de Bielschowski.
(<http://www.pathology.vcu.edu/WirSelfInst/dementias.html>)

As placas neuríticas são predominantemente encontradas em pacientes portadores da Doença de Alzheimer e parecem correlacionar-se com a severidade da doença (Barcikowska e cols., 1989; Dickson, 1997; Knowles e cols., 1998). Ao fim de sua evolução, as placas neuríticas freqüentemente se apresentam como um denso núcleo de amiloide cercado por astrócitos reativos e células microgliais, mas sem o componente neurítico (placas exauridas) (Figura 3).

A P β A, proteína mais proeminente nas placas senis, é um polipeptídeo de 40-42 aminoácidos, obtido através de clivagem proteolítica de um conjunto de isoformas de proteínas precursoras de amiloide; essas proteínas são codificadas por um único gene localizado no cromossomo 21. Três formas principais de APP são obtidas desse gene através de processamento alternativo (APP 770, 771, 695). A clivagem proteolítica destas proteínas no domínio P β A é catalisada por um grupo de enzimas, conhecidas como α , β e γ -secretases (Checler, 1995). Duas espécies de P β A, a P β A40 e a

P β A42(43) podem se depositar no cérebro de pacientes de Doença de Alzheimer (Iwatsubo e cols., 1994; Iwatsubo e cols., 1996; Mann e cols., 1996). Particularmente, as placas difusas, que são associadas ao envelhecimento normal, são fortemente imunorreativas para P β A42(43), enquanto as placas neuríticas são mais imunorreativas para a forma P β A40 (Arai e cols., 1990; Gowing e cols., 1994; Iwatsubo e cols., 1994; Iwatsubo e cols., 1996). Apesar destes achados não serem unanimemente aceitos, estes estudos podem ser usados como base para estabelecer um subconjunto de PS mais intimamente relacionado com a Doença de Alzheimer do que ao envelhecimento normal.

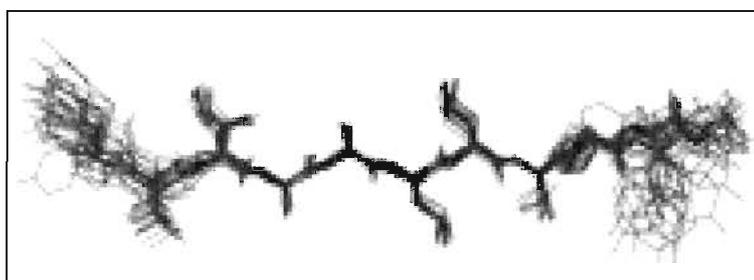


Figura 4. Estrutura da proteína β -amilóide.

(<http://www.pathology.vcu.edu/WirSelfInst/dementias.html>)

O mecanismo de formação das placas senis ainda é controverso. Placas senis clássicas poderiam se desenvolver a partir de depósitos difusos de P β A preexistentes, apesar da falta de observação de uma co-localização coerente dessas duas formas. Alternativamente, as placas senis poderiam surgir a partir de amilóide nas proximidades das paredes dos vasos sanguíneos. Uma terceira hipótese pode envolver a liberação de P β A a partir de conjuntos de neuritos distróficos, com a subsequente formação de placas difusas e clássicas.

Os ENs, quer intracelulares ou extracelulares, são formados pelo acúmulo de componentes do citoesqueleto, bioquimicamente modificados. Estas lesões são compostas de fibras intracelulares argéntofílicas que são intensamente coradas por corantes químicos, tais como a S-tioflavina. Ultraestruturalmente, os EN são formados por um par aparente de fitas, enroladas uma ao redor da outra, com cruzamentos a

cada 75-80 ηm e largura oscilando entre 5 e 22 ηm ; esta estrutura recebe o nome de filamento helicoidal pareado (FHP).

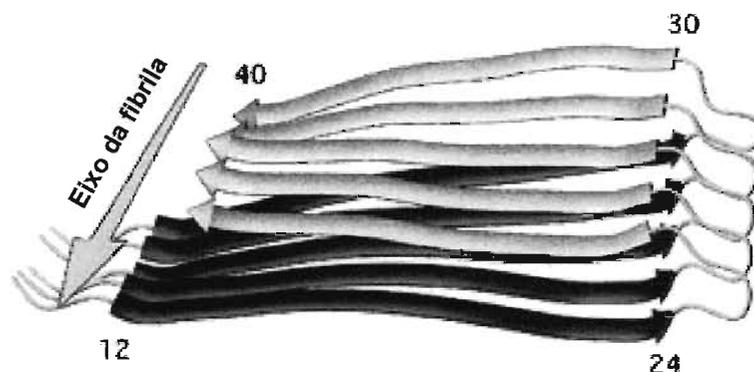


Figura 5. Modelo de distribuição das moléculas de P β A nas fibrilas amilóides.
(<http://www.pathology.vcu.edu/WirSelfInst/dementias.html>)

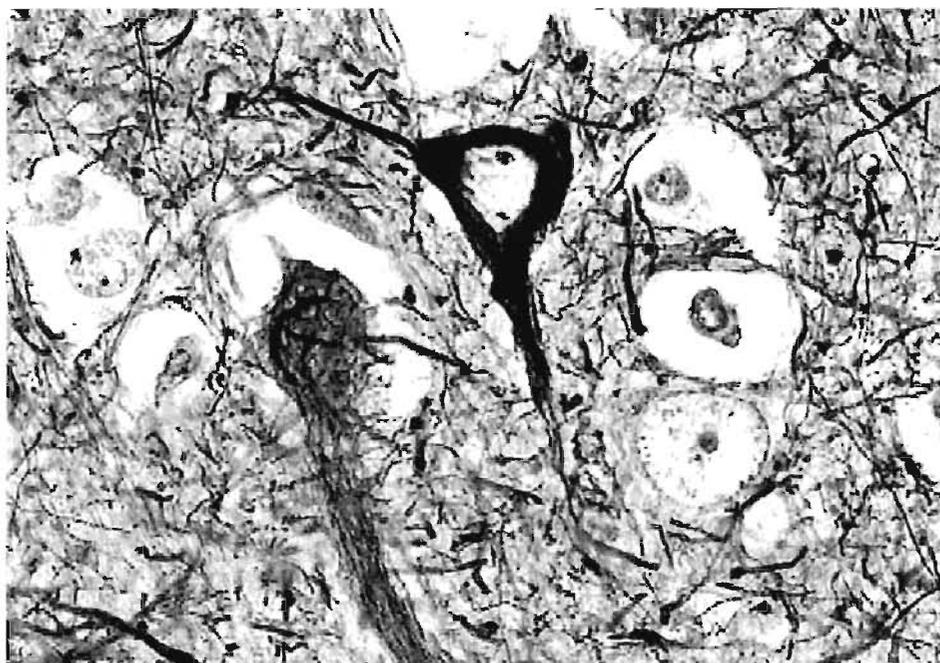


Figura 6. Emaranhados neurofibrilares (EN) intracelulares.
(<http://www.pathology.vcu.edu/WirSelfInst/dementias.html>)

A principal subunidade proteica dos FHP é a proteína tau associada aos microtúbulos (Iqbal e cols., 1998). Seis formas diferentes de proteína tau, possuindo de

352 a 441 aminoácidos, podem ser formadas a partir de um único gene através de processamento alternativo (Bramblett e cols., 1992; Matsuo e cols., 1994). Apesar da proteína tau dos FHP (FHP-tau) estar hiperfosforilada quando comparada com a proteína tau normal do cérebro adulto (Bramblett e cols., 1992; Matsuo e cols., 1994) já foi demonstrado que esta proteína tau normal, derivada de biópsias, é fosforilada *in vivo* em sítios similares àqueles fosforilados na FHP-tau, e que uma significativa desfosforilação da proteína tau normal ocorre no período post-mortem (Matsuo e cols., 1994).

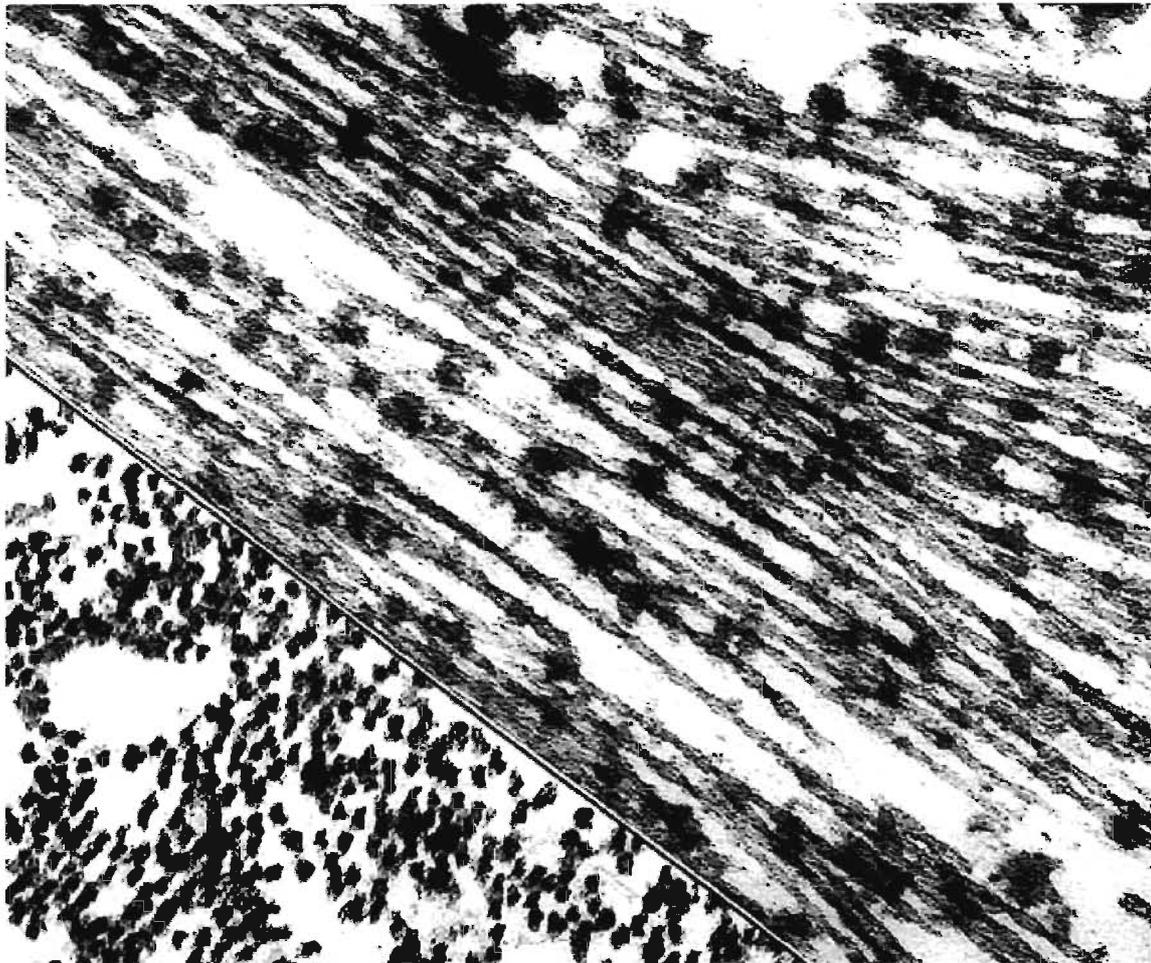


Figura 7. Eletromicrografia dos filamentos helicoidais pareados (FHP). Em áreas favoráveis, pode-se notar as indentações resultantes do arranjo helicoidal dos pares de filamentos de proteína tau hiperfosforilada.

(<http://www.pathology.vcu.edu/WirSelfInst/dementias.html>).

A FHP-tau inibe as atividades promotoras de montagem de microtúbulos das proteínas associadas a microtúbulos 1 e 2 e tubulina (Iqbal e cols., 1998). Portanto, é

possível que a inibição da síntese de fosfatases no cérebro afetado pela Doença de Alzheimer possa induzir a geração de FHP-tau maximamente fosforilada, causando a degradação dos microtúbulos e, conseqüentemente, a degeneração neuronal.

Vários tipos distintos de patologias citoesqueléticas já foram descritos na Doença de Alzheimer, correspondendo a diversas fases da doença. No início do processo degenerativo, há um acúmulo de proteína tau hiperfosforilada no compartimento somatodendrítico, mas sem a formação de FHP. Estes acúmulos são designados como *pré-emaranhados* (Baner e cols., 1989; Braak e cols., 1994). Posteriormente, ocorre a formação de fios neuropílicos; estes podem ser definidos como processos neuronais anormais que contêm FHP e filamentos normais, localizados principalmente nos segmentos distais de axônios e dendritos (Perry e cols., 1991). Em estágios mais avançados, EN completamente desenvolvidos podem ser vistos como feixes densamente empacotados preenchendo o corpo celular e estendendo-se aos dendritos proximais. Após a morte neuronal, os EN permanecem na neurópila como emaranhados extracelulares ou fantasmas, e estão associados com neuritos em degeneração (Yamaguchi e cols., 1991; Cras e cols., 1995).

A microglia e os astrócitos reativos se aglomeram na vizinhança dos emaranhados-fantasma, embora sem a organização observada ao redor das PSs (McGeer & McGeer, 1995). Aparentemente, a ação de proteínas quinases associadas ao estresse pode desencadear a formação de EN em células intactas (Buée-Scherrer & Goedert, 2002).

Ainda há dúvidas sobre se a demência associada ao mal de Alzheimer é primariamente iniciada por depósitos extracelulares de P β A, com a formação neurofibrilar subsequente levando à morte neuronal, ou se é primariamente iniciada pelo dano neurofibrilar, conduzindo à concentração de depósitos amilóides extracelulares. Na verdade, existem até mesmo evidências que apontam para um papel fisiológico importante da P β A no cérebro, como um antioxidante (Kontush, 2001) ou como um fator na fluidez da membrana (Chochina e cols., 2001). Existem, por outro lado, evidências de que outras proteínas podem sofrer um tipo de agregação semelhante ao descrito para a P β A, sendo este mecanismo de agregação responsável por doenças neurodegenerativas como a encefalopatia espongiiforme (Bucciantini e

cols., 2002; Sacchetti & Kelly, 2002). Adicionalmente, existem indícios de que a P β A pode interagir com a proteína tau dos EN, estimulando sua hiperfosforilação e consequentemente sua agregação (Rank e *cols.*, 2002).

Vários estudos apóiam a teoria da interdependência entre esses dois tipos de lesões. No envelhecimento cerebral normal, Doença de Alzheimer e síndrome de Down, as placas neuríticas coincidem com os EN (Mann & Esiri, 1989; Bugiani e *cols.*, 1990). Os EN extracelulares apresentam várias características em comum com as PS, como P β A40, microglia e astrócitos (Cras e *cols.*, 1995; Schwab e *cols.*, 1998) e um subconjunto das placas neuríticas apresenta imunorreatividade para FHP. A PPA apresenta um sítio de ligação dependente de conformação para proteína tau (Smith e *cols.*, 1995), e a interação *in vitro* entre a proteína tau e a PPA promove fibrilogênese; a injeção de FHP em cérebros de ratos induz a formação de depósitos amilóides (Shin e *cols.*, 1993).

Entretanto, existem também fortes evidências contra tal interdependência. Por exemplo, a deposição amilóide pode ocorrer mesmo na ausência de EN; a descrição de várias tauopatias e condições patológicas associadas à proteína tau e aos EN indica claramente que os EN podem causar demência mesmo na ausência de deposição amilóide (Jellinger & Bancher, 1998; Spillantini e *cols.*, 1998). Adicionalmente, em cérebros acometidos pela Doença de Alzheimer, não existe correlação entre a distribuição regional dos EN e PS no córtex cerebral, pelo menos nos estágios iniciais da doença (Giannakopoulos e *cols.*, 1993; van de Nes e *cols.*, 1998).

Pode-se concluir que, apesar de haver um alto grau de sinergia patológica entre EN e PS na Doença de Alzheimer, estas lesões se desenvolvem independentemente, no decorrer do envelhecimento cerebral e, sua presença simultânea não é uma condição indispensável para a expressão clínica da demência.

As perdas neuronais e sinápticas são difíceis de mensurar, já que elas representam a perda deduzida de algo. As perdas sinápticas já foram observadas no neocórtex de pacientes idosos não-demenciados, sugerindo um mecanismo idade-dependente para a perda de sinapses nesta região (Masliah e *cols.*, 1993). Uma perda média de 45% na densidade terminal pre-sináptica, e de 27 a 42% de perda sináptica no córtex prefrontal já foram observadas em casos de Doença de Alzheimer (Brion e

col/s., 1991; Masliah e col/s., 1991). Apesar da densidade sináptica estar normalmente diminuída na neurópila cortical de pacientes de Doença de Alzheimer quando comparada à de pacientes normal de mesma idade, esta redução não é maior dentro das placas difusas que na neurópila circundante. Em contraste, a perda sináptica é mais pronunciada dentro das placas neuríticas, e as sinapses anormais encontram-se concentradas ao redor dos fios neurópilos dendríticos. Se as alterações sinápticas precedem o acúmulo da PPA processada anormalmente e a deposição amilóide, ou se essas alterações são causadas pela neurotoxicidade dos depósitos amilóides, ainda é um ponto controverso.

Até recentemente, o fato de que a morte neuronal estava consistentemente associada ao envelhecimento cerebral normal era amplamente aceito. Esta convicção encontrava amplo respaldo em vários trabalhos influentes, alguns dos quais datados da década de 1950, demonstrando uma morte neuronal significativa em indivíduos idosos não demenciados, assim como em primatas não-humanos e roedores. Estes trabalhos estimavam densidades neuronais, mas não o número total de neurônios em um dada estrutura. Este campo foi extensivamente revisado por Coleman & Flood (1987) que concluíram: apesar de existir uma perda neuronal associada ao envelhecimento, a validade dos dados poderia estar seriamente comprometida por diferenças interespecíficas, processamento do tecido e métodos de amostragem.

Adicionalmente, houve o desenvolvimento de técnicas estereológicas para estimar o número de neurônios em estruturas identificáveis de interesse, tais como regiões-chave no hipocampo e córtex (West & Gundersen, 1990). A principal vantagem destes métodos é a possibilidade de obtenção de uma estimativa da quantidade total de neurônios dentro de uma determinada estrutura cerebral que não é afetada por alterações no tamanho dos neurônios, pelo tamanho da estrutura, ou por parâmetros de fixação do material. Usando estes princípios, mostrou-se que há uma diminuição de apenas 10% no número total de neurônios no neocórtex através do espectro de idades em indivíduos normais (Morrison & Hof, 1997; Pakkenberg & Gundersen, 1997). Contrariamente, mesmo casos muito brandos de Doença de Alzheimer mostram até 50% de perda neuronal na camada II do córtex entorrinal, podendo esta porcentagem subir para 90% em casos severos (Gomez-Isla e col/s., 1996). Além disso, a perda neuronal no campo CA1 do hipocampo pode ser usada para diferenciar,

quantitativamente, o envelhecimento normal do cérebro da Doença de Alzheimer (West e cols., 1994) e se correlaciona fortemente com a duração e severidade da doença (Bobinski e cols., 1998).

Os mecanismos que resultam na morte neuronal na Doença de Alzheimer não estão claramente identificados. Vários estudos indicam que a apoptose neuronal é um importante componente deste mecanismo (Cotman & Anderson, 1995; Smale e cols., 1995) mas, não é o único. A fragmentação de DNA que ocorre nas células do hipocampo em cérebros acometidos pela Doença de Alzheimer não está, necessariamente, associada a uma proporção aumentada de células que apresentam as características morfológicas da apoptose, tendo sido postulado que a necrose pode desempenhar um papel igualmente importante da destruição celular associada à doença (Stadelmann e cols., 1998).

1.1.3. Diagnóstico

Os critérios clínicos para o diagnóstico de provável doença de Alzheimer incluem: demência estabelecida por exame clínico e documentada por exames de cognição e testes neuropsicológicos, déficits em duas ou mais áreas da cognição, piora progressiva da memória e de outras funções cognitivas, sem perturbações de consciência, início entre 40 e 90 anos de idade, e ausência de distúrbios sistêmicos ou outra doença cerebral que possa ser responsabilizada pelo declínio cognitivo progressivo. Este diagnóstico pode ser corroborado pela observação de deterioração progressiva de funções cognitivas específicas, como afasia, apraxia e agnosia; assim como história familiar de desordens similares, particularmente se confirmadas por exames neuropatológicos. Evidências laboratoriais, como punção lombar normal, eletroencefalograma normal e evidência por tomografia computadorizada de atrofia cerebral, reforçam o diagnóstico inicial. Entretanto, estes sintomas não seguem um padrão único; existem subgrupos neuropsicológicos envolvidos nesta doença (Martin e cols., 1986; Martin, 1987). A caracterização em subgrupos refere-se ao fato de que pacientes de Alzheimer podem apresentar padrões distintos de funções cognitivas preservadas e prejudicadas. Os subgrupos melhor documentados são aqueles com déficits semânticos e de correlação de palavras, ao mesmo tempo que apresentam

capacidades visuo-espaciais normais ou quase normais, e pacientes com o perfil oposto (Haxby e *cols.*, 1985; Martin e *cols.*, 1986; Martin, 1987; Fisher e *cols.*, 1996).

O diagnóstico definitivo da Doença de Alzheimer só pode ser feito utilizando evidência histopatológica, por biópsia ou autópsia (McKhann e *cols.*, 1984). Existe considerável subjetividade e discordância entre os neuropatologistas na determinação do diagnóstico de Doença de Alzheimer. Três razões principais podem explicar este fenômeno: a relação complexa e incerta entre o envelhecimento cerebral normal e a Doença de Alzheimer, o papel ambíguo do histórico clínico de demência no diagnóstico histopatológico da doença, e diferenças nos processos de coloração.

Apesar da existência de um amplo consenso na descrição dos sinais clássicos do cérebro acometido pela Doença de Alzheimer, uma substancial variação interindividual pode ser observada entre vários casos. Mais importante, vários estudos mostraram que a maioria dos indivíduos idosos apresentam EN no hipocampo mesmo na ausência de déficit cognitivo ou na presença de déficit de memória muito brando (Price e *cols.*, 1991; Arriagada e *cols.*, 1992a; Arriagada e *cols.*, 1992b; Hof e *cols.*, 1992; West e *cols.*, 1994). As PS podem aparecer precocemente no neocórtex de indivíduos cognitivamente preservados, enquanto o hipocampo é relativamente poupado pela formação de PS no início do processo neurodegenerativo (Pearson e *cols.*, 1985; Lewis e *cols.*, 1987; Hof e *cols.*, 1992). Se qualquer EN ou PS observada representa um processo patológico ou um fenômeno típico da idade, ainda é um assunto controverso. É um fato bem estabelecido que tanto a frequência de EN quanto a de PS em indivíduos cognitivamente intactos está fortemente relacionada à idade (Giannakopoulos e *cols.*, 1996).

Independentemente dessa controvérsia, existe um consenso que implica que o diagnóstico de Doença de Alzheimer deve ser baseado na severidade e distribuição das alterações patológicas, e não apenas na presença ou ausência de EN e PS. Tanto a perda neuronal quanto sináptica em córtices associativos são bons preditores da severidade da demência; entretanto, não são específicos para a Doença de Alzheimer e são difíceis de estudar, uma vez que se baseiam em deficiências presumidas a partir de uma estrutura normal. Além disso, as técnicas de preparação do tecido e contagem influenciam a avaliação (West & Gundersen, 1990; Gomez-Isla e *cols.*, 1996).

A evolução dos critérios neuropatológicos para a Doença de Alzheimer é marcada pela hesitação entre duas posições teóricas: a primeira considera que o diagnóstico neuropatológico de Doença de Alzheimer deveria apenas ser proferido na presença de demência clinicamente evidente; a segunda propõe uma nítida separação entre a definição neuropatológica da doença e sua expressão clínica. A vertente que une a neuropatologia e o diagnóstico clínico de demência está baseada em razões históricas, uma vez que o caso original descrito por Alzheimer em 1907 está baseado na presença de um histórico clínico de demência e formação abundante de EN e PS no córtex cerebral. Apesar da inclusão da demência como uma condição indispensável para o diagnóstico neuropatológico da Doença de Alzheimer apresentar a vantagem de diminuir a proporção de diagnósticos falsos-positivos, esta abordagem apresenta apreciável oposição na literatura corrente. De fato, se o diagnóstico neuropatológico da Doença de Alzheimer for dependente de impressões clínicas, então o mesmo é de pouco valor como “gold standard”. Além disso, o diagnóstico clínico da demência pode não ser sensível ou confiável nos estágios iniciais da doença. Uma vez que a Doença de Alzheimer é uma encefalopatia global e de progresso lento, é provável que o acúmulo de lesões abaixo do limiar clínico a torne assintomática por um longo período, talvez por anos (Hubbard *e cols.*, 1990; Hof *e cols.*, 1992; Bouras *e cols.*, 1993). Se estes casos forem considerados “negativos” pela ausência de demência, informações cruciais sobre os estágios mais iniciais da patogênese da doença podem permanecer desconhecidas (Hyman, 1997; Wisniewski & Silverman, 1997).

A terceira fonte de variação no diagnóstico neuropatológico da Doença de Alzheimer é o uso de diferentes procedimentos de coloração, particularmente na avaliação das PS (Vallet *e cols.*, 1992). A disseminação do uso de técnicas imunocitoquímicas torna possível a visualização de um maior número de lesões, incluindo placas difusas de P β A, assim como os diferentes tipos de PS. Entretanto, apesar da imunocitoquímica revelar mais alterações que os métodos histológicos clássicos, estas mudanças não se correlacionam tão bem com a severidade da doença (Wisniewski & Silverman, 1997). Na verdade, métodos que revelam uma grande quantidade de lesões não são necessariamente melhores, e deve-se manter em mente que métodos menos sensíveis podem permitir uma melhor diferenciação entre as categorias de classificação. Dependendo dos procedimentos de coloração, uma

quantidade excessiva de resultados falsos-positivos ou falsos-negativos pode ser obtida.

1.1.4. Fatores de risco

O maior fator de risco para a doença de Alzheimer é, sem dúvida, a idade. Estudos mostram que a incidência da doença aumenta de cerca de 13% entre pessoas com 77 a 84 anos de idade para 48% naqueles com mais de 95 anos de idade (Evans e cols., 1989; von Strauss e cols., 1999). Dados conjuntos de 4 grandes estudos norte-americanos (Framingham, East Boston, Rochester e Baltimore) mostram que a taxa de incidência idade-específica aumenta exponencialmente após os 65 anos de idade, dobrando a cada cinco anos, pelo menos até a idade de 90 anos (Brookmeyer e cols., 1998). Entre centenários, os dados são mais escassos, mas alguns estudos sugerem que a grande maioria desta população apresenta alguma demência, sendo a maior parte devida à Doença de Alzheimer (Ebly e cols., 1994; Asada e cols., 1996); outros estudos, entretanto, são mais encorajadores, colocando a incidência da Doença de Alzheimer abaixo de 30% em centenários (Sobel e cols., 1995; Perls e cols., 1999). Outro fator de risco é o histórico familiar; existe uma relação geral entre o histórico familiar positivo para doença de Alzheimer e o risco de incidência em parentes de primeiro grau. Esta associação é bem determinada para a doença de Alzheimer de início precoce, mas não é tão clara na Doença de Alzheimer tardia (Thal e cols., 1988). Na verdade, esta associação familiar para a forma de início tardio não é considerada significativa.

Entre outros fatores, também podemos destacar o sexo feminino (Nishihara & Ishii, 1986; Ojeda e cols., 1986; Wade e cols., 1987), embora este fato possa ser explicado em parte pela maior sobrevivência das mulheres afetadas em relação aos homens afetados (Beard e cols., 1994); o trauma encefálico também tem sido indicado como um fator de risco, após a descoberta de lesões do tipo Alzheimer em boxeadores afetados por demência pugilística (Graham e cols., 1996), apesar destas lesões estarem primariamente presentes em pacientes portadores do genótipo ApoE- ϵ 4.

A falta de educação formal também pode ser um fator de risco para Doença de Alzheimer, ainda que os dados disponíveis não sejam decisivos (Beard e cols., 1992). Dados recentes também apontam os níveis plasmáticos de homocisteína como um

fator de risco para a doença de Alzheimer (Seshadri e *cols.*, 2002). A descoberta de alumínio nas placas neuríticas incitou a investigação entre a possível ligação entre a exposição a este metal e o risco aumentado para a Doença de Alzheimer. Exposição a alumínio na água potável e em minas parece realmente aumentar a incidência da Doença de Alzheimer (Rifat e *cols.*, 1990; Doll, 1993; Jacqmin e *cols.*, 1994) mas o risco derivado de fontes como medicamentos e antitranspirantes não foi conclusivamente estabelecido (van Duijn, 1996).

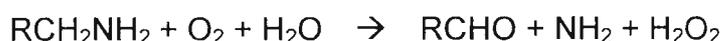
1.2. Doença de Alzheimer e Estresse Oxidativo

Independentemente da ordem de importância das alterações morfológicas no cérebro de paciente portadores de mal de Alzheimer, um corpo de evidência crescente associa a destruição neuronal observada nesta doença com a produção e ação de espécies reativas de oxigênio (ERO). O sistema nervoso central é particularmente suscetível a danos por radicais livres devido à sua alta taxa metabólica, elevado conteúdo de lipídios e uma relativa falta de enzimas antioxidantes quando comparado com outros tecidos (Coyle & Puttfarcken, 1993). Vários estudos correlacionam o mal de Alzheimer com peroxidação lipídica, observada como uma redução no colesterol e fosfolipídios de membrana na substância branca do tecido cerebral (Gottfries e *cols.*, 1986) hipocampo (Zubenko, 1986) e giro temporal superior (Mason e *cols.*, 1992). Outros estudos observaram um aumento significativo de lipoperoxidação no córtex frontal de pacientes com mal de Alzheimer, mas não no cerebelo, indicando que a peroxidação está restrita ao córtex nesta doença (Subbarao e *cols.*, 1990). Outros autores verificaram a existência de acroleína, um aldeído resultante do processo de lipoperoxidação, associada a proteínas em ENs, mas não em PSs (Calingasan e *cols.*, 1999).

Outro mecanismo de produção de ERO que tem sido associado ao mal de Alzheimer é aquele que envolve metais. Na maior parte dos estudos, observa-se que os níveis de ferro e ferritina no mal de Alzheimer estão significativamente elevados nas regiões corticais de massa cinzenta, facilitando a reação de Fenton e produzindo um excesso de ERO que pode causar lipoperoxidação (Connor e *cols.*, 1992). Um mecanismo que pode contribuir para este cenário é um trauma craniano severo, que pode causar a lise de células cerebrais e liberar reservas de ferro para a reação de

Fenton. A proteína quelante de ferro p97 (melanotransferrina) também se encontra elevada no cérebro, fluido cérebro-espinhal (FCE) e em certas regiões do cérebro no mal de Alzheimer, fortalecendo a evidência da influência do ferro na degeneração neuronal (Kennard e cols., 1996). Outro mecanismo de produção de ERO na doença de Alzheimer pode envolver o alumínio. Apesar do alumínio por si só não estimular a peroxidação lipídica, foi demonstrado que, em conjunção com Fe^{++} , o alumínio produz um aumento de 3 vezes na peroxidação em eritrócitos, lipossomos e frações microsomais de fígado de ratos (Quinlan e cols., 1988; Oteiza, 1994). Apesar destas evidências, o acúmulo de alumínio em neurônios em processo de degeneração não é um fenômeno universalmente observado (Graham e cols., 1978). Outros metais que também podem estimular a produção de ERO e potenciar o processo lipoperoxidativo neuronal são o mercúrio e o cobre (Stacey & Kappus, 1982). O citoplasma de neurônios vulneráveis mostram um marcado aumento no seu conteúdo de metais de transição (Kontush, 2001). Quelantes seletivos de cobre e zinco dissolvem depósitos de amilóide *in vitro*, e podem interromper a geração de ERO. Estes dados, em conjunto, podem indicar a importância destes metais como um fator de risco para o mal de Alzheimer.

Outra via de produção de ERO que pode estar envolvida na doença de Alzheimer é o catabolismo da dopamina (Cohen & Spina, 1989). Mais especificamente, tanto a autooxidação como a desaminação oxidativa da dopamina pela monoamina oxidase geram peróxido de hidrogênio e outras ERO em neurônios dopaminérgicos, segundo a seguinte reação (Graham e cols., 1978):



Por esta razão, o inibidor seletivo da monoamina oxidase B, a selegilina, tem sido investigado como um potencial agente terapêutico em uma série de estados neurodegenerativos, incluindo o mal de Alzheimer e doença de Parkinson.

A descoberta da presença de resíduos de nitrotirosina no cérebro de pacientes de mal de Alzheimer (Smith e cols., 1991; Good e cols., 1996) também implica o envolvimento do peroxinitrito ($ONOO^-$) produzido pela reação entre $O_2^{\cdot-}$ e NO^{\cdot} , na gênese do mal de Alzheimer. Outras evidências indiretas da sua influência incluem a indução da óxido nítrico sintase (iNOS) por P β A e a ativação por P β A e interferon- γ de

espécies reativas de nitrogênio (ERN) a partir da microglia (Meda e cols., 1995). A microglia é capaz de produzir diversas espécies de ERO e ERN, como parte do *burst* respiratório, podendo sua agregação ao redor das PSs também causar uma superprodução de espécies reativas (Colton & Gilbert, 1987). Isto pode levar, entre outros fenômenos, à oxidação de proteínas importantes para o funcionamento do cérebro (Beal, 2002).

Outros estudos demonstraram que o glutamato, um aminoácido excitatório, pode ser tóxico para as células nervosas (Behl e cols., 1992) fenômeno este conhecido como excitotoxicidade. A excitação de certos subtipos de receptores de glutamato, como o subtipo NMDA, pode causar um influxo excessivo de cálcio na célula e a ativação de enzimas proteolíticas, levando à morte do neurônio. Adicionalmente, um estudo verificou que a exposição de fatias de hipocampo de rato a superóxido e peróxido de hidrogênio induz a produção de glutamato (Pellegrini-Giampietro e cols., 1988) num mecanismo que pode complementar a peroxidação lipídica ou servir como via final comum para a morte celular. Também há evidências de que a presença de ERO causa a inativação da glutamina sintetase, a enzima responsável pela remoção do glutamato (Schor, 1988). Portanto, as ERO não só estimulam a produção de glutamato, como também diminuem sua taxa de degradação, o que amplia seu efeito neurotóxico.

Uma outra linha de evidência sugere que a agregação de P β A pode produzir ERO, sendo assim tóxica para as células nervosas (Behl e cols., 1992; Esposito e cols., 2002). Em um estudo, a exposição de neurônios a P β A durante uma hora, causou dano a mitocôndrias, complexo de Golgi e outras organelas membranosas. O relato de que os níveis de H₂O₂ aumentam 3 vezes após a adição de P β A a células nervosas (Behl e cols., 1994) indica que este dano é mediado por ERO e conecta um fator importante da doença de Alzheimer a ERO. Sabe-se também que a interação entre P β A e o radical ânion superóxido pode causar dano aos microvasos cerebrais; este processo pode levar ao desenvolvimento do mal de Alzheimer (Thomas, 1996). A existência de sítios que ligam metais de transição à P β A acrescenta mais evidências a esta linha de raciocínio (Lovstad, 1987; Schöneich, 2002). A localização dos sítios que ligam metais de transição e a dos que os reduzem em diferentes porções da P β A explica por que esta proteína apresenta um maior efeito pro-oxidante quando presente em agregados (Kontush, 2001). O envolvimento de metais de transição na produção de ERO por P β A

também pode explicar porque estudos de ESR falharam ao tentar detectar espécies reativas formadas espontaneamente pelo peptídeo *in vitro* (Turnbull e cols., 2001).

Existem estudos que associam a doença de Alzheimer a disfunções funcionais de vários componentes da cadeia de transporte de elétrons (Parker e cols., 1989; Parker e cols., 1990). Como a cadeia respiratória é a fonte mais importante de ERO no organismo, qualquer disfunção que afete a sua eficiência pode aumentar a produção de ERO. Este mecanismo também oferece uma explicação para os estranhos padrões de herança em mal de Alzheimer familiar, implicando a herança mitocondrial em parte do processo de desenvolvimento da doença. Vale lembrar que as regiões cerebrais mais atingidas pela doença de Alzheimer são aquelas que possuem taxa metabólica mais elevada e maior expressão de enzimas mitocondriais (Lai & Cooper, 1986; Chandrasekaran e cols., 1992; Mielke e cols., 1998).

Em relação aos antioxidantes enzimáticos, os estudos já realizados não evidenciam um padrão consistente. Alguns autores relatam níveis elevados de glutathione peroxidase, glutathione reductase e catalase no cérebro de pacientes de doença de Alzheimer (Lovell e cols., 1995). Outros verificaram que pacientes de mal de Alzheimer podem possuir níveis cerebrais elevados de Cu,Zn-SOD (superóxido dismutase dependente de Cu e Zn) e diminuídos de catalase (Frolich & Riederer, 1995). Outros ainda correlacionam a expressão de Cu,Zn-SOD com a modulação da atividade de células microgliais, inibindo a produção de NO^{\bullet} , $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ (Chang e cols., 2001). Entretanto, um aumento nos níveis de SOD (superóxido dismutase) sem um aumento proporcional nos níveis de catalase ou glutathione peroxidase, pode levar a um acúmulo de H_2O_2 , que é convertido em radical hidroxila; por outro lado, sabe-se que a deficiência de SOD também pode aumentar o risco de estresse oxidativo. Portanto, qualquer alteração no equilíbrio dinâmico de antioxidantes enzimáticos parece aumentar o risco de geração de ERO.

Ainda não há um consenso sobre a relação entre os níveis de antioxidantes não-enzimáticos e a doença de Alzheimer. Existem estudos mostrando que pacientes de síndrome de Down que apresentam mal de Alzheimer possuem níveis plasmáticos mais baixos de vitamina E, que pacientes controles (Jackson e cols., 1988). Células de Purkinje em mal de Alzheimer apresentam uma maior quantidade de proteína

transportadora de α -tocoferol que células de pacientes normais, sugerindo uma necessidade maior de antioxidantes na doença (Copp e cols., 1999). A vitamina E *in vitro* parece proteger as células nervosas contra a morte, a oxidação protéica e o acúmulo de ERO, induzidos por P β A (Yatin e cols., 1999). Existe também evidência de que antioxidantes não-enzimáticos podem proteger a integridade do receptor muscarínico, potencialmente protegendo contra disfunções cognitivas (Frey e cols., 1996). Os níveis de glutathiona total no cérebro, porém, não são alterados em pacientes de mal de Alzheimer quando comparados com controles (Perry e cols., 1987). De qualquer maneira, parece haver indícios de que a suplementação com vitamina E e vitamina C pode proteger os idosos contra a perda de função cognitiva (Masaki e cols., 2000; Behl & Moosmann, 2002; Engelhart e cols., 2002).

A relevância do dano causado pelas espécies reativas de oxigênio nas células cerebrais em mal de Alzheimer é atestado por trabalhos que estabelecem a ocorrência de aumento da oxidação de proteínas, lipídios e DNA nuclear e mitocondrial no cérebro (Mecocci e cols., 1994; Hensley e cols., 1995; Markesbery, 1997; Perry e cols., 2002) em conjunto com uma queda nos níveis de reparo de DNA oxidado (Lovell e cols., 1999) e um aumento geral no dano oxidativo ao DNA (Markesbery, 1997).

1.3. Inflamação

A inflamação é a reação do organismo à invasão por um agente infeccioso ou apenas reação a uma lesão física. Esta reação atrai leucócitos e moléculas plasmáticas para o local de infecção ou dano tecidual.

As reações que se desenvolvem nos tecidos em resposta ao dano ou à infecção são denominadas *reações inflamatórias*. Esta reação inflamatória pode ou não evoluir para uma resposta imunológica específica. Durante a reação inflamatória são identificados dois eventos diferenciados e que se relacionam: os eventos vasculares e os eventos celulares.

1.3.1. Eventos Vasculares

Os eventos vasculares ocorrem na microcirculação. Em condições normais a microcirculação é formada por arteríolas (30 a 40 μ m de diâmetro) que apresentam uma fina camada muscular. As arteríolas ramificam-se em vasos menores (7 μ m de

diâmetro, chamados de vasos capilares) os quais fazem a ligação entre os compartimentos arteriolar e venular da microcirculação. Alguns desses capilares são precedidos de esfíncteres pré-capilares que regulam a densidade sangüínea de uma determinada área da microcirculação. Assim, em condições normais, existem capilares em repouso, por onde o sangue não circula.

O rubor e o aumento de temperatura local que caracterizam as regiões de inflamação se devem a maior quantidade de sangue fluindo através dos vasos locais. O aumento do fluxo sangüíneo, por sua vez, se deve a uma fugaz vasoconstrição arterial, que logo é seguida por dilatação ativa e intensa das arteríolas, capilares e veias do local. Os esfíncteres pré-capilares se relaxam e, como conseqüência, numerosos capilares, que estavam fechados, em repouso, se abrem aumentando significativamente o número de capilares funcionantes. O edema associado é resultado da exsudação dos vasos a partir das vênulas.

Os capilares sangüíneos são revestidos por células endoteliais que apresentam junções intercelulares muito firmes. O aumento da permeabilidade capilar é causado pela retração das células endoteliais abrindo as junções intercelulares e, possivelmente também, pelo aumento no transporte vesicular através do endotélio. Isto permite que moléculas de maior peso molecular atravessem o endotélio, facilitando a chegada de anticorpo, complemento e moléculas de outros sistemas enzimáticos do plasma (sistema de coagulação, sistema fibrinolítico e sistema das cininas) no local da inflamação. Este aumento de líquido no local da inflamação leva a um aumento da drenagem linfática, o que pode ser benéfico por permitir que o agressor seja retirado e levado até linfonódos onde entra em contato com células do sistema imune adaptativo. Contudo não é necessário que nenhum destes vasos seja diretamente afetado pelo próprio agente inflamatório. A causa imediata de tais modificações é a ação local dos chamados mediadores químicos da reação inflamatória aguda. Estes mediadores são sistemas de enzimas plasmáticas, citocinas e produtos de mastócitos, plaquetas e leucócitos.

1.3.1.1. *Mediadores*

Aminas vasoativas: A histamina e a serotonina estão envolvidas na vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular no local da inflamação. A

liberação de histamina pelos mastócitos e basófilos e desencadeada por injúria tecidual, complexo antígeno-anticorpo e pelo sistema complemento.

Sistema de Coagulação: A função final do sistema de coagulação é a produção de fibrina, elemento essencial para a formação do trombo sangüíneo. Este sistema pode ser desencadeado por injúria tecidual ou por fatores liberados pelos tecidos, e tem como função durante a resposta inflamatória delimitar a área inflamada impedindo a rápida disseminação do agressor.

Sistema Fibrinolítico: Sua função dentro da coagulação sangüínea é de desfazer os trombos e deste modo manter um fluxo sangüíneo contínuo. Dentro da resposta inflamatória está envolvida na ativação do sistema complemento e participar do aumento da permeabilidade vascular.

Sistema Cininas: Este sistema de enzimas tem como função a ativação das plaquetas e produção de bradicinina e calicreína. A bradicinina é um potente agente vasoativo, produz vasodilatação, contração da musculatura lisa e produz dor. A calicreína é um agente quimiotático para neutrófilo.

Sistema Complemento: Este sistema participa da resposta imune adaptativa, porém pode ser ativado por uma via alternativa a partir de endotoxinas, lipopolissacarídios de parede bacteriana e por outros sistemas de enzimas plasmáticas. Têm função na opsonização de microorganismos, promove a degranulação de mastócitos e age como fator quimiotático de fagócitos.

Citocinas: as citocinas são um tipo especial de mediadores que podem ser produzidos pelas células do tecido afetado, e atraem linfócitos e fagócitos.

Produtos do metabolismo do ácido araquidônico: O ácido araquidônico é encontrado em fosfolipídios de membranas celulares em mastócitos, basófilos, macrófagos e células endoteliais. Os produtos gerados do metabolismo do ácido araquidônico são os leucotrienos e as prostaglandinas. As prostaglandinas agem na vasodilatação, inibem a agregação plaquetária, potencializam a dor, causam vasoconstrição e modulam a função de macrófagos. Os leucotrienos promovem quimiotaxia, aumento da permeabilidade vascular, agregação e pavimentação de leucócitos nas células endoteliais e vasoconstrição.

1.3.2. *Eventos celulares.*

As células fagocíticas fazem parte da resposta imune inata, compreendendo a primeira linha de defesa do organismo e, estão relacionadas com o processo de inflamação. Os fagócitos estão divididos em duas categorias: os monócitos/macrófagos e os granulócitos. Além destas células, a resposta imune é assessorada por inúmeras células com características bastantes distintas. As células acessórias incluem: células apresentadoras de antígenos, plaquetas, mastócitos e células endoteliais.

Em condições normais, os leucócitos circulam através de todos os tecidos do organismo. Cada grupo celular possui um padrão característico de migração. Quando há inflamação em um determinado local, uma reação de atração de leucócitos de diferentes populações para o tecido inflamado, é desencadeada. O aumento da permeabilidade vascular associado à dilatação do leito capilar e venoso, além de outros fatores como o aumento da adesividade das plaquetas e a hemoconcentração, colaboram para um progressivo retardo da circulação na área inflamada. Uma das consequências é a mudança no padrão de circulação. Em condições normais, os elementos figurados do sangue circulam no centro da corrente e o fluido circula em contato com o endotélio. Na inflamação, esta condição se modifica; as células passam a circular por toda a coluna sanguínea, facilitando o contato dos leucócitos com as células endoteliais. O processo de aproximação dos leucócitos à parede do vaso próximo ao local de inflamação é denominado *marginção dos leucócitos*, enquanto que sua adesão denomina-se *pavimentação* e sua passagem para o tecido chama-se *diapedese*. A migração para a área inflamada é direcionada por agentes quimiotáticos, que são produtos de origem variada, cuja ação resulta em marginção, pavimentação e diapedese de leucócitos para o tecido inflamado. São agentes quimiotáticos: os fragmentos do sistema complemento ativado, fatores derivados do sistema fibrinolítico, sistema cininas, produtos de leucócitos e plaquetas, e produtos de determinadas bactérias.

Na primeira fase de reação inflamatória, os neutrófilos são os mais numerosos leucócitos a serem recrutados ao local afetado, encarregando-se da fagocitose, por exemplo, de bactérias. Os neutrófilos morrem durante o processo de destruição do invasor. Outro efeito combinado de produtos de neutrófilos e endotoxinas bacterianas

(pirogênios) é a elevação da temperatura corporal. Outros leucócitos fagócitos, principalmente monócitos, são recrutados, secundariamente, para o local de inflamação. Os monócitos diferenciam-se localmente em macrófagos, fagocitando bactérias e restos teciduais. Com o tempo, as características da população celular no local da inflamação, mudam. Os macrófagos permanecem por um período de tempo mais longo do que os neutrófilos, no sítio inflamatório e, desempenham um papel importante na resposta imune, pois vão apresentar antígenos aos linfócitos. Os eosinófilos, os basófilos e linfócitos passam a atuar, principalmente, em estágios mais avançados da inflamação, desencadeando a resposta imune. A migração de grande quantidade de linfócitos para o local, vai permitir que o pequeno número de linfócitos específicos para cada antígeno, possa encontrar o antígeno.

1.4. Doença de Alzheimer e Inflamação

Existem várias evidências indicando que a evolução da doença de Alzheimer é acompanhada de um intenso processo inflamatório que se desenvolve nas vizinhanças das placas senis. O estudo dos papéis do sistema imune na Doença de Alzheimer revelou vários fatos intrigantes. Está bem claro que, pelo menos nos estágios finais da doença, o padrão de alterações celulares e moleculares, no interior e nas adjacências dos depósitos amilóides e neurônios em degeneração, lembra uma resposta inflamatória. A microglia encontra-se ativada, várias citocinas e moléculas de adesão celular pró-inflamatórias encontram-se aumentadas e o sistema-complemento encontra-se ativado (De Simone e cols., 1995; Walker e cols., 2001). Muitas destas modificações representam, provavelmente, uma resposta ao dano e à morte neuronal e, como tais, podem proteger ou colocar em risco os neurônios restantes. Por exemplo, a microglia pode produzir tanto produtos neurotóxicos, tais como óxido nítrico e excitotoxinas (Combs e cols., 2001) quanto agentes neuroprotetores, como TNF e TGF- β (Mattson e cols., 1997a). Adicionalmente, o processo inflamatório parece exercer efeitos bastante complexos sobre o processamento enzimático da PPA e, sobre a deposição e remoção da P β A (Gitter e cols., 2000; Xiang e cols., 2002; Sheng e cols., 2003)

Dados epidemiológicos preliminares e estudos clínicos sugerem que a administração de anti-inflamatórios não-esteroidais pode diminuir o risco para a Doença

de Alzheimer (Breitner, 1996; Mackenzie, 2001; Aisen, 2002) apesar de estudos mais recentes sugerirem que a atividade antioxidante destas drogas pode ser o mecanismo subjacente dos seus efeitos benéficos.

A primeira linha de evidência, sugerindo que processos inflamatórios desempenham um papel na patogênese da Doença de Alzheimer, é derivada das análises *post-mortem* de tecido cerebral de pacientes. Análises histológicas revelam a presença de vários mediadores inflamatórios, incluindo proteínas do sistema complemento e citocinas, em associação com placas amilóides e EN. Os primeiros estudos nessa direção (Eikelenboom & Stam, 1982) revelaram a presença de IgG e moléculas do sistema-complemento (C1q, C3b, C3c, C3d e C4) em placas. Estudos subseqüentes utilizando técnicas imunoenzimáticas demonstraram a ativação do sistema complemento nas placas (Eikelenboom *e cols.*, 1989). Estes achados foram reproduzidos em vários outros estudos (Ishii & Haga, 1984; McGeer *e cols.*, 1989). As proteínas do sistema complemento parecem localizar-se preferencialmente em placas clássicas, mas não em placas difusas (Afagh *e cols.*, 1996) ou em astrócitos ou microglia associados à placa. Proteínas de fase aguda podem ser encontradas tanto no tecido cerebral (Kalaria & Kroon, 1992; Kalaria & Perry, 1993) como no sangue (Giometto *e cols.*, 1988) de pacientes de Doença de Alzheimer.

Os níveis de $TNF\alpha$ também se encontram elevados na microglia associada às placas amilóides (Dickson *e cols.*, 1993) assim como os níveis circulantes desta citocina (Fillit *e cols.*, 1991) indicando uma condição sistêmica de fase aguda. Também os níveis de $TGF-\beta_1$ e $TGF-\beta_2$ encontram-se aumentados em PS e EN (van der Wal *e cols.*, 1993; Flanders *e cols.*, 1995) indicando um possível papel desta citocina na deposição de ambas as proteínas. Outras moléculas inflamatórias, que encontram-se em quantidades aumentadas em cérebros de pacientes de Doença de Alzheimer, incluem IL-6 e α -macroglobulina (Bauer *e cols.*, 1991; Griffin *e cols.*, 1998).

A ciclooxigenase-2 (COX-2) que catalisa a produção de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico, é um alvo importante para drogas anti-inflamatórias. A COX-2 está estimulada na microglia após dano cerebral ou exposição a lipopolissacarídeo, mas, diferentemente do que acontece em outros macrófagos periféricos, não é induzida por $TNF\alpha$, IL- 1β ou IL-6 (Bauer *e cols.*, 1997). Estes dados indicam que a microglia

pode ser uma importante fonte de prostaglandinas e, portanto, provavelmente desempenhar um papel importante nas respostas inflamatórias do cérebro. Apesar de alguns dados indicarem a diminuição dos níveis de RNAm para COX-2 no cérebro de pacientes de Doença de Alzheimer (Chang *e cols.*, 1996) estudos subsequentes mostram que a imunoreatividade para COX-2 está aumentada em neurônios piramidais do hipocampo de pacientes, quando comparados com controles de mesma idade; este aumento se correlaciona com a densidade das PS (Ho *e cols.*, 1999). Neste mesmo estudo, ficou demonstrado que neurônios de camundongos transgênicos, que superexpressam COX-2, são mais suscetíveis à toxicidade de P β A que neurônios normais, sugerindo que altos níveis de COX-2 na Doença de Alzheimer poderiam contribuir para o processo neurodegenerativo. De maneira geral, as cicloxigenases parecem desempenhar um papel importante na patogênese desta doença (Hoozemans *e cols.*, 2002).

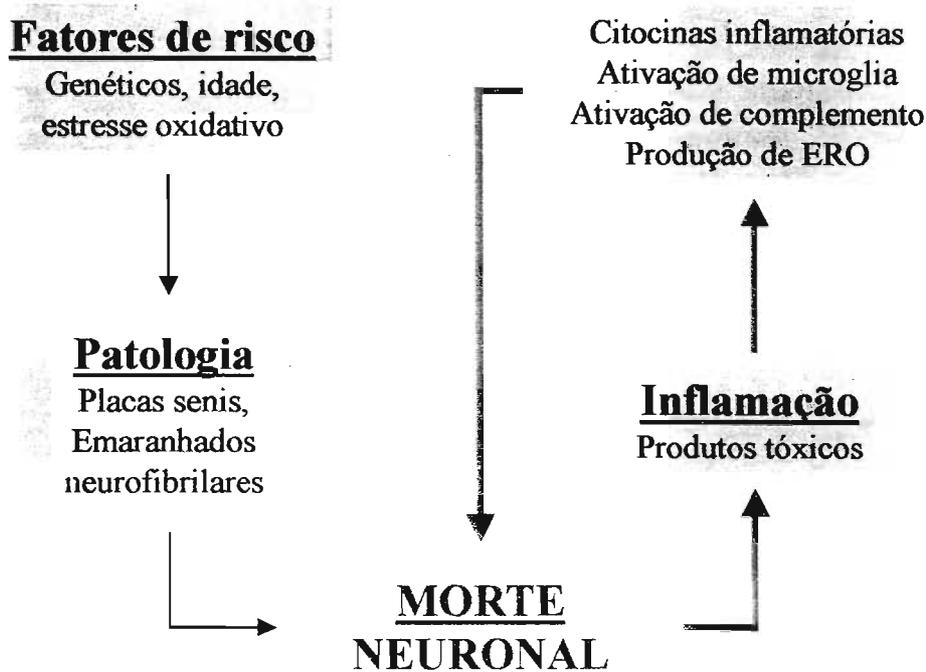
Entretanto, várias citocinas produzidas na resposta inflamatória podem possuir funções neuroprotetoras. Neurônios hipocámpais primários tratados com TNF α apresentam maior resistência à morte celular induzida por excitotoxicidade, danos oxidativos e exposição a P β A (Cheng *e cols.*, 1994; Barger *e cols.*, 1995). A via de sinalização celular que media os efeitos anti-apoptóticos e anti-excitotóxicos do TNF α envolvem a ativação do fator de transcrição NF- κ B, que induz a expressão de várias proteínas neuroprotetoras, incluindo Mn-SOD (superóxido dismutase dependente de manganês) e Bcl-2 (Mattson *e cols.*, 1997b; Yu *e cols.*, 1999; Mattson *e cols.*, 2000). O papel do TGF β é menos claro, com relatos de neuroproteção (Prehn *e cols.*, 1993; Chao *e cols.*, 1994) ou neurodegeneração (Finch *e cols.*, 1993; Wyss-Coray *e cols.*, 1995).

Alguns autores sugerem que o processo inflamatório cerebral na Doença de Alzheimer ocorre, mesmo antes da deposição de amilóide e dos processos neurodegenerativos (Eckert *e cols.*, 1996; Guo *e cols.*, 1999a; Guo *e cols.*, 1999b; Guo *e cols.*, 1999c) através de alterações na sinalização de cálcio. Este processo pode contribuir para o processo neurodegenerativo da doença.

O cérebro não somente é imunologicamente ativo por si só, como também realiza complexas interações imunológicas periféricas. Por exemplo, células microgliais

obtidas a partir de culturas são capazes de fagocitar fibrilas de amilóide, mas não de degradá-las (Frackoviak *e cols.*, 1992). Existem, inclusive, autores que propõem a microglia como produtora, ao invés de destruidora, das fibrilas de amilóide (Wisniewski & Wegiel, 1992). A sobrecarga fagocítica que se instala neste processo pode iniciar o estado inflamatório crônico que é encontrado na patologia da doença de Alzheimer. Mais de 40 proteínas, que não são específicas da doença de Alzheimer, já foram descritas em suas lesões, a maioria das quais associadas com o processo inflamatório (McGeer & McGeer, 2001). Estas incluem inibidores de complemento (Akiyama *e cols.*, 1991; McGeer *e cols.*, 1991; Kalaria & Kroon, 1992; McGeer *e cols.*, 1992) citocinas inflamatórias (Benveniste, 1992; Araujo & Lapchak, 1994; Wilson *e cols.*, 2002) e outras. Este padrão de ativação inflamatória também pode ser observado na decorrência da encefalopatia espongiiforme, uma outra forma de neurodegeneração que envolve proteínas (Eikelenboom *e cols.*, 2002). Adicionalmente, o processo inflamatório diminui o pH na sua vizinhança, estimulando a agregação da P β A e a formação de fibrilas de amilóide (Atwood *e cols.*, 1998). A inflamação também estimula a secreção de ceruloplasmina do fígado e acelera a transferência de cobre para o sítio inflamatório (Berton, 1993). Esta cascata pode representar uma importante fonte de cobre ativo em reações redox no mal de Alzheimer, devido à ativação microglial que acompanha esta doença (McRae *e cols.*, 1997). Existem indícios de que as ciclooxigenases da microglia também podem desempenhar um papel importante na patogênese do mal de Alzheimer (Hoozemans *e cols.*, 2002). Também é importante lembrar que as citocinas inflamatórias, por si próprias, podem ser capazes de alterar o estado cognitivo no envelhecimento (Wilson *e cols.*, 2002) assim como, estudos com vastatinas demonstraram a sua capacidade de inibir reações inflamatórias em células estimuladas por P β A (Sun *e cols.*, 2003).

Estes indícios apontam para uma hipótese inflamatória do desenvolvimento da doença de Alzheimer. Esta resposta inflamatória seguiria os moldes do esquema a seguir:



O efeito das espécies reativas de oxigênio nas células cerebrais em mal de Alzheimer é atestado por trabalhos que estabelecem a ocorrência de aumento da oxidação de proteínas, lipídios e DNA nuclear e mitocondrial no cérebro (Mecocci e cols., 1994), em conjunto com uma queda nos níveis de reparo de DNA oxidado (Lovell e cols., 1999). Apesar de todo o estudo realizado na caracterização das lesões e entendimento do processo que leva à demência no mal de Alzheimer, somente um estudo mostrou que o uso de vitamina E, pode retardar os sintomas mais graves da Doença de Alzheimer, o que vem reforçar o conceito de uma doença inflamatória (Sano e cols., 1997; Smith e cols., 2002). Várias abordagens promissoras ainda estão sendo estudadas, mas em estágios iniciais de pesquisa, como os isômeros R de antiinflamatórios não-esteroidais (Moriyama e cols., 2002). Uma das grandes esperanças dos últimos tempos, a vacina contra P β A, infelizmente mostrou ter efeitos colaterais inaceitáveis, enfatizando a falta de conhecimento sobre o papel desempenhado por cada molécula responsabilizada pela doença de Alzheimer (Check, 2002; Munch & Robinson, 2002; Senior, 2002; Bradbury, 2003). Também existe uma notável falta de dados sobre os fatores que indicam uma predisposição ao aparecimento do mal de Alzheimer, assim como poucos dados que correlacionem

parâmetros sistêmicos com a severidade da doença. Também não existem dados que correlacionem alterações em parâmetros oxidantes e antioxidantes com a evolução da doença em pacientes com sintomas brandos, dificultando a busca por fundamentos que justifiquem a variação na velocidade do declínio cognitivo nos pacientes e subsidiem a procura por um tratamento eficaz.

Tomados em conjunto, os dados expostos apoiam a noção que a doença de Alzheimer possui um componente inflamatório fundamental que envolve reações de ERO/ERN. Este componente parece estar ligado a um aumento da atividade da microglia cerebral podendo, inclusive, ser um dos mais suscetíveis a intervenção, na procura de um tratamento para esta doença. Entretanto, a avaliação da atividade da microglia durante o desenvolvimento da doença de Alzheimer em paciente humanos é impraticável devido à sua localização, sendo assim justificada a procura de modelos que utilizem parâmetros de fácil acesso e que, ao mesmo tempo, possam refletir o estado de ativação da microglia. Sendo esta microglia composta em grande parte de macrófagos provenientes da circulação (Cotran e *cols.*, 1999) e, tendo em vista que na circulação os macrófagos se encontram sob a forma de monócitos e, ainda, sabendo-se que tanto a microglia quanto os monócitos apresentam a mesma origem embrionária, o estudo destes últimos pode contribuir para o entendimento do componente inflamatório na patologia em questão, estabelecendo, ao mesmo tempo, a viabilidade da utilização de uma técnica minimamente invasiva, como uma coleta de sangue rotineira, para o acompanhamento da evolução da doença de Alzheimer.

2. OBJETIVOS GERAIS DO TRABALHO

Este trabalho tem por objetivo estudar, de forma comparativa, parâmetros plasmáticos, eritrocitários e monocitários representativos da atividade inflamatória e oxidativa em idosos que não apresentam déficit cognitivo e em idosos apresentando diagnóstico provável da doença de Alzheimer.

Existe um corpo crescente de evidências demonstrando que a doença de Alzheimer possui um componente inflamatório importante, que se desenvolve ao redor das placas senis. A atividade da microglia, que é a principal responsável por este quadro inflamatório cerebral, não pode ser avaliada diretamente, o que justifica a busca de parâmetros sanguíneos que possam avaliar esta atividade. Sob este prisma, os monócitos são as células circulantes mais diretamente relacionadas ao processo inflamatório que se desenvolve no mal de Alzheimer, uma que vez que estes são recrutados para a formação de nova microglia no processo inflamatório localizado.

Os parâmetros obtidos a partir da avaliação da atividade dos monócitos foram relacionados a uma série de parâmetros pró e antioxidantes plasmáticos e eritrocitários, indicativos de estresse oxidativo nos grupos a serem estudados. Os resultados obtidos podem auxiliar no entendimento da participação do componente inflamatório e pro-oxidante nesta patologia. Ao mesmo tempo, diferenças nos perfis antioxidantes entre os dois grupos estudados podem sugerir alternativas terapêuticas que retardem a evolução da doença.

3. SELEÇÃO DOS PACIENTES

Em 1991, iniciou-se o projeto de seguimento prospectivo de uma coorte de idosos residentes em zona urbana do município de São Paulo, denominado “Epidemiologia do Idoso” (EPIDOSO) que deu origem a amostra de idosos envolvidos no presente estudo. Sob a coordenação do Centro de Estudos do Envelhecimento da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (CEE) uma população inicial de 1667 idosos que continua sendo avaliada periodicamente, após mais de 10 anos de seguimento (Ramos e cols., 1998).

Os objetivos do projeto EPIDOSO foram os de avaliar a capacidade funcional dos idosos e identificar fatores de risco para a mortalidade geral que pudessem ser incorporados ao atendimento clínico desses pacientes, no nível primário de atenção à saúde. Foram considerados indivíduos idosos, para esse projeto, aqueles com idade igual ou superior a 65 anos entre 1991 e 1992. Neste período, foram realizadas entrevistas domiciliares, avaliação clínica no CEE e retorno para a coleta de exames laboratoriais. Esta metodologia foi repetida entre 1993 e 1994. Entre 1998 e 1999, houve a terceira onda de avaliações, nesta época centrada no CEE onde eram realizadas as entrevistas, por médicos que procediam a um exame físico (IMC – índice de massa corpórea, FC – frequência cardíaca, PA – pressão arterial, estado geral, avaliação cardiológica e neurológica). Todos realizavam exames laboratoriais, e uma parcela significativa foi examinada na densitometria óssea. Essa metodologia foi repetida na quarta onda, entre 2000 e 2001, com os 276 idosos ativos remanescentes.

3.1. Casuística

Os pacientes participantes deste estudo são parte integrante da última onda de dados do Projeto Epidoso (2000/2001) e que vem recebendo acompanhamento gerontológico no Centro de Estudos do Envelhecimento (CEE) da UNIFESP, por equipe interprofissional coordenada pelo geriatra.

Foram selecionados para este estudo 65 idosos, com idade média de 82 anos, que tiveram sua capacidade funcional e perfil laboratorial avaliados. Estes idosos foram, inicialmente, submetidos a um inquérito clínico realizado por geriatra, composto de anamnese, exame físico e avaliação da autonomia mental, através do grau de função cognitiva. Pacientes com histórico de doenças cardiovasculares, neoplasias ou

doenças inflamatórias crônicas foram excluídos deste estudo. Pacientes com alterações inflamatórias perceptíveis através da avaliação da velocidade de hemossedimentação (VHS) ou dos níveis plasmáticos de proteína C reativa (PCR) também foram eliminados do estudo. O projeto e protocolo de trabalho foi submetido à Comissão de Ética Médica da UNIFESP, tendo sido aprovado sob número: 0859/03 (Anexo I). Todos os pacientes, ou seus responsáveis, assinaram o consentimento informado (anexo II)

3.2. Avaliação da capacidade cognitiva dos pacientes

Para rastreamento de déficits cognitivos entre os pacientes, foi utilizado o “Mini-Mental State Examination”, idealizado por Folstein e colaboradores (1975) (Anexo III). Este teste é recomendado pelo NINCDS-ADRDA para detecção de possíveis casos de demência, embora não deva ser utilizado como único instrumento para diagnóstico da condição. Este teste avalia orientação temporal e espacial, registro, memória recente, capacidade de cálculo e atenção, linguagem, habilidade de seguir simples comando verbal e escrito e praxia. O MMSE é um instrumento universal, abrangente, simples e de rápida aplicabilidade, características que facilitam sua confiabilidade.

A máxima pontuação do MMSE é de 30 pontos. Pode-se usar notas de corte a faixa entre 24 e 26 pontos, abaixo da qual o teste indica algum tipo de disfunção cognitiva.

O resultado do MMSE é influenciado pela idade e pelo nível educacional do paciente. Portanto, este teste identifica dificuldades cognitivas, não devendo ser utilizado para diagnóstico formal (Crum e *co/s.*, 1993).

Os pacientes que obtiveram um resultado no MMSE inferior a 24 pontos foram então submetidos ao teste CDR (Clinical Dementia Rating) (Morris, 1993) (Anexo IV). Este teste avalia a influência da perda cognitiva na habilidade de conduzir as atividades da vida diária. É um exame que não necessita de notas de corte estabelecidas pelo desempenho populacional, pois os indivíduos são aferidos em comparação com seu próprio desempenho no passado. Este instrumento é derivado de uma entrevista com um parente ou pessoa muito próxima que convive diariamente com o paciente. O CDR se divide em seis categorias: memória, orientação, julgamento e solução de problemas, relações comunitárias, lar e hobbies e cuidados pessoais.

Cada categoria é classificada, segundo a entrevista, em: 0 – nenhuma alteração; 0,5 – questionável; 1 – alteração leve; 2 – alteração moderada; 3 – alteração grave. Esta classificação, para cada categoria, recebe a designação “box score”. Das análises dos “box scores” pode-se obter o resultado final do teste, que pode variar entre 0 e 3. Um resultado de 0 indica um indivíduo cognitivamente normal; 0,5, um indivíduo de normalidade cognitiva questionável; 1, um indivíduo com leve demência; 2, indivíduos com demência moderada; e 3, indivíduos com demência grave.

O CDR foi baseado em outras escalas e em testes psicométricos, ou seja, critérios clínicos validados para Doença de Alzheimer (Burke e cols., 1988; McCulla e cols., 1989; Rubin e cols., 1989; Forsell e cols., 1992; Morris, 1993; Daly e cols., 2000).

Os pacientes que obtiveram uma pontuação inferior a 1 no teste de CDR foram considerados cognitivamente íntegros (grupo INT), enquanto aqueles que obtiveram resultados iguais ou superiores a 1 ponto foram incluídos nos grupos de pacientes com provável Doença de Alzheimer (grupo DA)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Tratamento e coleta das amostras de sangue

Amostras de sangue dos participantes foram obtidas após 12 horas de jejum, tendo sido sangue venoso colhido em heparina (2 tubos de 10 mL).

Parte do sangue total foi utilizada para execução das técnicas de citometria de fluxo. O restante foi utilizado para separar o plasma dos elementos figurados do sangue. Após separação do plasma, os eritrócitos foram resuspensos em tampão fosfato de sódio 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 (PBS) centrifugados a 500 x g por 10 minutos, entre 0°C e 4°C. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. Parte do sedimento de eritrócitos, *pellet*, resultante da última lavagem foi então utilizado para a medida de conteúdo total de glutathiona (GSH) e o restante hemolisado para a avaliação da atividade de enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD) catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) e, medida da concentração de hemoglobina.

Amostras de plasma (500µL) foram armazenadas a -80°C, para posterior determinação de α -tocoferol, β -caroteno, licopeno, coenzima Q10 e vitamina C. O plasma também foi utilizado para a determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT) e nível de proteínas oxidadas, expressas como carbonilas plasmáticas.

4.2. Avaliação das enzimas antioxidantes eritrocitárias

4.2.1. Preparo do hemolisado

A 0,4 mL do *pellet* eritrocitário lavado foram adicionados 3,6 mL de solução hemolisante (β -mercaptoetanol 0,7mM, EDTA 2,7mM, pH 7,0) (Beutler, 1975). O tubo contendo esta mistura foi imerso em uma mistura de gelo seco-acetona até o completo congelamento. Logo a seguir foi descongelado a temperatura ambiente. Esta etapa foi repetida 3 vezes e ao final o hemolisado foi centrifugado a 27000 x g por 30 minutos, em centrífuga refrigerada. A fração sobrenadante constituiu o hemolisado e foi utilizado para medir a atividade das enzimas. Para o cálculo das atividades específicas determinou-se a concentração de hemoglobina nos hemolisados.

4.2.2. Dosagem de Hemoglobina

A quantidade de hemoglobina (Hb) nos hemolisados foi determinada usando solução de Drabkin modificada (Van Kampen & Zizlstra, 1961). Neste método, os compostos de Hb, com exceção da sulfahemoglobina, são rapidamente convertidos à cianometahemoglobina, sob a ação de cianeto e ferricianeto de potássio. O cálculo final da concentração de Hb foi realizado utilizando-se um fator de calibração, obtido através de curva padrão, de Hb comercial (Labtest). A concentração de Hb nos hemolisados foi expressa em mg/ mL.

4.2.3. Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

4.2.3.1. *Cu,Zn-Superóxido dismutase (E.C. 1.15.1.1)*

A atividade desta enzima foi determinada segundo o método descrito por McCord & Fridovich (1969). O sistema gerador de ânion superóxido é a reação catalisada pela xantina oxidase, que ao promover a transformação de xantina em ácido úrico, transfere um elétron para o O_2 molecular, produzindo $O_2^{\cdot-}$. Esta reação é acoplada à redução do citocromo c pelo $O_2^{\cdot-}$, medindo-se o aumento de absorbância em 550 nm, a 25°C. A adição de superóxido dismutase (SOD) promove uma inibição na velocidade de redução de citocromo c, uma vez que a SOD compete com o citocromo, pelo $O_2^{\cdot-}$, dismutando-o a H_2O_2 .

Os resultados foram expressos em Unidades/ mg de Hb. Uma unidade (U) de SOD foi definida como a quantidade da enzima que promove 50% de inibição na redução do citocromo c, por minuto, a 25°C, em pH 7,8.

4.2.3.2. *Catalase (E.C. 1.11.1.6)*

A catalase (CAT) é uma enzima que promove a decomposição do H_2O_2 em H_2O e O_2 . A técnica empregada para medir a sua atividade foi descrita por Beutler (1975) que quantifica a velocidade de decomposição da H_2O_2 pela enzima, através do decréscimo de absorbância a 230 nm ($\epsilon = 0,071 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) a 37°C. Os valores de atividade da catalase foram expressos em U/ mg de Hb. Uma unidade de catalase corresponde a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de H_2O_2 / minuto, a 37°C, em pH 8,0.

4.2.3.3. *Glutathione peroxidase (E.C. 1.11.1.9)*

A glutathione peroxidase (GPx) catalisa a redução do H_2O_2 , bem como de outros hidroperóxidos, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como co-substrato, produzindo glutathione oxidada (GSSG). A atividade da GPx no hemolisado foi medida pela técnica descrita por Sies *et al.* (1979) método que baseia-se na medida do decréscimo de absorvância, promovido durante a redução da GSSG, catalisada pela glutathione reductase, em presença de NADPH. A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG a partir de GSH, em presença de peróxido, catalisada pela GPx ($\epsilon=6,22mM^{-1}.cm^{-1}$). Os resultados foram expressos em U/ g de Hb, onde uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que oxida 1 μ mol de NADPH/ minuto, a 37°C, em pH 8,0.

4.3. Medida da concentração plasmática de antioxidantes de baixo peso molecular

4.3.1. Medida de α -tocoferol, β -caroteno, licopeno e coenzima Q10

4.3.1.1. Preparo dos padrões

Os padrões de α -tocoferol, β -caroteno e licopeno foram dissolvidos em clorofórmio e diluídos em etanol para uma concentração final de aproximadamente 1 μ M (Motchnik e cols., 1994). A concentração precisa de cada solução padrão foi determinada espectrofotometricamente utilizando os seguintes coeficientes de extinção:

α -tocoferol	292 nm	$\epsilon^{1\%} = 75.8 \text{ litros.mol}^{-1}.cm^{-1}$	P.M.: 430.6
β -caroteno	453 nm	$\epsilon^{1\%} = 2620 \text{ litros.mol}^{-1}.cm^{-1}$	P.M.: 536.9
Licopeno	472 nm	$\epsilon^{1\%} = 3450 \text{ litros.mol}^{-1}.cm^{-1}$	P.M.: 536.9
Coenzima Q10	290 nm	$\xi^{1\%} = 46.4 \text{ litros.mol}^{-1}.cm^{-1}$	P.M.: 863.4

Todos os padrões se mantiveram estáveis por vários meses a - 80°C.

4.3.1.2. Determinação de α -tocoferol, β -caroteno, licopeno e coenzima Q10.

As concentrações plasmáticas de α -tocoferol, β -caroteno e licopeno foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) após extração destas vitaminas com hexano (Lang e cols., 1986). O procedimento utilizado para a extração do plasma foi o descrito por Burton (1985) e por nós modificado. Uma alíquota de 100 μ L de plasma foi agitada em vórtex por 30 segundos com 300 μ L de metanol e adicionado 4 mL de hexano. Após nova agitação em vórtex por 2 minutos, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 1000 x g para a separação das camadas. Uma alíquota de 2,5 mL da camada de hexano (superior) foi transferida para outro tubo e seca sob nitrogênio. O resíduo da secagem foi resuspenso em 0,5 mL de metanol:etanol 1:1 (v/v) e filtrado (poro 0.22 μ m).

A análise dos antioxidantes extraídos do plasma foi realizada por HPLC utilizando-se um detector eletroquímico com potencial de oxidação de 0,6 V, acoplado a um sistema isocrático de distribuição Waters 510 (Buttriss & Diplock, 1984). As amostras foram injetadas através de um sistema Rheodyne (*loop* de 20 μ L) em uma coluna C-8 Nova Pak de 4 μ m (3,9 x 150 mm) com fluxo de fase móvel de 1,0 mL/min. A fase móvel se consistiu de uma solução de 20 mM de perclorato de lítio em metanol/água 98:2 (v/v). Os picos foram analisados contra os padrões de cada vitamina, utilizando os respectivos tempos de retenção. As quantidades de cada antioxidante foram calculadas por comparação entre a área da amostra e a área do respectivo padrão, de concentração conhecida. Os resultados foram expressos em μ M. A figura 8 mostra um cromatograma padrão da análise descrita acima.

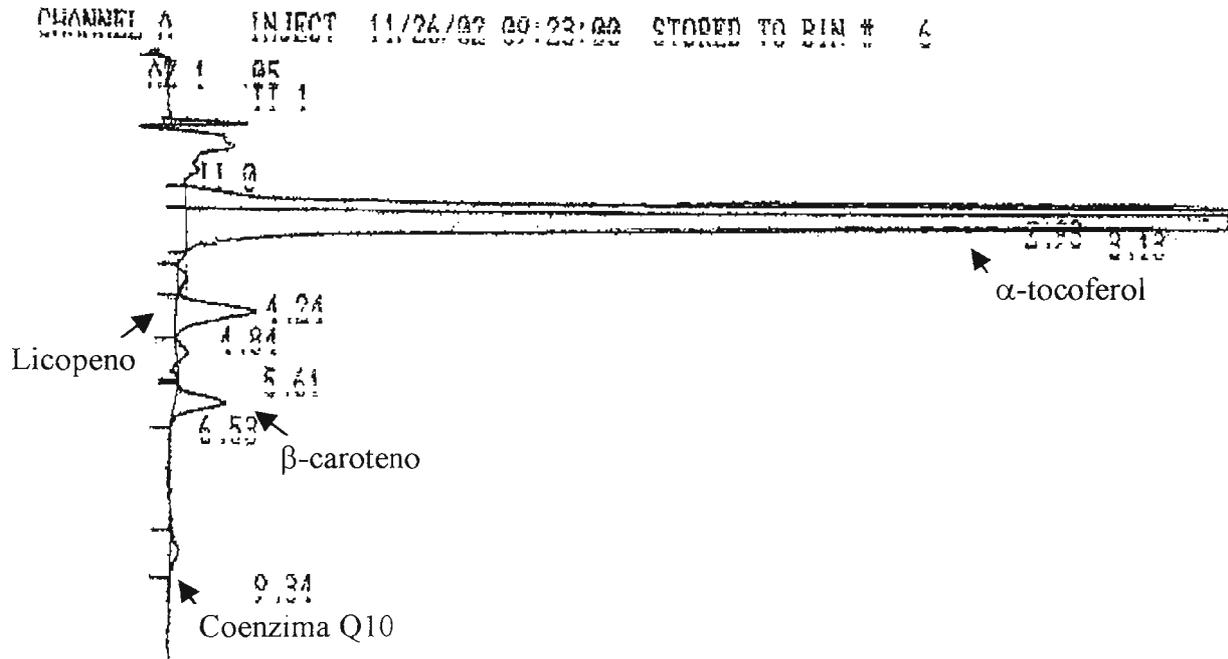


Figura 8. Cromatograma padrão da análise de α -tocoferol, β -caroteno, licopeno e coenzima Q10.

4.3.2. Medida da concentração plasmática de vitamina C

A determinação da concentração plasmática de vitamina C foi realizada de acordo com Wagner *et al.* (1979). As amostras de plasma, previamente armazenadas a -80°C (máximo 5 dias) foram extraídas com ácido metafosfórico (HPO_3) 10%. 300 μL de amostra são adicionadas de 900 μL de HPO_3 , agitadas em vórtex por 30 segundos e centrifugadas por 5 minutos a $15.600 \times g$. Após a diluição do sobrenadante na fase móvel (200 μL do sobrenadante em 600 μL de ácido metafosfórico 0,8 %) as amostras foram filtradas em membrana de poro 0,22 μm , injetadas em sistema Rheodyne (*loop* de 20 μL) e separadas em coluna C-18 $\mu\text{Bondapak}$ (3,9 x 300 mm) com fluxo de fase móvel de 0,7 mL/min. A fase móvel se consistiu de uma solução de ácido metafosfórico 0,8%, preparada em água MiliQ. A determinação foi realizada com auxílio de um detector UV/visível no λ : 235 nm. Os picos foram analisados contra o padrão da vitamina C injetado no mesmo dia. A concentração de vitamina C na amostra foi calculada por comparação entre a área da amostra e a área do padrão, de concentração conhecida. Os resultados foram expressos em μM . A figura 9 mostra um cromatograma padrão desta análise.

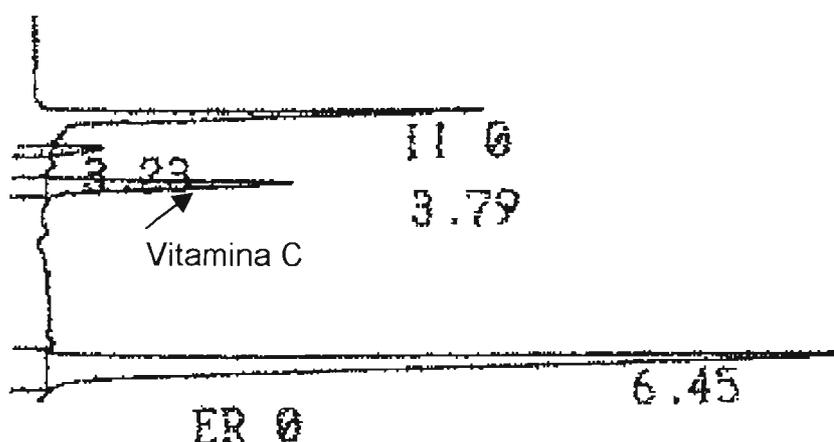


Figura 9. Cromatograma padrão da análise de vitamina C

4.4. Medida da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT) no plasma.

Esta técnica determina, colorimetricamente, o produto de reação entre o ácido tiobarbitúrico e os aldeídos produzidos durante a oxidação de lipídios. O procedimento utilizado foi o descrito por Ohkawa e cols. (1979). Os resultados foram expressos por η moles de SRAT/ mL de plasma.

4.5. Glutathiona total

Parte do *pellet* eritrocitário, diluído em igual volume de tampão de lavagem, foi utilizado para a quantificação da glutathiona total eritrocitária (Tietze, 1969). Os resultados foram expressos em η moles de glutathiona / mg de hemoglobina.

4.6. Oxidação de proteínas plasmáticas

A quantidade de proteína oxidada circulante no plasma foi medida pela quantificação das carbonilas proteicas no plasma, utilizando-se enzima-imunoensaio segundo Buss e cols. (1997). Neste método, a amostra de proteína a ser analisada é incubada com dinitrofenilhidrazina (DNPH) que reage com carbonilas proteicas e, então, é aderida a uma microplaca de 96 poços. A seguir a microplaca é incubada com anticorpo anti-DNP conjugado com biotina. Posteriormente, adiciona-se aos poços um conjugado de estreptavidina (que reage com a biotina do anticorpo conjugado) e peroxidase de raiz-forte. A adição de ortofenildiamina (OPD) e H_2O_2 aos poços resulta

na produção de cor à medida que a peroxidase oxida o OPD, proporcionalmente à quantidade de proteína oxidada presente em cada poço. Após 5 minutos, a reação da peroxidase é interrompida mediante a adição de ácido sulfúrico 2,5M aos poços. As absorbâncias foram medidas em um leitor de microplacas utilizando-se o filtro de 490 nm. O cálculo da quantidade de proteína oxidada em cada amostra é baseado na comparação da absorbância obtida com aquelas obtidas a partir uma curva-padrão contendo proporções variáveis de albumina bovina reduzida com NaBH₂ e albumina bovina oxidada com HOCl.

4.7. Parâmetros inflamatórios e oxidativos em monócitos

4.7.1. Marcadores de ativação celular em monócitos

Para a avaliação da ativação basal dos monócitos circulantes, avaliamos a expressão das proteínas de membrana HLA-DR (ativação celular) e CD-11b (molécula de adesão) por meio de citometria de fluxo (Brunialti e cols., 2002). Alíquotas de sangue total foram incubadas com os seguintes anticorpos monoclonais para moléculas de superfície, marcados com fluorocromos: anti CD66b-isotiocianato de fluoresceína (FITC), da PharMingen; anti CD14-proteína de clorofila peridina (PerCP), da BDIS; anti HLA-DR-ficoeritrina (PE), da BDIS; anti CD11b-aloficocianina (APC), da BDIS. Controles foram realizados com isotipos para os anticorpos anti HLA-DR e CD11b. Após incubação no escuro por 15 minutos, a temperatura ambiente, os eritrócitos foram lisados (solução de lise FACS, BDIS). As células foram lavadas com solução PBS e ressuspendidas em PBS 1% NaN₃.

4.7.2. Produção intracelular de IL-1 α , IL-6 e TNF- α

A produção intracelular de IL-1 α , IL-6 e TNF- α foi quantificada em monócitos estimulados por LPS, por citometria de fluxo (Brunialti e cols., 2002). Alíquotas de sangue total foram diluídas 1:2 em meio RPMI (Sigma), adicionado de glutamina, e incubadas com LPS (concentração final 100 ng/mL) em estufa de CO₂ 5%, a 37°C. Alíquotas controle foram incubadas na ausência do estímulo. Após uma hora de incubação, adicionou-se monensina em todos os tubos de amostra, que foram incubados por mais 5 horas, nas mesmas condições. Ao término do período de incubação, as amostras foram lavadas com PBS e os eritrócitos foram lisados (solução de lise FACS, BDIS). As células foram novamente lavadas e incubadas com os

anticorpos monoclonais de superfície celular, marcados com fluorocromo, anti CD66b-FITC e anti CD14-PerCP. As células foram então lavadas e fixadas (PBS 4% paraformaldeído) por 20 minutos a 4°C. Os tubos foram centrifugados, o sobrenadante descartado, as células ressuspendidas em solução tamponante (PBS 1% soro fetal bovino; 0,1% NaN₃) e estocadas overnight a 4°C. No dia seguinte, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em solução permeabilizante (PBS 1% soro fetal bovino; 0,1% NaN₃; 0,1% saponina). As amostras foram incubadas com os anticorpos monoclonais para citocinas, marcados com fluorocromo: anti IL-1 α -PE (BDIS); anti IL-6-PE (BDIS); e anti TNF α -APC (PharMingen), ou seus respectivos isotipos, por 30 minutos, a 4°C. Após mais uma lavagem com PBS, as células foram ressuspendidas em solução tamponante e levadas para aquisição.

4.7.3. *Metabolismo oxidativo*

Amostras de sangue total foram primeiramente marcadas com anti CD14-PerCP. As células foram então lavadas com PBS e incubadas com 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) um composto estável, não-fluorescente, que se difunde para dentro das células e é hidrolisado a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH). A incubação foi realizada em banho a 37°C no escuro, por 30 minutos, sob agitação. Dentro das células, o DCFH é rapidamente oxidado para DCF na presença de H₂O₂, emitindo níveis elevados de fluorescência verde. A reação é quantitativamente relacionada à concentração de H₂O₂ e, como o DCF é um composto fluorescente polar, ele permanece preso dentro da célula (Hasui e cols., 1989). Após a incubação, a reação foi interrompida com a adição de EDTA 3mM. As células foram centrifugadas e os eritrócitos lisados por hipotonicidade (três seqüências alternadas de NaCl 0,2% por 30 segundos, NaCl 1,6% e centrifugação). A células foram ressuspendidas em PBS contendo EDTA 3mM e levadas imediatamente para leitura no citômetro de fluxo.

4.7.4. *Aquisição de eventos em citometria de fluxo*

Cerca de 5000 monócitos foram adquiridos para cada tubo dos ensaio descritos, baseado em sua marcação com CD14-PerCP. Com exceção do ensaio de metabolismo oxidativo, os neutrófilos foram identificados e excluídos da população de monócitos por sua marcação com CD66b-FITC. Para o ensaio de metabolismo oxidativo, os neutrófilos foram identificados por seu posicionamento característico em um gráfico de

dispersão frontal x lateral de luz. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (BDIS) utilizando software de análise CellQuest (BDIS). A expressão dos marcadores de superfície foi analisada por histogramas e a de interleucinas intracelulares, por gráficos dot-plot.

4.8. Análise estatística

A normalidade da distribuição dos dados foi aferida através do teste de Shapiro-Wilk. A comparação entre as médias de resultados dos grupos foi realizada utilizando-se o teste t de Student para amostras independentes. A análise da correlação entre os dados foi feita através do teste de correlação de Spearman.

5. RESULTADOS

A figura 10, mostra os valores de atividade específica da Cu, Zn-SOD eritrocitária nos grupos estudados. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativa entre os grupos estudados.

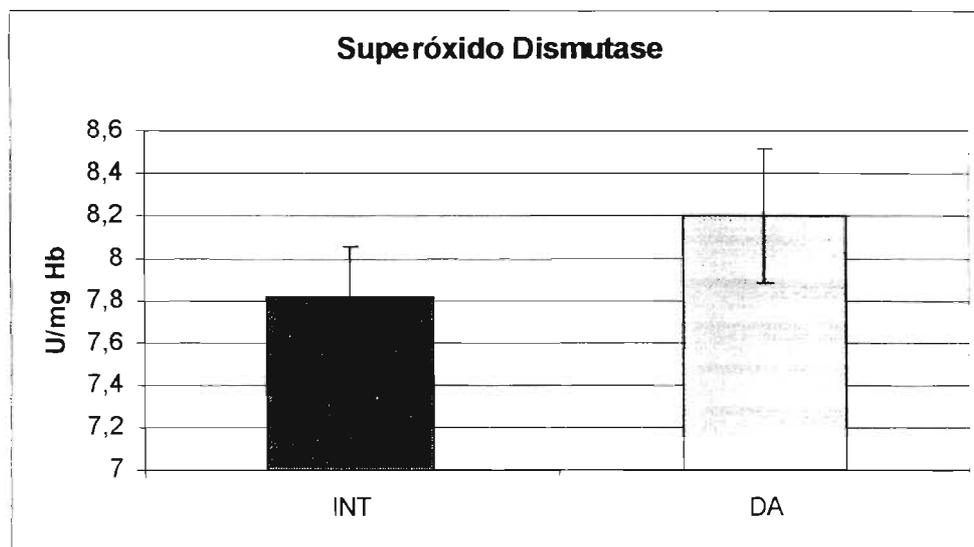


Figura 10. Atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária nos grupos estudados (INT – Pacientes cognitivamente intactos; n=42. DA – Pacientes com provável Doença de Alzheimer; n=23). Os valores encontram-se expressos como média \pm erro padrão da média.

A figura 11 mostra a média das atividades específicas da catalase eritrocitária obtidas para os grupos estudados. Também neste caso, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados.

A figura 12 mostra os valores médios obtidos para a atividade da enzima eritrocitária glutathiona peroxidase nos grupos estudados. Como nos casos anteriores, estes valores não diferiram de maneira significativa na comparação entre os grupos.

Como ilustrado na figura 13, os valores de glutathiona total eritrocitária também foram comparáveis entre os grupos estudados.

A figura 14 representa a média dos valores obtidos na avaliação do conteúdo plasmático de produtos de lipoperoxidação, medidos como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT). Mais uma vez, a comparação dos valores não revelou diferenças significativas para este parâmetro entre os grupos estudados.

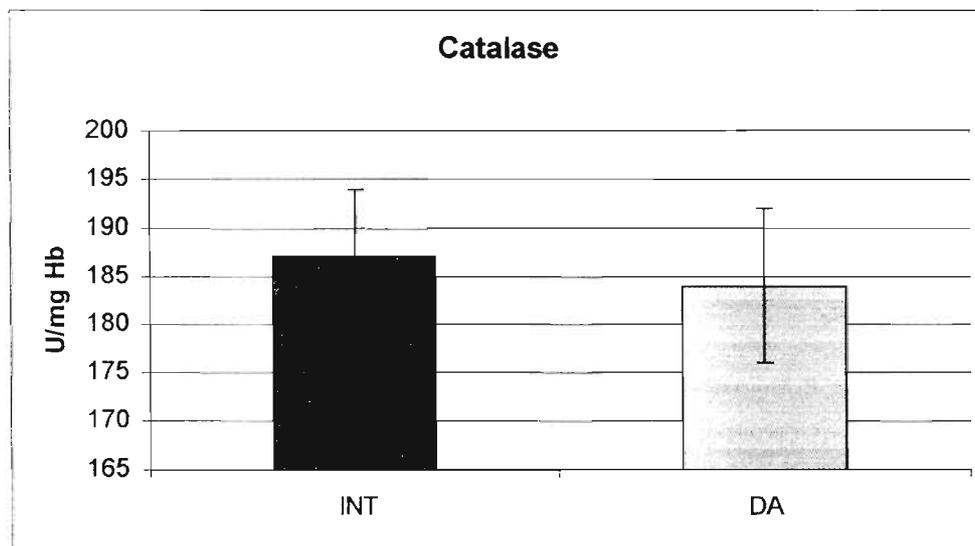


Figura 11. Atividade da enzima catalase eritrocitária nos grupos estudados. (INT – Pacientes cognitivamente intactos; n=42. DA – Pacientes com provável Doença de Alzheimer; n=23). Os valores encontram-se expressos como média \pm erro padrão da média.

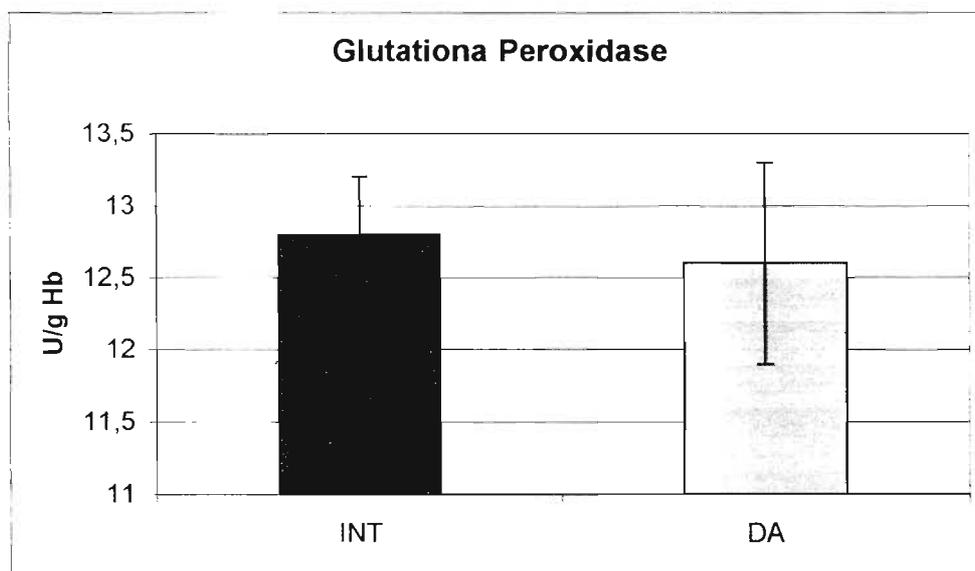


Figura 12. Atividade da enzima glutathione peroxidase eritrocitária nos grupos estudados (INT – Pacientes cognitivamente intactos, n=42. DA – Pacientes com provável Doença de Alzheimer; n=23). Os valores encontram-se expressos como média \pm erro padrão da média.

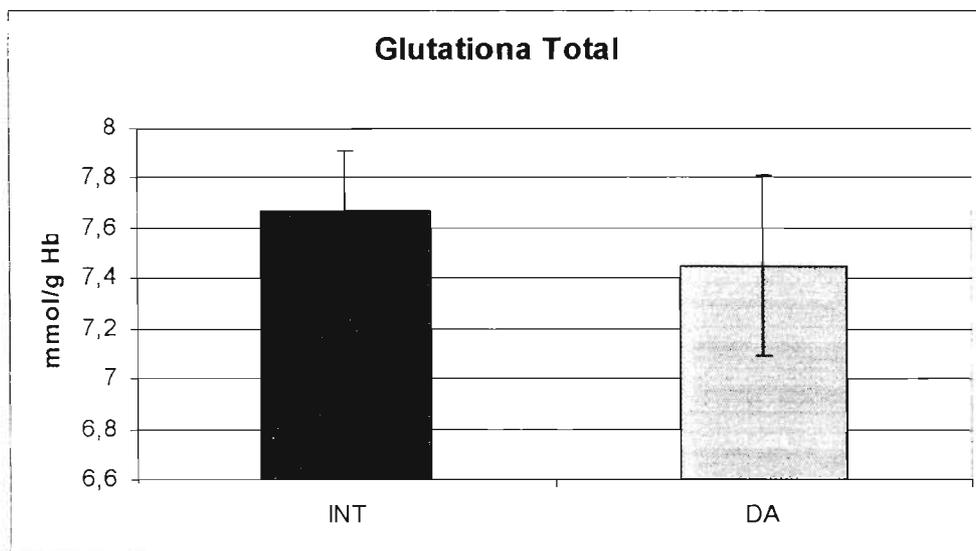


Figura 13. Conteúdo de glutaciona total eritrocitária nos grupos estudados (INT – Pacientes cognitivamente intactos; n=42. DA – Pacientes com provável Doença de Alzheimer; n=23). Os valores encontram-se expressos como média \pm erro padrão da média.

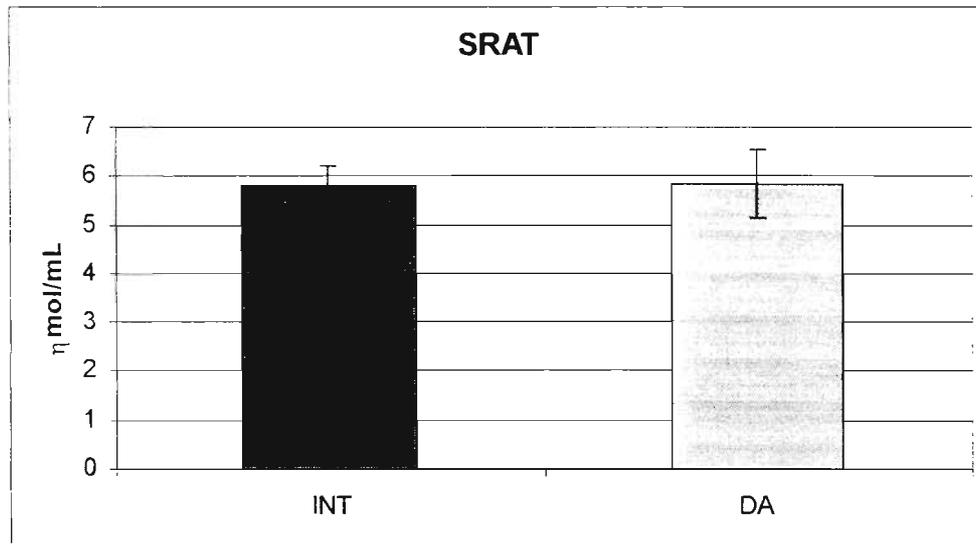


Figura 14. Conteúdo plasmático de produtos de lipoperoxidação, expresso como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT) nos grupos estudados (INT – Pacientes cognitivamente intactos; n=42. DA – Pacientes com provável Doença de Alzheimer; n=23). Os valores encontram-se expressos como média \pm erro padrão da média.

A figura 15 mostra a média dos valores obtidas na quantificação do nível de oxidação das proteínas plasmáticas, avaliadas como quantidade de carbonilas proteicas circulantes. Os grupos avaliados não diferem significativamente em relação a este parâmetro.

Os níveis de vitamina C plasmática nos dois grupos foram equivalentes, como ilustrado na figura 16.

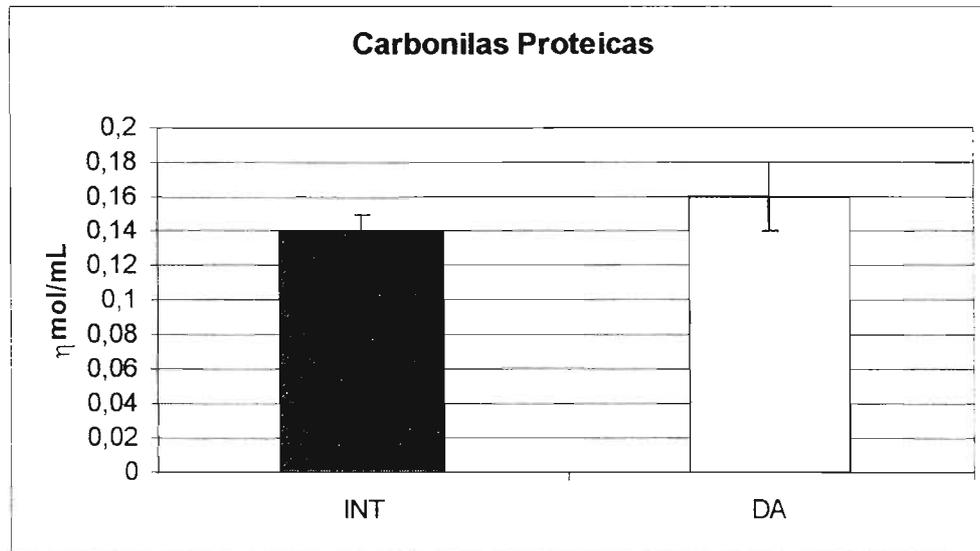


Figura 15. Conteúdo plasmático de carbonilas proteicas nos grupos estudados (INT – Pacientes cognitivamente intactos; n=42. DA – Pacientes com provável Doença de Alzheimer; n=23). Os valores encontram-se expressos como média \pm erro padrão da média.

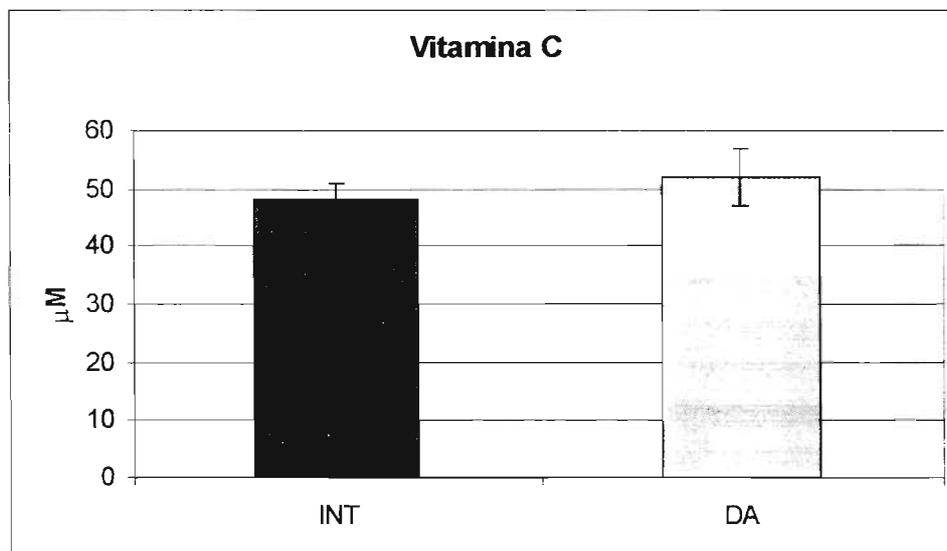


Figura 16. Níveis plasmáticos de Vitamina C nos grupos estudados (INT – Pacientes cognitivamente intactos; n=42. DA – Pacientes com provável Doença de Alzheimer; n=23). Os valores encontram-se expressos como média \pm erro padrão da média.

Na figura 17, encontramos os valores médios dos níveis circulantes de vitamina E, nos dois grupos de pacientes estudados. Nota-se que os valores de vitamina E circulante são cerca de 20% mais baixos no grupo de pacientes com provável Doença de Alzheimer, quando comparados com os pacientes cognitivamente intactos. Esta diferença é estatisticamente significativa.

Na figura 18, pode-se observar que os dois grupos analisados possuem níveis plasmáticos similares de β -caroteno. Da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de licopeno plasmático entre os grupos estudados (figura 19).

De maneira similar, os níveis plasmáticos de coenzima Q10 nos grupos estudados é similar (Figura 20) não apresentando diferenças significativas.

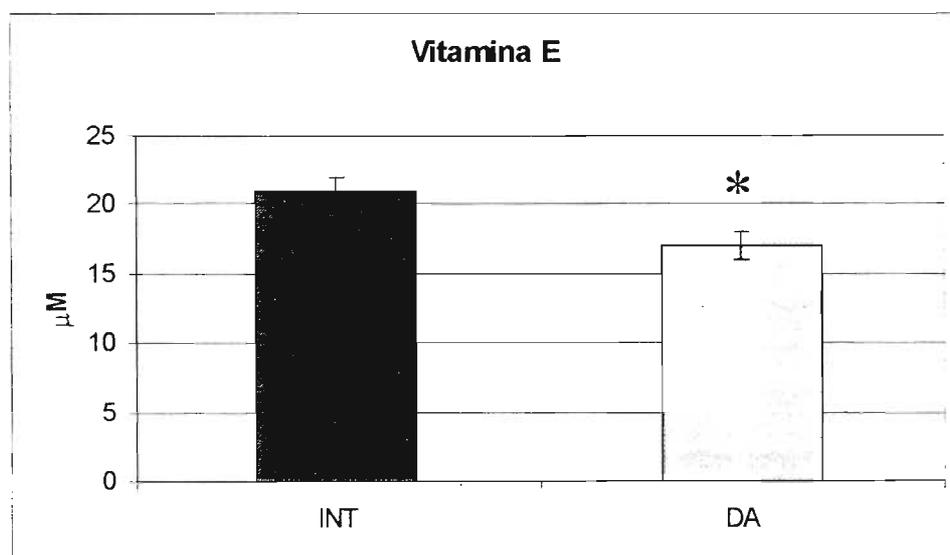


Figura 17. Níveis plasmáticos de Vitamina E nos grupos estudados (INT – Pacientes cognitivamente intactos; n=42. DA – Pacientes com provável Doença de Alzheimer; n=23). Os valores encontram-se expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$.

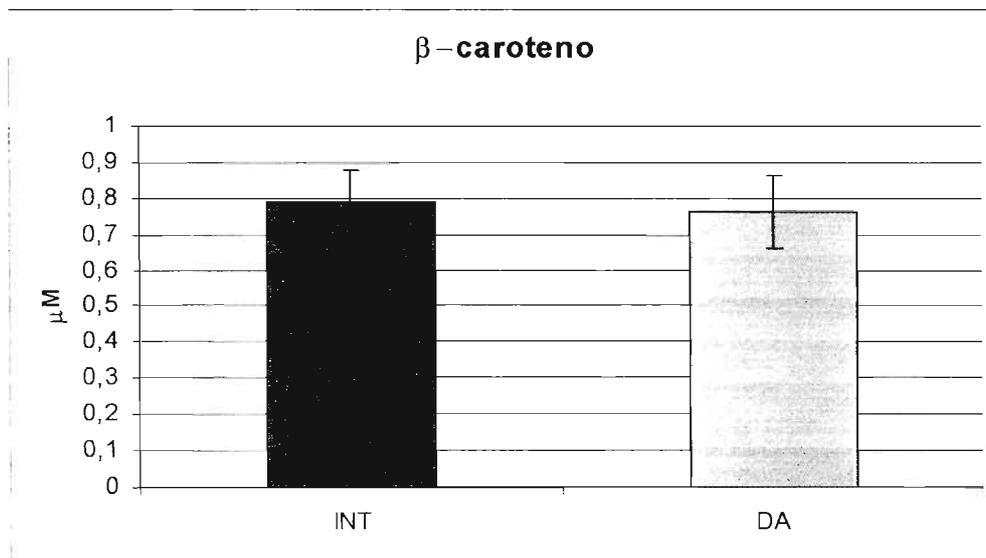


Figura 18. Níveis plasmáticos de β-caroteno nos grupos estudados (INT – Pacientes cognitivamente intactos; n=42. DA – Pacientes com provável Doença de Alzheimer; n=23). Os valores encontram-se expressos como média ± erro padrão da média.

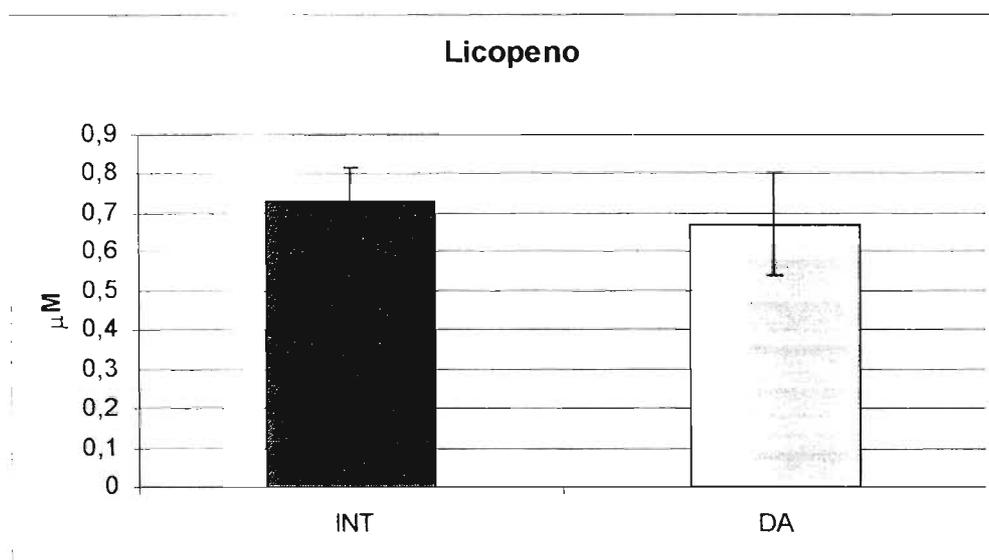


Figura 19. Níveis plasmáticos de licopeno nos grupos estudados (INT – Pacientes cognitivamente intactos; n=42. DA – Pacientes com provável Doença de Alzheimer; n=23). Os valores encontram-se expressos como média ± erro padrão da média.

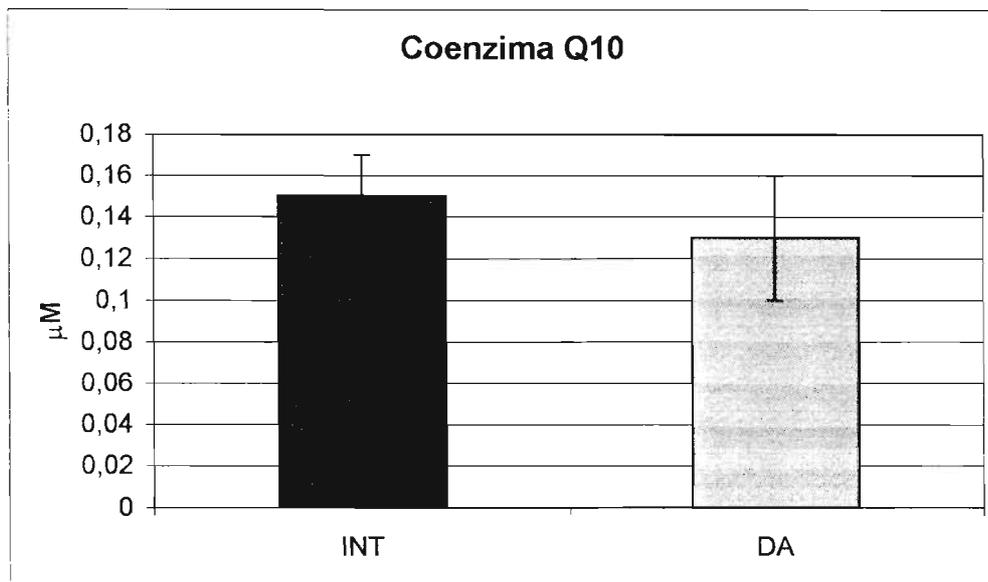


Figura 20. Níveis plasmáticos de coenzima Q10 nos grupos estudados (INT – Pacientes cognitivamente intactos; n=42. DA – Pacientes com provável Doença de Alzheimer; n=23). Os valores encontram-se expressos como média \pm erro padrão da média.

A tabela 1 mostra que a atividade da Cu, Zn-SOD eritrocitária apresenta uma correlação positiva com a atividade da catalase e da glutaciona peroxidase eritrocitárias, e com o conteúdo total de glutaciona dos eritrócitos. A atividade da catalase eritrocitária, por sua vez, apresenta também correlação positiva com a atividade da glutaciona peroxidase e conteúdo total de glutaciona nas mesmas células. A atividade de glutaciona peroxidase e conteúdo total de glutaciona nas hemácias também apresentam uma correlação positiva estatisticamente significativa. Este mesmo dois parâmetros se correlacionam de maneira negativa com os níveis plasmáticos de produtos de lipoperoxidação (LPO).

Diferenças significativas foram encontradas no nível de expressão de HLA-DR por monócitos dos grupos estudados (figura 19). Os monócitos de pacientes com provável Doença de Alzheimer expressam, aproximadamente, 70% mais HLA-DR que os monócitos de pacientes cognitivamente intactos.

Por outro lado não se observaram diferenças, estatisticamente significativas, na expressão de CD11B por monócitos obtidos dos dois grupos estudados (figura 20).

Correlações

			SOD	CAT	GPX	GSH	LPO
Teste de Spearman	SOD	Coeficiente de correlação	1.000	.415**	.316*	.406**	-.097
		Significância	.	.001	.011	.001	.244
	CAT	Coeficiente de correlação	.415**	1.000	.368**	.317*	-.158
		Significância	.001	.	.003	.010	.129
	GPX	Coeficiente de correlação	.316*	.368**	1.000	.416**	-.323**
		Significância	.011	.003	.	.001	.009
	GSH	Coeficiente de correlação	.406**	.317*	.416**	1.000	-.253*
		Significância	.001	.010	.001	.	.034
	LPO	Coeficiente de correlação	-.097	-.158	-.323**	-.253*	1.000
		Significância	.244	.129	.009	.034	.

** . p<0.01

* . p<0.5

Tabela 1. Resultados dos teste de correlação de Spearman para os antioxidantes enzimáticos eritrocitários e produtos de lipoperoxidação plasmáticos. Parâmetros não exibidos não apresentaram correlações significantes.

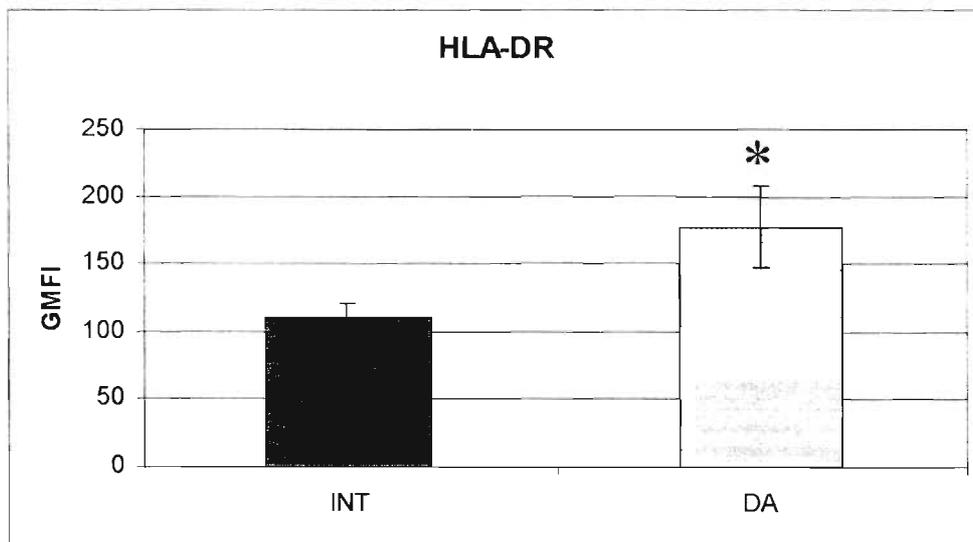


Figura 19. Expressão de HLA-DR nos grupos estudados (INT – Pacientes cognitivamente intactos; n=31. DA – Pacientes com provável Doença de Alzheimer; n=18). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. *p<0,05

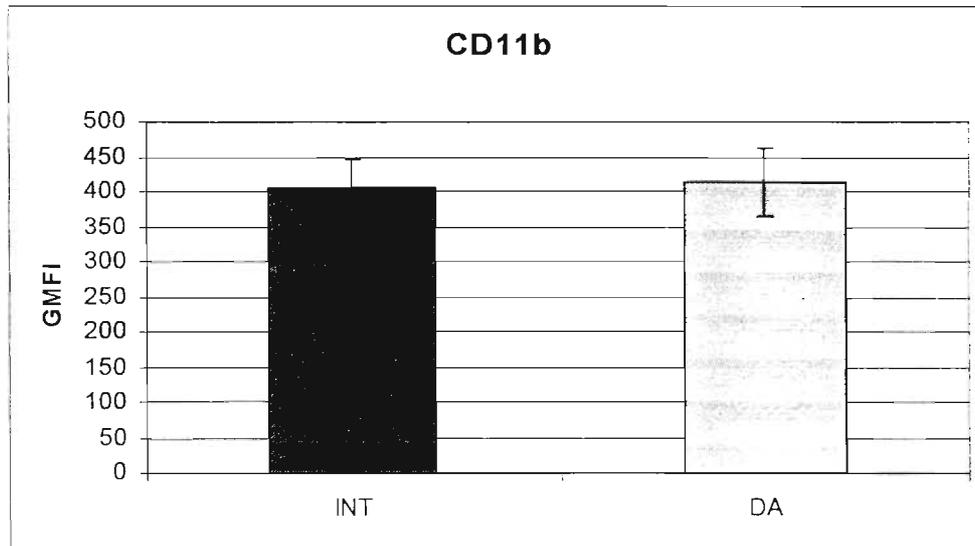


Figura 20. Expressão de CD11b nos grupos estudados (INT – Pacientes cognitivamente intactos; n=31. DA – Pacientes com provável Doença de Alzheimer; n=18). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

A proporção de células produzindo IL-1 α é, aproximadamente, 25% maior nos pacientes com diagnóstico provável da doença, comparativamente àqueles cognitivamente intactos (figura 21).

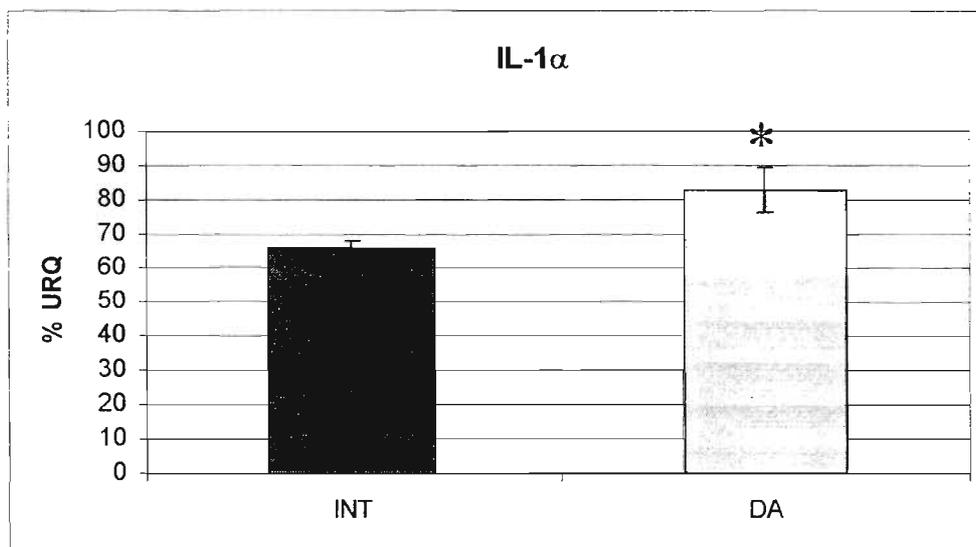


Figura 21. Proporção de células positivas para a produção de IL-1 α nos grupos estudados (INT – Pacientes cognitivamente intactos; n=30. DA – Pacientes com provável Doença de Alzheimer; n=17). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. *p<0,05

No caso da IL-6, não se observaram diferenças estatisticamente significativas na proporção de células produzindo esta interleucina entre os grupos estudados (figura 22). Da mesma forma, não se observaram diferenças na proporção de células produzindo TNF- α entre os grupos de pacientes estudados (figura 23).

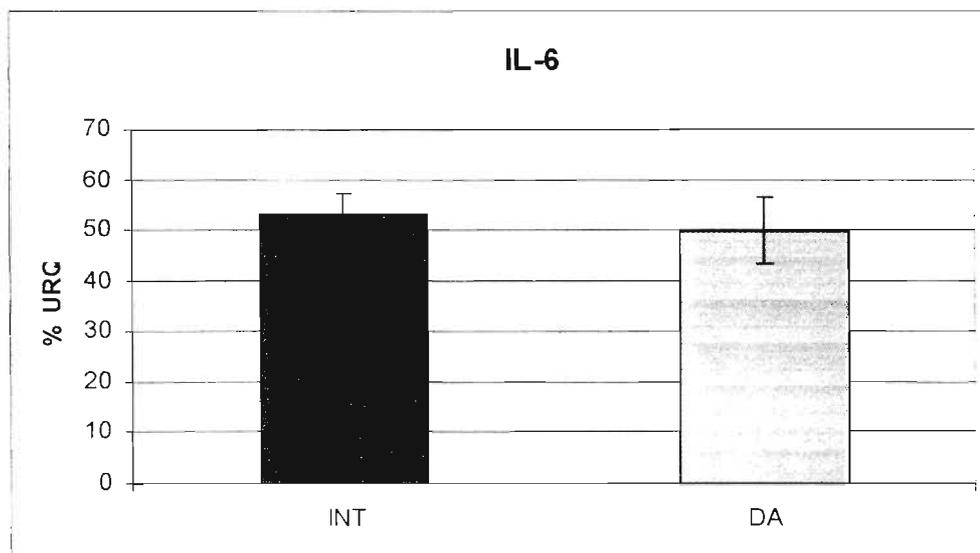


Figura 22. Proporção de células positivas para a produção de IL-6 nos grupos estudados (INT – Pacientes cognitivamente intactos; n=30. DA – Pacientes com provável Doença de Alzheimer; n=17). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

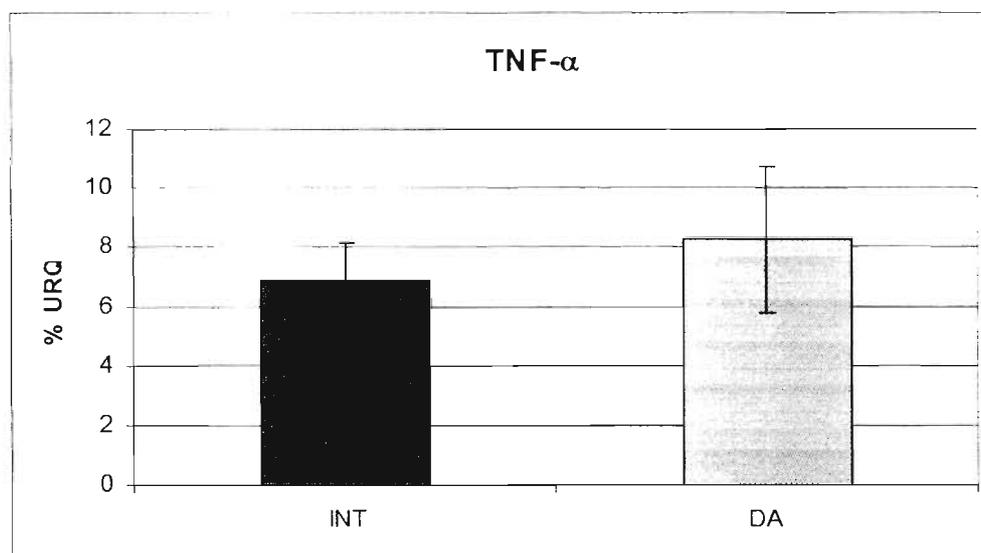


Figura 23. Proporção de células positivas para a produção de TNF- α nos grupos estudados (INT – Pacientes cognitivamente intactos; n=30. DA – Pacientes com provável Doença de Alzheimer; n=17). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

O metabolismo oxidativo dos monócitos, estudado através das técnicas de citometria de fluxo, não mostrou diferenças entre os grupos estudados (figura 24).

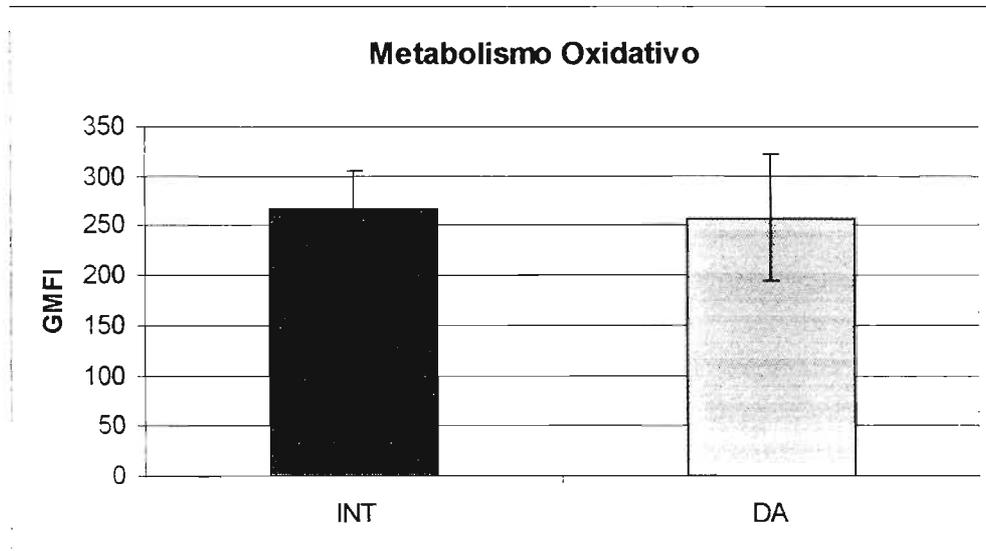


Figura 24. Produção intracelular de espécies oxidantes nos grupos estudados (INT – Pacientes cognitivamente intactos; n=18. DA – Pacientes com provável Doença de Alzheimer; n=11). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

6. DISCUSSÃO

A Doença de Alzheimer é uma preocupação crescente em um mundo cuja população idosa aumenta continuamente, devido aos avanços nas áreas de Medicina Preventiva e Geriatria. Apesar da população mundial apresentar, no momento atual, uma expectativa de vida crescente, nem sempre este envelhecimento é bem-sucedido; freqüentemente, mesmo que o indivíduo idoso apresente uma boa condição física, a Doença de Alzheimer e outras demências podem impossibilitar a sua independência (Brookmeyer e cols., 1998; Ramos e cols., 1998).

A Doença de Alzheimer é um processo multifatorial, ainda que os exatos mecanismos fisiopatológicos de sua instalação e evolução sejam, até o momento, pobremente compreendidos. Entre os fatores que contribuem para o surgimento dessa doença, podemos destacar a idade avançada, (Brookmeyer e cols., 1998) o estresse oxidativo, (Markesbery, 1997) traumatismo craniano (Graham e cols., 1996) e o processo inflamatório (Breitner, 1996; Eikelenboom & van Gool, 2004).

Obviamente, mais de um fator pode ser identificado como possível responsável pelo desenvolvimento da doença, na maior parte dos casos. Especialmente, a idade avançada está presente na grande maioria da população acometida, enquanto eventos inflamatórios e o estresse oxidativo são processos comumente verificados de maneira conjunta, sendo difícil a identificação das contribuições relativas de cada um para o processo patológico (Butterfield e cols., 2002).

Este trabalho teve por objetivo investigar a interrelação entre a Doença de Alzheimer, os parâmetros sanguíneos indicadores de estresse oxidativo e indicadores de atividade inflamatória em monócitos; este modelo segue o raciocínio segundo o qual os monócitos são as células circulantes que mais se assemelham à microglia cerebral, podendo mesmo ser recrutados do sangue para o tecido cerebral (Fiala e cols., 1998; Wegiel e cols., 2003) na Doença de Alzheimer. A microglia é considerada a principal responsável pelos eventos inflamatórios localizados que acompanham essa doença (D'Andrea e cols., 2004). Esta inflamação localizada levaria a maior produção de espécies reativas de oxigênio, causando um estresse oxidativo que poderia se refletir em parâmetros circulantes (Vina e cols., 2004).

Nas condições deste trabalho, a Doença de Alzheimer não foi associada à nenhuma evidência sistêmica de estresse oxidativo. A atividade eritrocitária da enzima Cu, Zn-SOD apresentou valores semelhantes para os dois grupos estudados, sendo compatíveis com dados publicados para a população desta faixa etária (figura 10) (Junqueira e cols., 2004). Este resultado encontra respaldo na literatura, (Ceballos-Picot e cols., 1996; Fernandes e cols., 1999) embora vários trabalhos reportem tanto uma elevação (Ozcankaya & Delibas, 2002; Rossi e cols., 2002) quanto uma diminuição (Percy e cols., 1990; Snaedal e cols., 1998) da atividade desta enzima na patologia em questão. A atividade da catalase eritrocitária (figura 11) também foi equivalente para os dois grupos estudados; os valores encontrados são semelhantes aos já publicados para uma população saudável (Junqueira e cols., 2004). Esta equivalência na atividade da catalase eritrocitária entre pacientes de Doença de Alzheimer e pacientes sem déficit cognitivo concorda com os dados disponíveis na literatura (Percy e cols., 1990; Tabet e cols., 2003) muito embora alguns estudos também tenham correlacionado esta patologia a uma elevação na atividade desta enzima (Perrin e cols., 1990; Repetto e cols., 1999).

De maneira semelhante, a atividade da glutathione peroxidase eritrocitária (figura 12) atingiu níveis semelhantes em ambos os grupos, com valores comparáveis aos descritos na literatura para indivíduos idosos (Junqueira e cols., 2004); este dado já foi anteriormente descrito na literatura (Perrin e cols., 1990; Bourdel-Marchasson e cols., 2001) ainda que não seja universal (Licastro e cols., 2001).

Os níveis eritrocitários de glutathione total (figura 13) também foram equivalentes nos dois grupos analisados, sendo compatíveis com valores descritos na literatura para populações semelhantes (Julius e cols., 1994). Dados semelhantes foram observados para a concentração plasmática de glutathione total (McCaddon e cols., 2003) e para o conteúdo de glutathione em cérebros de pacientes de Doença de Alzheimer, sugerindo um papel secundário para essa molécula nesta patologia (Schulz e cols., 2000).

Tomados em conjuntos, estes parâmetros indicam que o estresse oxidativo que ocorre localmente no cérebro de pacientes de Doença de Alzheimer não é o suficiente para alterar a expressão dos antioxidantes enzimáticos em uma escala sistêmica, nem para causar a depleção da glutathione, substrato da glutathione peroxidase. Não

obstante, são abundantes na literatura relatos de modificações nas concentrações de antioxidantes enzimáticos em cérebros de pacientes portadores de Doença de Alzheimer como, por exemplo, uma atividade aumentada de superóxido dismutase (Pitchumoni & Doraiswamy, 1998). Se este aumento não for acompanhado por um aumento equivalente na glutathione peroxidase ou na catalase, haverá o acúmulo de peróxido de hidrogênio, resultando na formação de íon hidroxila. Alguns estudos mostraram que os cérebros afetados por esta doença podem possuir uma atividade diminuída de catalase, agravando os efeitos do aumento da atividade da superóxido dismutase (Pitchumoni & Doraiswamy, 1998).

Apesar da atividade das enzimas antioxidantes eritrocitárias não apresentarem alterações nos pacientes de Doença de Alzheimer, o teste de correlações de Spearman foi aplicado aos dados acima (tabela 1) tendo revelado uma correlação positiva e significativa mútua entre as atividades eritrocitárias de superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, assim como dos níveis eritrocitários de glutathione total. Estes dados comprovam a validade do postulado que afirma que os sistemas antioxidantes do organismo agem em conjunto, de uma forma integrada. O teste de Spearman também identificou uma correlação negativa entre os níveis de produtos de lipoperoxidação plasmáticos e a atividade da glutathione peroxidase e níveis de glutathione total em eritrócitos. Este dado indica que a lipoperoxidação é influenciada pela atividade do sistema antioxidante glutathione peroxidase-glutathione neste modelo experimental. De fato, o sistema glutathione peroxidase-glutathione é um importante componente da rede antioxidante de proteção às células do organismo (Rondanelli e cols., 1997).

Como contraponto às medidas de atividades de antioxidantes eritrocitários, foram avaliados os níveis circulantes de produtos de oxidação de macromoléculas no organismo. Para isto, foram analisados os níveis de carbonilas proteicas plasmáticas, como produto derivado da oxidação de proteínas circulantes e, os níveis plasmáticos de produtos de peroxidação lipídica, avaliados como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

O nível plasmático de produtos de oxidação de proteínas (figura 15) não se mostrou alterado no grupo de pacientes de Doença de Alzheimer, em comparação com

o grupo cognitivamente intacto, estando os mesmos dentro da faixa de valores encontrada na literatura (Buss e cols., 1997). Esta ausência de alterações é encontrada em alguns estudos (Polidori e cols., 2004). Por outro lado, a maioria dos trabalhos que avalia este parâmetro no estudo da doença, encontra um aumento nos níveis de proteínas oxidadas plasmáticas (Conrad e cols., 2000; Choi e cols., 2002). Esta diferença pode se dever à diferença de sensibilidade dos métodos empregados nos estudos citados (eletroforese bidimensional, espectrometria de massa) em relação ao método de enzima-imunoensaio escolhido para o presente trabalho e, à eventuais diferenças na qualidade do atendimento médico e alimentação entre as populações-alvo de cada estudo. Interessante é notar que o trabalho que reproduz os nossos achados para este parâmetro, não encontra alterações nos níveis de carbonilas proteicas plasmáticas, mas encontra diferenças nos níveis de ditirosinas plasmáticas entre os grupos avaliados (Polidori e cols., 2004). Este dado pode indicar que as alterações oxidativas proteicas na Doença de Alzheimer podem ser de outros tipos, que não a formação de carbonilas, tornando os métodos que avaliam a oxidação proteica por intermédio da detecção desses grupos, inadequadas para esta patologia.

De maneira similar, a concentração de produtos de peroxidação lipídica circulantes é equivalente nos dois grupos estudados (figura 15) resultados concordantes com os comumente encontrados na literatura (Reznick & Packer, 1994; Paolisso e cols., 1998). Outros estudos confirmam esta manutenção dos níveis de peroxidação lipídica na Doença de Alzheimer (Polidori e cols., 2004). De acordo com estes dados, a estabilidade da maior parte dos parâmetros antioxidantes é refletida na manutenção dos níveis de oxidação de proteínas e lipídios plasmáticos, sugerindo a ausência de um componente oxidativo sistêmico nos pacientes estudados.

De maneira geral, a população estudada parece usufruir de um status nutricional privilegiado em relação às populações examinadas em estudos semelhantes, em outros locais. Esta diferença pode ser explicada, em parte, pelo atendimento cuidadoso e diferenciado proporcionado, pelo ambulatório de demênicas do Centro de Estudos do Envelhecimento da Disciplina de Geriatria da UNIFESP, ao pacientes e seus familiares, contendo orientações nutricionais.

Como complemento ao perfil antioxidante delineado anteriormente, também foram efetuadas medidas dos níveis plasmáticos de antioxidantes de baixo peso molecular, não-enzimáticos. Estes antioxidantes foram: vitamina C, α -tocoferol, β -caroteno, licopeno e coenzima Q₁₀.

Um estudo de estresse oxidativo e envelhecimento comparou as concentrações plasmáticas de antioxidantes em população idosa (octogenários) saudável e portadora de incapacidades (dependentes) encontrando concentrações plasmáticas de α -tocoferol em torno de 34 μM entre os idosos saudáveis, de 26 μM para os idosos dependentes ($p < 0,05$) e 43 μM para uma população de adultos jovens saudáveis ($p < 0,05$). Para o β -caroteno, foram encontradas concentrações plasmáticas de 0,54 μM entre os idosos saudáveis, 0,41 μM entre os idosos dependentes e 0,55 μM entre os adultos jovens saudáveis (idade média 54 anos). Para a vitamina C, os achados foram 27,5 μM , 21,4 μM e 37,8 μM , respectivamente (Mezzetti e cols., 1996). Quando comparamos a faixa das concentrações plasmáticas de α -tocoferol, obtida dos nossos idosos, com estes dados, observamos que os valores obtidos em nosso estudo (figura 17) ainda permanecem inferiores, tanto à dos idosos saudáveis, como também, à dos idosos dependentes. O mesmo não ocorre em relação à concentração plasmática de vitamina C na nossa amostra (figura 16) superior ao estudo citado para todos os grupos; nossos valores são comparáveis à concentração (60 μM) de um grupo de idosos saudáveis analisado em um trabalho de Vanderjagt e cols. (1987). Este mesmo fenômeno se repete ao analisarmos os níveis de β -caroteno em todos os grupos estudados (figura 18).

Por outro lado, os valores de vitamina C, β -caroteno e α -tocoferol, obtidos no presente estudo (figuras 16, 17 e 18) encontram-se dentro da faixa anteriormente descrita para um grupo populacional saudável e de mesma faixa etária (Junqueira e cols., 2004).

Já Paolisso et al. (1998) estudando a relação entre estresse oxidativo e idade, observou concentrações plasmáticas de vitamina C (59 μM) e de α -tocoferol (24 μM) entre idosos saudáveis (70-99 anos) comparáveis aos obtidos em nosso trabalho. Heseker & Schneider (1994) encontraram concentrações plasmáticas, para homens e mulheres respectivamente, de vitamina C 60,7 μM e 82,2 μM ; de α -tocoferol 34,5 μM e

36,3 μM e de β -caroteno 0,55 μM e 0,83 μM , ou seja, comparáveis aos nossos valores de vitamina C e β -caroteno e, superiores aos nossos valores de α -tocoferol. A revisão de vários trabalhos publicados, realizada por Stocker & Frei (1991) mostra valores populacionais para as concentrações plasmáticas de vitamina C, α -tocoferol e β -caroteno, sendo estas, respectivamente, de 30 a 150 μM , 15 a 40 μM e 0,3 a 0,6 μM . Outros autores relatam que, para a prevenção de doença cardiovascular e câncer, concentrações superiores a 30 μM de α -tocoferol em combinação com concentrações superiores à 50 μM de vitamina C, 0,4 μM de β -caroteno e 0,5 μM de licopeno, são desejadas (Gey, 1995). Desta maneira, os dois grupos de pacientes idosos estudados posicionam-se dentro dos limites encontrados em vários outros estudos para níveis de antioxidantes moleculares plasmáticos, ainda que no limiar inferior pra vitamina E e , ligeiramente, acima dos níveis médios para β -caroteno e vitamina C. De maneira geral, a população estudada parece apresentar situação diferenciada em relação a outros grupos populacionais estudados. Esta diferença pode ser explicada em parte pelo atendimento cuidadoso e diferenciado proporcionado pelos ambulatórios do Centro de Estudos do Envelhecimento, mencionado anteriormente. Estes parâmetros refletem parte do sistema de defesa antioxidante do organismo dos pacientes, avaliando componentes que podem ser absorvidos diretamente da dieta, de maneira complementar à defesa antioxidante promovida pelos antioxidantes eritrocitários anteriormente mencionados.

De todos os antioxidantes de baixo peso molecular estudados, apenas a vitamina E variou significativamente entre os grupos estudados (figura 17). O grupo cognitivamente íntegro apresenta níveis de vitamina E plasmática mais altos que os pacientes de Doença de Alzheimer.

Esta aparente homogeneidade nos níveis de antioxidantes entre os vários grupos se contrapõe a outros estudos da literatura (Behl & Moosmann, 2002; Esposito e cols., 2002; Mecocci e cols., 2002; Sano, 2002). Este achado, como anteriormente mencionado, reforça a noção de que os processos oxidativos que são desencadeados durante a evolução do mal de Alzheimer nem sempre se manifestam sistemicamente, e, mesmo quando isto ocorre, podem ser apenas reflexos de outros mecanismos subjacentes. É de especial interesse o fato de que o estabelecimento da doença de

Alzheimer, expressa pela comparação entre os grupos INT e DA em nosso estudo, seja acompanhado da queda de vitamina E circulante, uma vez que a vitamina E possui, além de capacidades antioxidantes reconhecidas, atividades antiinflamatórias devido à sua ação sobre mecanismos de transdução de sinal em fagócitos, modulando a atividade da proteína quinase C, através da inibição de quinases e ativação de fosfatases envolvidas no mecanismo de atividade desta enzima (Bulger & Maier, 2003). Não surpreendentemente, os estudos que têm obtido os melhores resultados na prevenção ou tratamento da Doença de Alzheimer nos últimos anos, utilizam α -tocoferol como agente (Sano *e cols.*, 1997; Zandi *e cols.*, 2004)

Para completar o quadro delineado até este ponto, os monócitos circulantes foram analisados por citometria de fluxo, como indicadores da atividade inflamatória envolvida na Doença de Alzheimer. Para tanto, quantificamos o nível de expressão das moléculas de superfície HLA-DR, como indicador do estado de ativação dos monócitos circulantes, e CD-11b, uma molécula de adesão envolvida no processo de marginação e migração dos monócitos. Os resultados mostram que os pacientes de Doença de Alzheimer possuem monócitos circulantes que expressam maior quantidade de HLA-DR na superfície (figura 19) mesmo sem estímulo externo, sinalizando um maior estado de ativação basal destas células, confirmando dados disponíveis na literatura (Kusdra *e cols.*, 2000). Pode-se encontrar marcadores de ativação de monócitos aumentados na corrente sanguínea de pacientes de uma série de doenças neurodegenerativas (Casal *e cols.*, 2003). Como anteriormente mencionado, estes monócitos circulantes podem transpor a barreira hemato-encefálica e migrar para o tecido cerebral, diferenciando-se em microglia. Uma vez que os monócitos circulantes dos pacientes de Doença de Alzheimer encontram-se mais ativados no estado basal do que os de indivíduos cognitivamente intactos, pode-se postular que a microglia derivada dessas células reagirá de maneira mais intensa aos estímulos inflamatórios, produzindo maior lesão tecidual colateral. O nível de expressão da proteína de superfície CD-11b não se alterou entre os dois grupos (figura 20) indicando que o potencial de adesão e migração, destas células, não se altera nesta patologia.

Também por citometria de fluxo, foi medida nestes monócitos a produção das citocinas IL-1 α , IL-6 e TNF- α . Esta medida destina-se a avaliar a capacidade destes

monócitos circulantes de estimular o processo inflamatório, atraindo novos monócitos para o sítio inflamatório, uma vez estimulados.

A produção de IL-1 α foi mais alta nos monócitos de pacientes de Doença de Alzheimer que nos pacientes cognitivamente intactos (figura 21). Sendo a IL-1 α uma importante citocina pro-inflamatória, pode-se supor que a eventual migração e diferenciação desses monócitos produzirá uma microglia mais ativa, do ponto de vista inflamatório. Este aumento de produção de IL-1 α foi demonstrado, *in vitro*, em linhagem de monócitos humanos, quando estimulados pela P β A, através de mecanismos de transdução de sinal mediados por tirosina-quinases, o que reforça a hipótese acima (Combs e cols., 2001).

Os níveis de IL-6 produzidos por monócitos periféricos estimulados foram equivalentes nos dois grupos (figura 22) assim como o de TNF- α (figura 23) concordando com trabalhos sobre o tema já existentes na literatura (Beloosesky e cols., 2002). Outros autores detectam um aumento na produção de IL-6 por monócitos de pacientes de Doença de Alzheimer (Shalit e cols., 1994) utilizando, entretanto, um estímulo (fito-hemaglutinina) diferente do utilizado no presente estudo (LPS).

O metabolismo oxidativo destes monócitos não apresentou diferenças entre os dois grupos estudados (figura 24). Este dado indica que a resposta oxidativa dessas células não é mais exacerbada nos pacientes de Doença de Alzheimer. Portanto, o processo inflamatório, presente em pacientes com Doença de Alzheimer, se reflete nos monócitos circulantes como uma maior ativação basal e, maior potencial de resposta inflamatória.

Pelos dados aqui expostos, pode-se concluir que a Doença de Alzheimer, neste estudo, manifesta-se com ativação de monócitos circulantes e especial decréscimo nos níveis de vitamina E circulante. Vários trabalhos associam o α -tocoferol à uma atividade moduladora da inflamação (Chan e cols., 2001; Azzi e cols., 2003). Em nosso estudo, o grupo de pacientes que apresenta as concentrações plasmáticas de α -tocoferol diminuídas, também apresenta monócitos mais ativados, os quais respondem aos estímulos com uma maior produção da citocina proinflamatória IL-1 α . Nosso estudo permite concluir que a Doença de Alzheimer está associada a uma maior ativação basal de monócitos circulantes; esta ativação parece ocorrer como

conseqüência da depleção de α -tocoferol circulante. Esta depleção não se traduz em aumento da oxidação de macromoléculas circulantes, reforçando a idéia de que o α -tocoferol, nesta patologia, é importante devido ao seu papel anti-inflamatório. Estes resultados encontram apoio na literatura que relata sucesso na prevenção e tratamento da Doença de Alzheimer pela administração de α -tocoferol (Zandi e cols., 2004).

7. BIBLIOGRAFIA

- Afagh, A.; Cummings, B. J.; Cribbs, D. H.; Cotman, C. W.; Tenner, A. J. (1996). Localization and cell association of C1q in Alzheimer's disease brain. *Exp Neurol* **138(1)**: 22-32.
- Aisen, P. S. (2002). The potential of anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Lancet Neurology* **1(5)**: 279-284.
- Akiyama, H.; Kawamata, T.; Dedhar, S.; McGeer, P. L. (1991). Immunohistochemical localization of vitronectin, its receptor and beta-3 integrin in Alzheimer brain tissue. *Journal of Neuroimmunology* **32**: 19-28.
- Arai, H.; Lee, V. M.; Otvos, L., Jr.; Greenberg, B. D.; Lowery, D. E.; Sharma, S. K.; Schmidt, M. L.; Trojanowski, J. Q. (1990). Defined neurofilament, tau, and beta-amyloid precursor protein epitopes distinguish Alzheimer from non-Alzheimer senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87(6)**: 2249-53.
- Araujo, D. M.; Lapchak, P. A. (1994). Induction of immune system mediators in the hippocampal formation of Alzheimer's and Parkinson's diseases: selective effects on specific interleukins and interleukin receptors. *Neuroscience* **61**: 745-754.
- Arriagada, P. V.; Growdon, J. H.; Hedley-Whyte, E. T.; Hyman, B. T. (1992a). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* **42(3 Pt 1)**: 631-9.
- Arriagada, P. V.; Marzloff, K.; Hyman, B. T. (1992b). Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease. *Neurology* **42(9)**: 1681-8.
- Asada, T.; Yamagata, Z.; Kinoshita, T.; Kinoshita, A.; Kariya, T.; Asaka, A.; Kakuma, T. (1996). Prevalence of dementia and distribution of ApoE alleles in Japanese centenarians: an almost-complete survey in Yamanashi Prefecture, Japan. *J Am Geriatr Soc* **44(2)**: 151-5.
- Atwood, C. S.; Moir, R. D.; Huang, X.; Scarpa, R. C.; Bacarra, N. M.; Romano, D. M.; Hartshorn, M. A.; Tanzi, R. E.; Bush, A. I. (1998). Dramatic aggregation of Alzheimer Abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 12817-12826.
- Azzi, A.; Gysin, R.; Kempna, P.; Ricciarelli, R.; Villacorta, L.; Visarius, T.; Zingg, J. M. (2003). The role of alpha-tocopherol in preventing disease: from epidemiology to molecular events. *Mol Aspects Med* **24(6)**: 325-36.
- Bancher, C.; Brunner, C.; Lassmann, H.; Budka, H.; Jellinger, K.; Wiche, G.; Seitelberger, F.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Wisniewski, H. M. (1989). Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res* **477(1-2)**: 90-9.

- Barcikowska, M.; Wisniewski, H. M.; Bancher, C.; Grundke-Iqbal, I. (1989). About the presence of paired helical filaments in dystrophic neurites participating in the plaque formation. *Acta Neuropathol (Berl)* **78(3)**: 225-31.
- Barger, S. W.; Horster, D.; Furukawa, K.; Goodman, Y.; Kriegstein, J.; Mattson, M. P. (1995). Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca²⁺ accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92(20)**: 9328-32.
- Bauer, J.; Strauss, S.; Schreiter-Gasser, U.; Ganter, U.; Schlegel, P.; Witt, I.; Yolk, B.; Berger, M. (1991). Interleukin-6 and alpha-2-macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices. *FEBS Lett* **285(1)**: 111-4.
- Bauer, M. K.; Lieb, K.; Schulze-Osthoff, K.; Berger, M.; Gebicke-Haerter, P. J.; Bauer, J.; Fiebich, B. L. (1997). Expression and regulation of cyclooxygenase-2 in rat microglia. *Eur J Biochem* **243(3)**: 726-31.
- Beal, M. F. (2002). Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radical Biology and Medicine* **32(9)**: 797-803.
- Beard, C. M.; Kokmen, E.; O'Brien, P. C.; Kurland, L. T. (1994). Are patients with Alzheimer's disease surviving longer in recent years? *Neurology* **44(10)**: 1869-71.
- Beard, C. M.; Kokmen, E.; Offord, K. P.; Kurland, L. T. (1992). Lack of association between Alzheimer's disease and education, occupation, marital status, or living arrangement. *Neurology* **42(11)**: 2063-8.
- Becker, J. T.; Huff, F. J.; Nebes, R. D.; Holland, A.; Boller, F. (1988). Neuropsychological function in Alzheimer's disease: Pattern of impairment and rate of progression. *Archives of Neurology* **45**: 263-268.
- Behl, C.; Davis, J.; Cole, G. M.; Schubert, D. (1992). Vitamin E protects nerve cells from amyloid β -protein toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186(2)**: 944-950.
- Behl, C.; Davis, J. B.; Lesley, R.; Schubert, D. (1994). Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. *Cell* **77**: 817-827.
- Behl, C.; Moosmann, B. (2002). Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radical Biology and Medicine* **33(2)**: 182-191.
- Beloosesky, Y.; Salman, H.; Bergman, M.; Bessler, H.; Djaldetti, M. (2002). Cytokine levels and phagocytic activity in patients with Alzheimer's disease. *Gerontology* **48(3)**: 128-32.
- Benveniste, E. N. (1992). Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function and mechanism of action. *Am. J. Physiol.* **263**: C1-C16.
- Berg, G.; Edwards, D. F.; Danzinger, W. L.; Berg, L. (1987). Longitudinal change in three brief assessments of SDAT. *J Am Geriatr Soc* **35(3)**: 205-12.

- Berton, G. (1993). Is copper pro- or anti-inflammatory? A reconciling view and a novel approach for the use of copper in the control of inflammation. *Agents and Actions* **39**: 210-217.
- Beutler, E. (1975). Red cell metabolism. New York, Grune & Stratton.
- Bobinski, M.; de Leon, M. J.; Tarnawski, M.; Wegiel, J.; Reisberg, B.; Miller, D. C.; Wisniewski, H. M. (1998). Neuronal and volume loss in CA1 of the hippocampal formation uniquely predicts duration and severity of Alzheimer disease. *Brain Res* **805(1-2)**: 267-9.
- Bouras, C.; Hof, P. R.; Morrison, J. H. (1993). Neurofibrillary tangle densities in the hippocampal formation in a non-demented population define subgroups of patients with differential early pathologic changes. *Neurosci Lett* **153(2)**: 131-5.
- Bourdel-Marchasson, I.; Delmas-Beauvieux, M. C.; Peuchant, E.; Richard-Harston, S.; Decamps, A.; Reignier, B.; Emeriau, J. P.; Rainfray, M. (2001). Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. *Age Ageing* **30(3)**: 235-41.
- Braak, E.; Braak, H.; Mandelkow, E. M. (1994). A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol (Berl)* **87(6)**: 554-67.
- Bradbury, J. (2003). First autopsy results from Alzheimer vaccine trial released. *Lancet* **361(9362)**: 1020-1020.
- Bramblett, G. T.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. (1992). Regions with abundant neurofibrillary pathology in human brain exhibit a selective reduction in levels of binding-competent tau and accumulation of abnormal tau-isoforms (A68 proteins). *Lab Invest* **66(2)**: 212-22.
- Breitner, J. C. (1996). Inflammatory processes and antiinflammatory drugs in Alzheimer's disease: a current appraisal. *Neurobiol Aging* **17(5)**: 789-94.
- Brion, J. P.; Couck, A. M.; Bruce, M.; Anderton, B.; Flament-Durand, J. (1991). Synaptophysin and chromogranin A immunoreactivities in senile plaques of Alzheimer's disease. *Brain Res* **539(1)**: 143-50.
- Brookmeyer, R.; Gray, S.; Kawas, C. (1998). Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *Am J Public Health* **88(9)**: 1337-42.
- Brucki, S. M. D. (2000). Curso Clínico da Doença de Alzheimer. Neuropsiquiatria Geriátrica. P. Caramelli. São Paulo, Atheneu: 119-128.
- Brunialti, M. K.; Kallas, E. G.; Freudenberg, M.; Galanos, C.; Salomao, R. (2002). Influence of EDTA and heparin on lipopolysaccharide binding and cell activation, evaluated at single-cell level in whole blood. *Cytometry* **50(1)**: 14-8.

- Bucciantini, M.; Gianonni, E.; Chiti, F.; Baroni, F.; Formigli, L.; Zurdo, J.; Taddei, N.; Ramponi, G.; Dobson, C. M.; Stefani, M. (2002). Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding disease. *Nature* **416**: 507-511.
- Buée-Scherrer, V.; Goedert, M. (2002). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases in intact cells. *FEBS Letters* **515**: 151-154.
- Bugiani, O.; Giaccone, G.; Verga, L.; Pollo, B.; Ghetti, B.; Frangione, B.; Tagliavini, F. (1990). Alzheimer patients and Down patients: abnormal presynaptic terminals are related to cerebral preamyloid deposits. *Neurosci Lett* **119(1)**: 56-9.
- Bulger, E. M.; Maier, R. V. (2003). AN ARGUMENT FOR VITAMIN E SUPPLEMENTATION IN THE MANAGEMENT OF SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME. *Shock* **19(2)**: 99-103.
- Burke, W. J.; Miller, J. P.; Rubin, E. H.; Morris, J. C.; Coben, L. A.; Duchek, J.; Wittels, I. G.; Berg, L. (1988). Reliability of the Washington University Clinical Dementia Rating. *Arch Neurol* **45(1)**: 31-2.
- Burton, G. W.; Webb, A.; Ingold, K. A. (1985). A mild, rapid and efficient method of lipid extraction for use in determining vitamin E/lipid ratios. *Lipids* **20**: 29-39.
- Buss, H.; Chan, T. P.; Sluis, K. B.; Domigan, N. M.; Winterbourn, C. C. (1997). Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic Biol Med* **23(3)**: 361-6.
- Butterfield, D. A.; Griffin, S.; Munch, G.; Pasinetti, G. M. (2002). Amyloid beta-peptide and amyloid pathology are central to the oxidative stress and inflammatory cascades under which Alzheimer's disease brain exists. *J Alzheimers Dis* **4(3)**: 193-201.
- Buttriss, J. L.; Diplock, A. T. (1984). High performance liquid chromatography methods for vitamin E in tissues. *Method Enzymol.* **105**: 131-138.
- Calingasan, N. Y.; Uchida, K.; Gibson, G. E. (1999). Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **72**: 751-756.
- Camargo, C. H. P.; Cid, C. G. (2000). Habilidades Viso-Espaciais. Neuropsiquiatria Geriátrica. P. Caramelli. São Paulo, Atheneu: 531-537.
- Casal, J. A.; Robles, A.; Tutor, J. C. (2003). Serum markers of monocyte/macrophage activation in patients with Alzheimer's disease and other types of dementia. *Clin Biochem* **36(7)**: 553-6.
- Ceballos-Picot, I.; Merad-Boudia, M.; Nicole, A.; Thevenin, M.; Hellier, G.; Legrain, S.; Berr, C. (1996). Peripheral antioxidant enzyme activities and selenium in elderly subjects and in dementia of Alzheimer's type--place of the extracellular glutathione peroxidase. *Free Radic Biol Med* **20(4)**: 579-87.
- Chan, S. S.; Monteiro, H. P.; Schindler, F.; Stern, A.; Junqueira, V. B. (2001). Alpha-tocopherol modulates tyrosine phosphorylation in human neutrophils by inhibition of

- protein kinase C activity and activation of tyrosine phosphatases. *Free Radic Res* **35(6)**: 843-56.
- Chandrasekaran, K.; Stoll, J.; Giordano, T.; Atack, J. R.; Matocha, M. F.; Brady, D. R.; Rapoport, S. I. (1992). Differential expression of cytochrome oxidase (COX) genes in different regions of monkey brain. *Journal of Neuroscience Research* **32**: 415-423.
- Chang, J. W.; Coleman, P. D.; O'Banion, M. K. (1996). Prostaglandin G/H synthase-2 (cyclooxygenase-2) mRNA expression is decreased in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **17(5)**: 801-8.
- Chang, S.-C.; Kao, M.-C.; Fu, M.-T.; Lin, C.-T. (2001). Modulation of NO and cytokines in microglial cells by Cu/Zn-superoxide dismutase. *Free Radic. Biol. Med.* **31(9)**: 1084-1089.
- Chao, C. C.; Hu, S.; Kravitz, F. H.; Tsang, M.; Anderson, W. R.; Peterson, P. K. (1994). Transforming growth factor-beta protects human neurons against beta-amyloid-induced injury. *Mol Chem Neuropathol* **23(2-3)**: 159-78.
- Check, E. (2002). Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug. *Nature* **415(6871)**: 462-462.
- Checler, F. (1995). Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **65(4)**: 1431-44.
- Cheng, B.; Christakos, S.; Mattson, M. P. (1994). Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* **12(1)**: 139-53.
- Chochina, S. V.; Avdulov, N. A.; Igbavboa, U.; Cleary, J. P.; O'Hare, E. O.; Wood, W. G. (2001). Amyloid β -peptide 1-40 increases neuronal membrane fluidity: role of cholesterol and brain region. *Journal of Lipid Research* **42**: 1292-1297.
- Choi, J.; Malakowsky, C. A.; Talent, J. M.; Conrad, C. C.; Gracy, R. W. (2002). Identification of oxidized plasma proteins in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **293(5)**: 1566-70.
- Cohen, G.; Spina, M. B. (1989). Deprenyl suppresses the oxidant stress associated with increased dopamine turnover. *Annals of Neurology* **26**: 689-690.
- Coleman, P. D.; Flood, D. G. (1987). Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **8(6)**: 521-45.
- Colton, C. A.; Gilbert, D. L. (1987). Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett.* **223(2)**: 284-288.
- Combs, C. K.; Karlo, J. C.; Kao, S. C.; Landreth, G. E. (2001). beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci* **21(4)**: 1179-88.

- Connor, R. J.; Menzies, S. L.; Martin, S. M. (1992). A histochemical study of iron, transferrin and ferritin in Alzheimer's diseased brains. *Journal of Neuroscience Research* **31**: 75-83.
- Conrad, C. C.; Marshall, P. L.; Talent, J. M.; Malakowsky, C. A.; Choi, J.; Gracy, R. W. (2000). Oxidized proteins in Alzheimer's plasma. *Biochem Biophys Res Commun* **275(2)**: 678-81.
- Copp, R. P.; Wisniewski, T.; Hentati, F.; Larnaout, A.; Hamida, M. B.; Kayden, H. J. (1999). Localization of α -tocopherol transfer protein in the brains of patients with ataxia with vitamin E deficiency and other oxidative stress related neurodegenerative disorders. *Brain Res.* **822**: 80-87.
- Cotman, C. W.; Anderson, A. J. (1995). A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* **10(1)**: 19-45.
- Cotran, R. S.; Kumar, V.; Collins, T. (1999). The Central Nervous System. Robbins Pathologic Basis of Disease. R. S. Cotran. Philadelphia, Saunders: 1425.
- Coyle, J. T.; Puttfarcken, P. (1993). Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* **262**: 689-695.
- Cras, P.; Smith, M. A.; Richey, P. L.; Siedlak, S. L.; Mulvihill, P.; Perry, G. (1995). Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer disease. *Acta Neuropathol (Berl)* **89(4)**: 291-5.
- Crum, R. M.; Anthony, J. C.; Bassett, S. S.; Folstein, M. F. (1993). Population-based norms for the Mini-Mental State Examination by age and educational level. *Jama* **269(18)**: 2386-91.
- Cummings, J. L.; Vinters, H. V.; Cole, G. M.; Khachaturian, Z. S. (1998). Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. *Neurology* **51(1 Suppl 1)**: S2-17; discussion S65-7.
- Daly, E.; Zaitchik, D.; Copeland, M.; Schmahmann, J.; Gunther, J.; Albert, M. (2000). Predicting conversion to Alzheimer disease using standardized clinical information. *Arch Neurol* **57(5)**: 675-80.
- Damasceno, B. P. (2000). Avaliação da Linguagem no Sujeito Idoso. Neuropsiquiatria Geriátrica. P. Caramelli. São Paulo, Atheneu: 527-530.
- D'Andrea, M. R.; Cole, G. M.; Ard, M. D. (2004). The microglial phagocytic role with specific plaque types in the Alzheimer disease brain. *Neurobiol Aging* **25(5)**: 675-83.
- De Simone, R.; Giampaolo, A.; Giometto, B.; Gallo, P.; Levi, G.; Peschle, C.; Aloisi, F. (1995). The costimulatory molecule B7 is expressed on human microglia in culture and in multiple sclerosis acute lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* **54(2)**: 175-87.

- Dickson, D. W. (1997). Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies. *Neurobiol Aging* **18(4 Suppl)**: S21-6.
- Dickson, D. W.; Lee, S. C.; Mattiace, L. A.; Yen, S. H.; Brosnan, C. (1993). Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia* **7(1)**: 75-83.
- Doll, R. (1993). Review: Alzheimer's disease and environmental aluminium. *Age Ageing* **22(2)**: 138-53.
- Ebly, E. M.; Parhad, I. M.; Hogan, D. B.; Fung, T. S. (1994). Prevalence and types of dementia in the very old: results from the Canadian Study of Health and Aging. *Neurology* **44(9)**: 1593-600.
- Eckert, A.; Forstl, H.; Zerfass, R.; Hartmann, H.; Muller, W. E. (1996). Lymphocytes and neutrophils as peripheral models to study the effect of beta-amyloid on cellular calcium signalling in Alzheimer's disease. *Life Sci* **59(5-6)**: 499-510.
- Eikelenboom, P.; Bate, C.; Van Gool, W. A.; Hoozemans, J. J. M.; Rozemuller, J. M.; Veerhuis, R.; Williams, A. (2002). Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. *Glia* **40(2)**: 232-239.
- Eikelenboom, P.; Hack, C. E.; Rozemuller, J. M.; Stam, F. C. (1989). Complement activation in amyloid plaques in Alzheimer's dementia. *Virchows Arch. B. Cell Pathol.* **56**: 259-262.
- Eikelenboom, P.; Stam, F. C. (1982). Immunoglobulins and complement factors in senile plaques. An immunoperoxidase study. *Acta Neuropathol (Berl)* **57(2-3)**: 239-42.
- Eikelenboom, P.; van Gool, W. A. (2004). Neuroinflammatory perspectives on the two faces of Alzheimer's disease. *J Neural Transm* **111(3)**: 281-94.
- Engelhart, M. J.; Geerlings, M. I.; Ruitenberg, A.; van Swieten, J. C.; Holman, A.; Witteman, J. C. M.; Breteler, M. M. B. (2002). Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *Jama-Journal of the American Medical Association* **287(24)**: 3223-3229.
- Esposito, E.; Rotilio, D.; Di Matteo, V.; Di Giulio, C.; Cacchio, M.; Algeri, S. (2002). A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiology of Aging* **23(5)**: 719-735.
- Evans, D. A.; Funkenstein, H.; Albert, M. S.; Scherr, P. A.; Cook, N. R.; Chown, M. J.; Hebert, L. E.; Hennekens, C. H.; Taylor, J. O. (1989). Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons: higher than previously reported. *JAMA* **262**: 2551-2556.
- Fernandes, M. A.; Proenca, M. T.; Nogueira, A. J.; Grazina, M. M.; Oliveira, L. M.; Fernandes, A. I.; Santiago, B.; Santana, I.; Oliveira, C. R. (1999). Influence of

apolipoprotein E genotype on blood redox status of Alzheimer's disease patients. *Int J Mol Med* **4(2)**: 179-86.

Fiala, M.; Zhang, L.; Gan, X.; Sherry, B.; Taub, D.; Graves, M. C.; Hama, S.; Way, D.; Weinand, M.; Witte, M.; Lorton, D.; Kuo, Y. M.; Roher, A. E. (1998). Amyloid-beta induces chemokine secretion and monocyte migration across a human blood-brain barrier model. *Mol Med* **4(7)**: 480-9.

Fillit, H.; Ding, W. H.; Buee, L.; Kalman, J.; Altstiel, L.; Lawlor, B.; Wolf-Klein, G. (1991). Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **129(2)**: 318-20.

Finch, C. E.; Laping, N. J.; Morgan, T. E.; Nichols, N. R.; Pasinetti, G. M. (1993). TGF-beta 1 is an organizer of responses to neurodegeneration. *J Cell Biochem* **53(4)**: 314-22.

Fisher, N. J.; Rourke, B. P.; Bieliauskas, L.; Giordani, B.; Berent, S.; Foster, N. L. (1996). Neuropsychological subgroups of patients with Alzheimer's disease. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* **18**: 349-370.

Flanders, K. C.; Lippa, C. F.; Smith, T. W.; Pollen, D. A.; Sporn, M. B. (1995). Altered expression of transforming growth factor-beta in Alzheimer's disease. *Neurology* **45(8)**: 1561-9.

Folstein, M. F.; Folstein, S. E.; McHugh, P. R. (1975). "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* **12(3)**: 189-98.

Forsell, Y.; Fratiglioni, L.; Grut, M.; Viitanen, M.; Winblad, B. (1992). Clinical staging of dementia in a population survey: comparison of DSM-III-R and the Washington University Clinical Dementia Rating Scale. *Acta Psychiatr Scand* **86(1)**: 49-54.

Frackoviak, J.; Wisniewski, H. M.; Wegiel, J.; Merz, G. S.; Iqbal, K.; Wang, K. C. (1992). Ultrastructure of the microglia that phagocytose amyloid and the microglia that produce beta-amyloid fibrils. *Acta Neuropathol. (Berl)*. **84**: 225-233.

Frey, W. H.; Najarian, M. M.; Kumar, K. S. (1996). Endogenous Alzheimer's brain factor and oxidised glutathione inhibit antagonistic binding to the muscarinic receptor. *Brain Res*. **714**: 87-94.

Frolich, L.; Riederer, P. (1995). Free radical mechanisms in dementia of Alzheimer type and the potential for antioxidative treatment. *Drug Res*. **45**: 443-446.

Gey, K. F. (1995). Prevention of early stages of cardiovascular disease and cancer may require concurrent optimization of all major antioxidants and other nutrients; An update and reevaluation of observational data and intervention trials. Free Radicals, Lipoprotein Oxidation and Atherosclerosis. C. Rice-Evans. London, Richelieu Press.

Giannakopoulos, P.; Hof, P. R.; Kovari, E.; Vallet, P. G.; Herrmann, F. R.; Bouras, C. (1996). Distinct patterns of neuronal loss and Alzheimer's disease lesion distribution in elderly individuals older than 90 years. *J Neuropathol Exp Neurol* **55(12)**: 1210-20.

Giannakopoulos, P.; Hof, P. R.; Surini, M.; Michel, J. P.; Bouras, C. (1993). Quantitative immunohistochemical analysis of the distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex of nonagenarians and centenarians. *Acta Neuropathol (Berl)* **85(6)**: 602-10.

Giometto, B.; Argentiero, V.; Sanson, F.; Ongaro, G.; Tavalato, B. (1988). Acute-phase proteins in Alzheimer's disease. *Eur Neurol* **28(1)**: 30-3.

Gitter, B. D.; Boggs, L. N.; May, P. C.; Czilli, D. L.; Carlson, C. D. (2000). Regulation of cytokine secretion and amyloid precursor protein processing by proinflammatory amyloid beta (A beta). *Ann N Y Acad Sci* **917**: 154-64.

Gomez-Isla, T.; Price, J. L.; McKeel, D. W., Jr.; Morris, J. C.; Growdon, J. H.; Hyman, B. T. (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* **16(14)**: 4491-500.

Good, P. F.; Werner, P.; Hsu, A.; Olanow, C. W.; Perl, D. P. (1996). Evidence for neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **149(1)**: 21-27.

Gottfries, C. G.; Bartfai, T.; Carlsson, A.; Eckernäs, S.; Lars, S. (1986). Multiple biochemical deficits in both gray and white matter of Alzheimer's brains. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **10**: 405-413.

Gowing, E.; Roher, A. E.; Woods, A. S.; Cotter, R. J.; Chaney, M.; Little, S. P.; Ball, M. J. (1994). Chemical characterization of A beta 17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Biol Chem* **269(15)**: 10987-90.

Graham, D. G.; Tiffany, S. M.; Bell, W. R. (1978). Autooxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Molecular Pharmacology* **14**: 644-653.

Graham, D. I.; Gentleman, S. M.; Nicoll, J. A.; Royston, M. C.; McKenzie, J. E.; Roberts, G. W.; Griffin, W. S. (1996). Altered beta-APP metabolism after head injury and its relationship to the aetiology of Alzheimer's disease. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* **66**: 96-102.

Griffin, W. S.; Sheng, J. G.; Royston, M. C.; Gentleman, S. M.; McKenzie, J. E.; Graham, D. I.; Roberts, G. W.; Mrak, R. E. (1998). Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol* **8(1)**: 65-72.

Guo, Q.; Fu, W.; Sopher, B. L.; Miller, M. W.; Ware, C. B.; Martin, G. M.; Mattson, M. P. (1999a). Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice. *Nat Med* **5(1)**: 101-6.

Guo, Q.; Sebastian, L.; Sopher, B. L.; Miller, M. W.; Glazner, G. W.; Ware, C. B.; Martin, G. M.; Mattson, M. P. (1999b). Neurotrophic factors [activity-dependent neurotrophic factor (ADNF) and basic fibroblast growth factor (bFGF)] interrupt excitotoxic neurodegenerative cascades promoted by a PS1 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96(7)**: 4125-30.

Guo, Q.; Sebastian, L.; Sopher, B. L.; Miller, M. W.; Ware, C. B.; Martin, G. M.; Mattson, M. P. (1999c). Increased vulnerability of hippocampal neurons from presenilin-1 mutant knock-in mice to amyloid beta-peptide toxicity: central roles of superoxide production and caspase activation. *J Neurochem* **72(3)**: 1019-29.

Hasui, M.; Hirabayashi, Y.; Kobayashi, Y. (1989). Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. *J. Immunol. Methods* **117**: 53-58.

Hauw, J. J.; Vignolo, P.; Duyckaerts, C.; Beck, H.; Forette, F.; Henry, J. F.; Laurent, M.; Piette, F.; Sacht, A.; Berthaux, P. (1986). [Neuropathological study of 12 centenarians: the incidence of Alzheimer type senile dementia is not particularly increased in this group of very old patients]. *Rev Neurol (Paris)* **142(2)**: 107-15.

Haxby, J.; Duara, R.; Grady, C. L.; Culter, N. R.; Rapoport, S. I. (1985). Relations between neuropsychological and cerebral metabolic asymmetries in early Alzheimer's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **5**: 193-200.

Hensley, K.; Hall, N.; Subramaniam, R.; Cole, P.; Harris, M.; Aksenov, M.; Aksenova, M.; Gabbita, S. P.; Wu, J. F.; Carney, J. M.; Lovell, M.; Markesbery, W. R.; Butterfield, D. A. (1995). Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *Journal of Neurochemistry* **65(2146-2156)**.

Heseker, H.; Schneider, R. (1994). Requirements and supply of vitamin C, E and beta-carotene for elderly men and women. *Eur. J. Clin. Nutr* **48(2)**: 118-127.

Ho, L.; Pieroni, C.; Winger, D.; Purohit, D. P.; Aisen, P. S.; Pasinetti, G. M. (1999). Regional distribution of cyclooxygenase-2 in the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* **57(3)**: 295-303.

Hof, P. R.; Bierer, L. M.; Perl, D. P.; Delacourte, A.; Buee, L.; Bouras, C.; Morrison, J. H. (1992). Evidence for early vulnerability of the medial and inferior aspects of the temporal lobe in an 82-year-old patient with preclinical signs of dementia. Regional and laminar distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques. *Arch Neurol* **49(9)**: 946-53.

Hoozemans, J. J. M.; Veerhuis, R.; Janssen, I.; van Elk, E. J.; Rozemuller, A. J. M.; Eikelenboom, P. (2002). The role of cyclo-oxygenase 1 and 2 activity in prostaglandin E-2 secretion by cultured human adult microglia: Implications for Alzheimer's disease. *Brain Research* **951(2)**: 218-226.

Hubbard, B. M.; Fenton, G. W.; Anderson, J. M. (1990). A quantitative histological study of early clinical and preclinical Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* **16(2)**: 111-21.

Huff, F. J.; Growdon, J. H.; Corkin, S.; Rosen, T. J. (1987). Age at onset and rate of progression of Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc* **35(1)**: 27-30.

Hyman, B. T. (1997). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: clinical-pathological studies. *Neurobiol Aging* **18(4 Suppl)**: S27-32.

Iqbal, K.; Alonso, A. C.; Gong, C. X.; Khatoon, S.; Pei, J. J.; Wang, J. Z.; Grundke-Iqbal, I. (1998). Mechanisms of neurofibrillary degeneration and the formation of neurofibrillary tangles. *J Neural Transm Suppl* **53**: 169-80.

Ishii, T.; Haga, S. (1984). Immuno-electron-microscopic localization of complements in amyloid fibrils of senile plaques. *Acta Neuropathol. (Berl)*. **63**: 296-300.

Iwatsubo, T.; Odaka, A.; Suzuki, N.; Mizusawa, H.; Nukina, N.; Ihara, Y. (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* **13(1)**: 45-53.

Iwatsubo, T.; Saido, T. C.; Mann, D. M.; Lee, V. M.; Trojanowski, J. Q. (1996). Full-length amyloid-beta (1-42(43)) and amino-terminally modified and truncated amyloid-beta 42(43) deposit in diffuse plaques. *Am J Pathol* **149(6)**: 1823-30.

Jackson, C. V. E.; Holland, A. J.; Williams, C. A.; Dickerson, J. W. T. (1988). Vitamin E and Alzheimer's disease in subjects with Down's syndrome. *J. Ment. Defic. Res.* **32**: 479-484.

Jacqmin, H.; Commenges, D.; Letenneur, L.; Barberger-Gateau, P.; Dartigues, J. F. (1994). Components of drinking water and risk of cognitive impairment in the elderly. *Am J Epidemiol* **139(1)**: 48-57.

Jellinger, K. A.; Bancher, C. (1998). Senile dementia with tangles (tangle predominant form of senile dementia). *Brain Pathol* **8(2)**: 367-76.

Julius, M.; Lang, C. A.; Gleiberman, L.; Harburg, E.; DiFranceisco, W.; Schork, A. (1994). Glutathione and morbidity in a community-based sample of elderly. *J Clin Epidemiol* **47(9)**: 1021-6.

Junqueira, V. B.; Barros, S. B.; Chan, S. S.; Rodrigues, L.; Giavarotti, L.; Abud, R. L.; Deucher, G. P. (2004). Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med* **25(1-2)**: 5-16.

Kalaria, R. N.; Kroon, S. N. (1992). Complement inhibitor C4-binding protein in amyloid deposits containing serum amyloid P in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186(1)**: 461-466.

Kalaria, R. N.; Perry, G. (1993). Amyloid P component and others acute-phase proteins associated with cerebellar A beta-deposits in Alzheimer's disease. *Brain Research* **631**: 151-155.

Kennard, M. L.; Feldman, H.; Yamada, T. (1996). Serum levels of the iron protein p97 are elevated in Alzheimer's disease. *Nature Medicine* **2**: 1230-1235.

- Knowles, R. B.; Gomez-Isla, T.; Hyman, B. T. (1998). Abeta associated neuropil changes: correlation with neuronal loss and dementia. *J Neuropathol Exp Neurol* **57(12)**: 1122-30.
- Kontush, A. (2001). Amyloid- β : an antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's Disease. *Free Radic. Biol. Med.* **31(9)**: 1120-1131.
- Kusdra, L.; Rempel, H.; Yaffe, K.; Pulliam, L. (2000). Elevation of CD69+ monocyte/macrophages in patients with Alzheimer's disease. *Immunobiology* **202(1)**: 26-33.
- Lai, J. C.; Cooper, A. J. (1986). Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *Journal of Neurochemistry* **47**: 1376-1386.
- Lang, J. K.; Gohil, K.; Packer, L. (1986). Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinols and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions. *Analytical Biochemistry* **157**: 106-116.
- Lewis, D. A.; Campbell, M. J.; Terry, R. D.; Morrison, J. H. (1987). Laminar and regional distributions of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in Alzheimer's disease: a quantitative study of visual and auditory cortices. *J Neurosci* **7(6)**: 1799-808.
- Licastro, F.; Pedrini, S.; Davis, L. J.; Caputo, L.; Tagliabue, J.; Savorani, G.; Cucinotta, D.; Annoni, G. (2001). Alpha-1-antichymotrypsin and oxidative stress in the peripheral blood from patients with probable Alzheimer disease: a short-term longitudinal study. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **15(1)**: 51-5.
- Lovell, M. A.; Ehmann, W. D.; Butler, S. M.; Markesbery, W. R. (1995). Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain of Alzheimer's disease. *Neurology* **45**: 1594-1601.
- Lovell, M. A.; Gabbita, S. P.; Markesbury, W. R. (1999). Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. *J. Neurochem.* **72**: 771-776.
- Lovstad, R. N. (1987). Copper catalyzed oxidation of ascorbate (vitamin C). Inhibitory effects of catalase, superoxide dismutase, serum proteins (ceruloplasmin, albumin, apotransferrin) and aminoacids. *International Journal of Biochemistry* **19**: 309-313.
- Mackenzie, I. R. A. (2001). Postmortem studies of the effect of anti-inflammatory drugs on Alzheimer-type pathology and associated inflammation. *Neurobiology of Aging* **22(6)**: 819-822.
- Mann, D. M.; Esiri, M. M. (1989). The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome. *J Neurol Sci* **89(2-3)**: 169-79.
- Mann, D. M.; Iwatsubo, T.; Ihara, Y.; Cairns, N. J.; Lantos, P. L.; Bogdanovic, N.; Lannfelt, L.; Winblad, B.; Maat-Schieman, M. L.; Rossor, M. N. (1996). Predominant

deposition of amyloid-beta 42(43) in plaques in cases of Alzheimer's disease and hereditary cerebral hemorrhage associated with mutations in the amyloid precursor protein gene. *Am J Pathol* **148(4)**: 1257-66.

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

Martin, A. (1987). Representation of semantic and spatial knowledge in Alzheimer's patients: Implications for models of preserved learning and amnesia. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* **9**: 191-224.

Martin, A.; Brouwers, P.; Lalonde, F.; Cox, C.; Teleska, P.; Fedio, P.; Foster, N. L.; Chase, T. N. (1986). Towards a behavioral typology of Alzheimer's patients. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* **8**: 594-610.

Masaki, K. H.; Losonczy, M. A.; Izmirlian, G.; Foley, D. J.; Ross, G. W.; Petrovitch, H.; Havlik, R.; White, L. R. (2000). Association of vitamin E and C supplement use with cognitive function and dementia in elderly men. *Neurology* **54**: 1265-1272.

Masliah, E.; Mallory, M.; Hansen, L.; DeTeresa, R.; Terry, R. D. (1993). Quantitative synaptic alterations in the human neocortex during normal aging. *Neurology* **43(1)**: 192-7.

Masliah, E.; Terry, R. D.; Alford, M.; DeTeresa, R.; Hansen, L. A. (1991). Cortical and subcortical patterns of synaptophysinlike immunoreactivity in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **138(1)**: 235-46.

Mason, R. P.; Shoemaker, W. J.; Shajenko, L. (1992). Alzheimer's disease brain cortical membrane structure mediated by cholesterol. *Neurobiology of Aging* **13**: 413-419.

Matsuo, E. S.; Shin, R. W.; Billingsley, M. L.; Van deVoorde, A.; O'Connor, M.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. (1994). Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron* **13(4)**: 989-1002.

Mattson, M. P.; Barger, S. W.; Furukawa, K.; Bruce, A. J.; Wyss-Coray, T.; Mark, R. J.; Mucke, L. (1997a). Cellular signaling roles of TGF beta, TNF alpha and beta APP in brain injury responses and Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* **23(1-2)**: 47-61.

Mattson, M. P.; Culmsee, C.; Yu, Z.; Camandola, S. (2000). Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity. *J Neurochem* **74(2)**: 443-56.

Mattson, M. P.; Goodman, Y.; Luo, H.; Fu, W.; Furukawa, K. (1997b). Activation of NF-kappaB protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. *J Neurosci Res* **49(6)**: 681-97.

McCaddon, A.; Hudson, P.; Hill, D.; Barber, J.; Lloyd, A.; Davies, G.; Regland, B. (2003). Alzheimer's disease and total plasma aminothiols. *Biol Psychiatry* **53(3)**: 254-60.

McCord, J.; Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase; an enzymic function for erythrocyte. *Journal of Biological Chemistry* **244**: 6049-6055.

McCulla, M. M.; Coats, M.; Van Fleet, N.; Duchek, J.; Grant, E.; Morris, J. C. (1989). Reliability of clinical nurse specialists in the staging of dementia. *Arch Neurol* **46(11)**: 1210-1.

McGeer, P. L.; Akiyama, H.; Itagaki, S.; McGeer, E. G. (1989). Immune system response in Alzheimer's disease. *Can. J. Neurol. Sci.* **16**: 516-527.

McGeer, P. L.; Kawamata, T.; Walker, D. G. (1992). Distribution of clusterin in Alzheimer brain tissue. *Brain Research* **579**: 337-341.

McGeer, P. L.; McGeer, E. G. (1995). The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **21**: 195-218.

McGeer, P. L.; McGeer, E. G. (2001). Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging* **22(6)**: 799-809.

McGeer, P. L.; Walker, D. G.; Akiyama, H.; Kawamata, T.; Guan, A.; Parker, C. J. (1991). Detection of the membrane inhibitor of reactive lysis (CD59) in diseased neurons of Alzheimer brain. *Brain Research* **544**: 315-319.

McKhann, G. D.; Drachman, D. A.; Folstein, M. F.; Katzman, R.; Price, D.; Stadlan, E. M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of the Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* **34**: 939-944.

McRae, A.; Dahlstrom, A.; Ling, E. A. (1997). Microglia in neurodegenerative diseases: emphasis on Alzheimer's disease. *Gerontology* **43**: 95-108.

Mecocci, P.; MacGarvey, U.; Beal, M. F. (1994). Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **36(5)**: 747-751.

Mecocci, P.; Polidori, M. C.; Cherubini, A.; Ingegneri, T.; Mattioli, P.; Catani, M.; Rinaldi, P.; Cecchetti, R.; Stahl, W.; Senin, U.; Beal, M. F. (2002). Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease. *Archives of Neurology* **59(5)**: 794-798.

Meda, L.; Cassatella, M. A.; Szendrei, G. I.; Otvos, L.; Baron, P.; Villalba, M.; Ferrari, D.; Rossi, F. (1995). Activation of microglial cells by β -amyloid protein and interferon- γ . *Nature* **374**: 647-650.

Mezzetti, A.; Lafenna, D.; Romano, F.; Costantini, F.; Pierdomenico, S. D.; Cesare, D. D.; Cuccurullo, F.; Riario-Sforza, G.; Zuliani, G.; Fellin, R. (1996). Systemic oxidative

stress and its relationship with age and illness. *Journal of the American Geriatrics Society* **44**: 823-827.

Mielke, R.; Kessler, J.; Herholz, K.; Wienhard, K.; Heiss, W. D. (1998). Normal and pathological aging: findings of positron-emission-tomography. *Journal of Neural Transmission* **105**: 821-837.

Morihara, T.; Chu, T.; Ubeda, O.; Beech, W.; Cole, G. M. (2002). Selective inhibition of A beta 42 production by NSAID R- enantiomers. *Journal of Neurochemistry* **83(4)**: 1009-1012.

Morris, J. C. (1993). The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology* **43**: 2412-2414.

Morris, J. C.; Edland, S.; Clark, C.; Galasko, D.; Koss, E.; Mohs, R.; van Belle, G.; Fillenbaum, G.; Heyman, A. (1993). The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part IV. Rates of cognitive change in the longitudinal assessment of probable Alzheimer's disease. *Neurology* **43(12)**: 2457-65.

Morrison, J. H.; Hof, P. R. (1997). Life and death of neurons in the aging brain. *Science* **278(5337)**: 412-9.

Motchnik, P. A.; Frei, B.; Ames, B. N. (1994). Measurement of antioxidants in human blood plasma. *Methods Enzymol.* **234**: 269-279.

Munch, G.; Robinson, S. R. (2002). Potential neurotoxic inflammatory responses to A beta vaccination in humans. *Journal of Neural Transmission* **109(7-8)**: 1081-1087.

Nishihara, Y.; Ishii, N. (1986). Pathological study of demented old people in Japan. *Kyushu Neuro-psychiatry* **31**: 41-45.

Ohkawa, H.; Onishi, N.; Yagi, K. (1979). Assay for lipis peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* **95**: 351-358.

Ojeda, V.; Mastaglia, F. L.; Kakulas, B. A. (1986). Causes of organic dementia: A necropsy survey of 60 cases. *Medical Journal of Australia* **145**: 69-71.

Oteiza, P. I. (1994). A mechanism for the stimulatory effect of aluminum on iron-induced lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* **308(2)**: 374-9.

Ozcankaya, R.; Delibas, N. (2002). Malondialdehyde, superoxide dismutase, melatonin, iron, copper, and zinc blood concentrations in patients with Alzheimer disease: cross-sectional study. *Croat Med J* **43(1)**: 28-32.

Pakkenberg, B.; Gundersen, H. J. (1997). Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. *J Comp Neurol* **384(2)**: 312-20.

Paolisso, G.; Tagliamont, M. R.; Rizzo, M. R.; D., M.; Gambardella, A.; Varricchio, M. (1998). Oxidative stress and advancing age: results in healthy centenarians. *J. Am. Geriatr. Soc.*, **46**: 833-838.

- Parker, W. D.; Boyson, S. J.; Parks, J. K. (1989). Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Annals of Neurology* **26**: 719-723.
- Parker, W. D.; Filley, C. M.; Parks, J. K. (1990). Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology* **40**: 1302-1303.
- Pearson, R. C. A.; Esiri, M. M.; Hiorus, R. W.; Wilcock, G. R.; Powell, T. P. S. (1985). Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in the Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**: 4531-4534.
- Pellegrini-Giampietro, D. E.; Cherichi, G.; Alesiani, M.; Carlà, V.; Moroni, F. (1988). Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free radical formation. *J. Neurochem.* **51(6)**: 1960-1963.
- Percy, M. E.; Dalton, A. J.; Markovic, V. D.; McLachlan, D. R.; Hummel, J. T.; Rusk, A. C.; Andrews, D. F. (1990). Red cell superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in Down syndrome patients with and without manifestations of Alzheimer disease. *Am J Med Genet* **35(4)**: 459-67.
- Perls, T. T.; Bochen, K.; Freeman, M.; Alpert, L.; Silver, M. H. (1999). Validity of reported age and centenarian prevalence in New England. *Age Ageing* **28(2)**: 193-7.
- Perrin, R.; Briancon, S.; Jeandel, C.; Artur, Y.; Minn, A.; Penin, F.; Siest, G. (1990). Blood activity of Cu/Zn superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in Alzheimer's disease: a case-control study. *Gerontology* **36(5-6)**: 306-13.
- Perry, G.; Kawai, M.; Tabaton, M.; Onorato, M.; Mulvihill, P.; Richey, P.; Morandi, A.; Connolly, J. A.; Gambetti, P. (1991). Neuropil threads of Alzheimer's disease show a marked alteration of the normal cytoskeleton. *J Neurosci* **11(6)**: 1748-55.
- Perry, G.; Nunomura, A.; Hirai, K.; Zhu, X. W.; Perez, M.; Avila, J.; Castellani, R. J.; Atwood, C. S.; Aliev, G.; Sayre, L. M.; Takeda, A.; Smith, M. A. (2002). Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases? *Free Radical Biology and Medicine* **33(11)**: 1475-1479.
- Perry, T. L.; Yong, V. W.; Bergeron, C.; Hansen, S.; Jones, K. (1987). Aminoacids, glutathione and glutathione transferase activity in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **21**: 331-336.
- Pitchumoni, S. S.; Doraiswamy, P. M. (1998). Current status of antioxidant therapy for Alzheimer's Disease. *J. Am. Geriatr. Soc.* **46(12)**: 1566-1572.
- Polidori, M. C.; Mattioli, P.; Aldred, S.; Cecchetti, R.; Stahl, W.; Griffiths, H.; Senin, U.; Sies, H.; Mecocci, P. (2004). Plasma Antioxidant Status, Immunoglobulin G Oxidation and Lipid Peroxidation in Demented Patients: Relevance to Alzheimer Disease and Vascular Dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* **18(3-4)**: 265-270.
- Prehn, J. H.; Backhauss, C.; Krieglstein, J. (1993). Transforming growth factor-beta 1 prevents glutamate neurotoxicity in rat neocortical cultures and protects mouse neocortex from ischemic injury in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* **13(3)**: 521-5.

- Price, J. L.; Davis, P. B.; Morris, J. C.; White, D. L. (1991). The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **12(4)**: 295-312.
- Quinlan, G. J.; Halliwell, B.; Moorhouse, C. P.; Gutteridge, J. M. C. (1988). Action of lead (II) and aluminum (III) ions on iron-stimulated lipid peroxides on liposomes, erythrocytes, and rat liver microsomal fractions. *Biochim. Biophys. Acta* **962**: 196-200.
- Ramos, L. R.; Toniolo, J.; Cendoroglo, M. S.; Garcia, J. T.; Najas, M. S.; Perracini, M.; Paola, C. R.; Santos, F. C.; Bilton, T.; Ebel, S. J.; Macedo, M. B.; Almada, C. M.; Nasri, F.; Miranda, R. D.; Goncalves, M.; Santos, A. L.; Fraietta, R.; Vivacqua, I.; Alves, M. L.; Tudisco, E. S. (1998). Two-year follow-up study of elderly residents in S. Paulo, Brazil: methodology and preliminary results. *Rev Saude Publica* **32(5)**: 397-407.
- Rank, K. B.; Pauley, A. M.; Bhattacharya, K.; Wang, Z.; Evans, D. B.; Fleck, T. J.; Johnston, J. A.; Sharma, S. K. (2002). Direct interaction of soluble human recombinant tau protein with A β 1-42 results in tau aggregation and hyperphosphorylation by tau protein kinase II. *FEBS Letters* **514**: 263-268.
- Repetto, M. G.; Reides, C. G.; Evelson, P.; Kohan, S.; de Lustig, E. S.; Llesuy, S. F. (1999). Peripheral markers of oxidative stress in probable Alzheimer patients. *Eur J Clin Invest* **29(7)**: 643-9.
- Reznick, A. Z.; Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* **233**: 357-364.
- Rifat, S. L.; Eastwood, M. R.; McLachlan, D. R.; Corey, P. N. (1990). Effect of exposure of miners to aluminium powder. *Lancet* **336(8724)**: 1162-5.
- Rondanelli, M.; Melzi d'Eril, G. V.; Anesi, A.; Ferrari, E. (1997). Altered oxidative stress in healthy old subjects. *Aging (Milano)* **9(3)**: 221-3.
- Rossi, L.; Squitti, R.; Pasqualetti, P.; Marchese, E.; Cassetta, E.; Forastiere, E.; Rotilio, G.; Rossini, P. M.; Finazzi-Agro, A. (2002). Red blood cell copper, zinc superoxide dismutase activity is higher in Alzheimer's disease and is decreased by D-penicillamine. *Neurosci Lett* **329(2)**: 137-40.
- Rubin, E. H.; Morris, J. C.; Grant, E. A.; Vendegna, T. (1989). Very mild senile dementia of the Alzheimer type. I. Clinical assessment. *Arch Neurol* **46(4)**: 379-82.
- Russel, E. M.; Burns, A. (1998). Presentation and Clinical Management of Dementia. *Brocklenhurst's Textbook of Geriatric Medicine and Gerontology*: 721-740.
- Sacchettini, J. C.; Kelly, J. W. (2002). Therapeutic strategies for human amyloid diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* **1(4)**: 267-275.
- Salmon, D. P.; Thal, L. J.; Butters, N.; Heindel, W. C. (1990). Longitudinal evaluation of dementia of the Alzheimer type: A comparison of 3 standardized mental status examinations. *Neurology* **40**: 1225-1230.

Sano, M. (2002). Do dietary antioxidants prevent Alzheimer's disease? *Lancet Neurology* **1(6)**: 342-342.

Sano, M.; Ernesto, C.; Thomas, R. G.; Klauber, M. R.; Schafer, K.; Grundman, M.; Woodbury, P.; Growdon, J.; Cotman, C. W.; Pfeiffer, E.; Schneider, L. S.; Thal, L. J. (1997). A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* **336**: 1246-1222.

Schöneich, C. (2002). Redox processes of methionine relevant to beta-amyloid oxidation and Alzheimer's Disease. *Arch. Biochem. Biophys.* **397(2)**: 370-376.

Schor, N. F. (1988). Inactivation of mammalian brain glutamine synthetase by oxygen radicals. *Brain Res.* **456**: 17-21.

Schulz, J. B.; Lindenau, J.; Seyfried, J.; Dichgans, J. (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* **267(16)**: 4904-11.

Schwab, C.; Akiyama, H.; McGeer, E. G.; McGeer, P. L. (1998). Extracellular neurofibrillary tangles are immunopositive for the 40 carboxy-terminal sequence of beta-amyloid protein. *J Neuropathol Exp Neurol* **57(12)**: 1131-7.

Senior, K. (2002). Dosing in phase II trial of Alzheimer's vaccine suspended. *Lancet Neurology* **1(1)**: 3-3.

Seshadri, S.; Beiser, A.; Selhub, J.; Jacques, P. F.; Rosenberg, I. H.; D'Agostino, R. B.; Wilson, P. W. F.; Wolf, P. A. (2002). Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **346(7)**: 476-483.

Shalit, F.; Sredni, B.; Stern, L.; Kott, E.; Huberman, M. (1994). Elevated interleukin-6 secretion levels by mononuclear cells of Alzheimer's patients. *Neurosci Lett* **174(2)**: 130-2.

Sheng, J. G.; Bora, S. H.; Xu, G.; Borchelt, D. R.; Price, D. L.; Koliatsos, V. E. (2003). Lipopolysaccharide-induced-neuroinflammation increases intracellular accumulation of amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in APP^{sw} transgenic mice. *Neurobiol Dis* **14(1)**: 133-45.

Shin, R. W.; Bramblett, G. T.; Lee, V. M.; Trojanowski, J. Q. (1993). Alzheimer disease A68 proteins injected into rat brain induce codeposits of beta-amyloid, ubiquitin, and alpha 1-antichymotrypsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90(14)**: 6825-8.

Sies, H.; Koch, O. R.; Martino, E.; Boveris, A. (1979). Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. *FEBS Letters* **103**: 287-290.

Smale, G.; Nichols, N. R.; Brady, D. R.; Finch, C. E.; Horton, W. E., Jr. (1995). Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **133(2)**: 225-30.

Smith, C. D.; Carney, J. M.; Starke-Reed, P. E.; Oliver, C. N.; Stadtman, E. R.; Floyd, R. A.; Markesbury, W. R. (1991). Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in

normal aging and in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**: 10540-10543.

Smith, M. A.; Casadesus, G.; Joseph, J.; Perry, G. (2002). Causes and consequences of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine* **33**: 1194-1199.

Smith, M. A.; Siedlak, S. L.; Richey, P. L.; Mulvihill, P.; Ghiso, J.; Frangione, B.; Tagliavini, F.; Giaccone, G.; Bugiani, O.; Praprotnik, D.; et al. (1995). Tau protein directly interacts with the amyloid beta-protein precursor: implications for Alzheimer's disease. *Nat Med* **1(4)**: 365-9.

Snaedal, J.; Kristinsson, J.; Gunnarsdottir, S.; Olafsdottir, M.; Baldvinsson, M.; Johannesson, T. (1998). Copper, ceruloplasmin and superoxide dismutase in patients with Alzheimer's disease . a case-control study. *Dement Geriatr Cogn Disord* **9(5)**: 239-42.

Sobel, E.; Louhija, J.; Sulkava, R.; Davanipour, Z.; Kontula, K.; Miettinen, H.; Tikkanen, M.; Kainulainen, K.; Tilvis, R. (1995). Lack of association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset Alzheimer's disease among Finnish centenarians. *Neurology* **45(5)**: 903-7.

Spillantini, M. G.; Bird, T. D.; Ghetti, B. (1998). Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. *Brain Pathol* **8(2)**: 387-402.

Stacey, N. H.; Kappus, H. (1982). Cellular toxicity and lipid peroxidation in response to mercury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **63**: 29-35.

Stadelmann, C.; Bruck, W.; Bancher, C.; Jellinger, K.; Lassmann, H. (1998). Alzheimer disease: DNA fragmentation indicates increased neuronal vulnerability, but not apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol* **57(5)**: 456-64.

Stocker, R.; Frei, B. (1991). Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. H. Sies. London, Academic Press.

Subbarao, K. V.; Richardson, J. S.; Ang, L. C. (1990). Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. *J. Neurochem.* **55**: 342-345.

Sun, Y. X.; Crisby, M.; Lindgren, S.; Janciauskiene, S. (2003). Pravastatin inhibits pro-inflammatory effects of Alzheimer's peptide A beta(1-42) in glioma cell culture in vitro. *Pharmacological Research* **47(2)**: 119-126.

Tabet, N.; Walker, Z.; Mantle, D.; Costa, D.; Orrell, M. (2003). In vivo dopamine pre-synaptic receptors and antioxidant activities in patients with Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and in controls. A preliminary report. *Dement Geriatr Cogn Disord* **16(1)**: 46-51.

Thal, L. J.; Grundman, M.; Klauber, M. R. (1988). Dementia: Characteristics of a referral population and factors associated with progression. *Neurology* **38**: 1083-1090.

- Thomas, T. (1996). Beta-amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature* **380**: 168-171.
- Tietze, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry* **27**: 502-522.
- Turnbull, S.; Tabner, B. J.; El-Agnaf, O. M. A.; Twyman, L. J.; Allsop, D. (2001). New evidence that the Alzheimer beta-amyloid peptide does not spontaneously form free radical: An ESR study using a series of spin traps. *Free Radic. Biol. Med.* **30(10)**: 1154-1163.
- Valdois, N.; Joannete, Y.; Poissant, A.; Ska, B.; Dehaut, F. (1990). Heterogeneity in the cognitive profile of normal elderly. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* **12**: 587-596.
- Vallet, P. G.; Guntern, R.; Hof, P. R.; Golaz, J.; Delacourte, A.; Robakis, N. K.; Bouras, C. (1992). A comparative study of histological and immunohistochemical methods for neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* **83(2)**: 170-8.
- van de Nes, J. A.; Kamphorst, W.; Ravid, R.; Swaab, D. F. (1998). Comparison of beta-protein/A4 deposits and Alz-50-stained cytoskeletal changes in the hypothalamus and adjoining areas of Alzheimer's disease patients: amorphous plaques and cytoskeletal changes occur independently. *Acta Neuropathol (Berl)* **96(2)**: 129-38.
- van der Wal, E. A.; Gomez-Pinilla, F.; Cotman, C. W. (1993). Transforming growth factor-beta 1 is in plaques in Alzheimer and Down pathologies. *Neuroreport* **4(1)**: 69-72.
- van Duijn, C. M. (1996). Epidemiology of the dementias: recent developments and new approaches. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **60(5)**: 478-88.
- Van Kampen, E. J.; Zizlstra, W. C. (1961). Standardization of hemoglobimetry. II> The hemoglobincyanide method. *Clinica Chimica Acta* **6**: 538-544.
- Vanderjagt, D. J.; Garry, P. J.; N., B. H. (1987). Ascorbic acid intake and plasma levels in healthy elderly people. *Am. J. Clin. Nutr* **46**: 290-294.
- Vina, J.; Lloret, A.; Orti, R.; Alonso, D. (2004). Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress. *Mol Aspects Med* **25(1-2)**: 117-23.
- von Strauss, E.; Viitanen, M.; De Ronchi, D.; Winblad, B.; Fratiglioni, L. (1999). Aging and the occurrence of dementia: Findings from a population-based cohort with a large sample of nonagenarians. *Archives of Neurology* **56**: 587-592.
- Wade, A. M.; Mirsen, T. R.; Hachinski, V. C.; Fisman, M.; Lau, C.; Merskey, H. (1987). The clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *Archives of Neurology* **44**: 24-29.

- Wagner, E. S.; Lindley, B.; D., C. R. (1979). High-performance liquid chromatographic determination of ascorbic acid in urine. Effect on urinary excretion profiles after oral and intravenous administration of vitamin C. *Chromatography* **163**: 225-229.
- Walker, D. G.; Lue, L. F.; Beach, T. G. (2001). Gene expression profiling of amyloid beta peptide-stimulated human post-mortem brain microglia. *Neurobiol Aging* **22(6)**: 957-66.
- Wegiel, J.; Imaki, H.; Wang, K. C.; Wronska, A.; Osuchowski, M.; Rubenstein, R. (2003). Origin and turnover of microglial cells in fibrillar plaques of APPsw transgenic mice. *Acta Neuropathol (Berl)* **105(4)**: 393-402.
- West, M. J.; Coleman, P. D.; Flood, D. G.; Troncoso, J. C. (1994). Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* **344(8925)**: 769-72.
- West, M. J.; Gundersen, H. J. (1990). Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol* **296(1)**: 1-22.
- White, K. E.; Cummings, J. L. (1997). Neuropsychiatric Aspects of Alzheimer's Disease and Other Dementing Illnesses. Textbook of Neuropsychiatry. R. E. Hales, The American Psychiatric Press: 823-853.
- Wilson, C. J.; Finch, C. E.; Cohen, H. J. (2002). Cytokines and cognition - The case for a head-to-toe inflammatory paradigm. *Journal of the American Geriatrics Society* **50(12)**: 2041-2056.
- Wisniewski, H. M.; Silverman, W. (1997). Diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer's disease: current status and major issues. *Neurobiol Aging* **18(4 Suppl)**: S43-50.
- Wisniewski, H. M.; Wegiel, J. (1991). Spatial relationships between astrocytes and classical plaque components. *Neurobiology of Aging* **12**: 642-645.
- Wisniewski, H. M.; Wegiel, J. (1992). The role of perivascular and microglial cells in fibrillogenesis of beta-amyloid and PrP protein in Alzheimer's disease and scrapie. *Research in Immunology* **143**: 642-645.
- Wyss-Coray, T.; Feng, L.; Masliah, E.; Ruppe, M. D.; Lee, H. S.; Toggas, S. M.; Rockenstein, E. M.; Mucke, L. (1995). Increased central nervous system production of extracellular matrix components and development of hydrocephalus in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1. *Am J Pathol* **147(1)**: 53-67.
- Xiang, Z.; Ho, L.; Yemul, S.; Zhao, Z.; Qing, W.; Pompl, P.; Kelley, K.; Dang, A.; Teplow, D.; Pasinetti, G. M. (2002). Cyclooxygenase-2 promotes amyloid plaque deposition in a mouse model of Alzheimer's disease neuropathology. *Gene Expr* **10(5-6)**: 271-8.
- Yamaguchi, H.; Nakazato, Y.; Kawarabayashi, T.; Ishiguro, K.; Ihara, Y.; Morimatsu, M.; Hirai, S. (1991). Extracellular neurofibrillary tangles associated with degenerating

neurites and neuropil threads in Alzheimer-type dementia. *Acta Neuropathol (Berl)* **81(6)**: 603-9.

Yatin, S.; Aksenov, M.; Butterfield, D. A. (1999). The antioxidant vitamin E modulates amyloid β -peptide-induced creatine kinase activity inhibition and increased protein oxidation: implications for the free radical hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* **24(3)**: 427-435.

Yu, Z.; Zhou, D.; Bruce-Keller, A. J.; Kindy, M. S.; Mattson, M. P. (1999). Lack of the p50 subunit of nuclear factor-kappaB increases the vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic injury. *J Neurosci* **19(20)**: 8856-65.

Zandi, P. P.; Anthony, J. C.; Khachaturian, A. S.; Stone, S. V.; Gustafson, D.; Tschanz, J. T.; Norton, M. C.; Welsh-Bohmer, K. A.; Breitner, J. C. (2004). Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study. *Arch Neurol* **61(1)**: 82-8.

Zubenko, G. S. (1986). Hippocampal membrane alteration in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **385**: 115-121.

8. ANEXO I



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 6 de fevereiro de 2004.
CEP 0859/03

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) LEANDRO GIAVAROTTI
Disciplina/Departamento: Geriatria e Gerontologia/Medicina da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Monócitos como indicadores de atividade inflamatória e oxidativa em idosos sem déficit cognitivo e com doença de alzheimer".

Prezado(a) Pesquisador(a).

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa acima referenciado.

Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Apresentar primeiro relatório parcial em **04/agosto/2004**.
5. Apresentar segundo relatório parcial em **31/janeiro/2005**.

Atenciosamente.

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."

9. ANEXO II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Monócitos como Indicadores de Atividade Inflamatória e Oxidativa em Idosos sem Déficit Cognitivo e com Doença de Alzheimer

Alguns estudos indicam que a doença de Alzheimer pode ser causada por processos inflamatórios. O objetivo deste estudo é utilizar a atividade dos monócitos circulantes como indicador da atividade inflamatória e oxidativa do organismo de idosos que não apresentam sinais de déficit cognitivo e idosos que apresentam sintomas de Doença de Alzheimer. O paciente será submetido a uma coleta de sangue rotineira por punção periférica da veia do antebraço, procedimento este que não acarreta nenhum risco ao mesmo. O sangue assim coletado será utilizado para a avaliação de uma série de parâmetros bioquímicos que não são rotineiramente utilizados. Estes parâmetros são: potencial peroxidativo plasmático, nível plasmático de proteínas oxidadas, concentração plasmática de vitamina C, vitamina E, β -caroteno, licopeno e ubiquinol-10, dosagem das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, atividade dos monócitos mediante sua produção de peróxido de hidrogênio, interleucinas 1 e 6, e TNF- α , HLA-DR e CD11b.

O participante não será diretamente beneficiado pelo estudo, e em qualquer etapa do estudo, o mesmo terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para o esclarecimento de eventuais dúvidas. O médico responsável é o Dr. Luiz Roberto Ramos, que pode ser encontrado no endereço Rua dos Otonis 731, telefone 5576-4432. Se você tiver algum comentário ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162. O paciente pode retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem prejuízo de seu atendimento na instituição.

As informações obtidas neste estudo serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes, sendo que não haverá a divulgação da identidade de nenhum paciente. O paciente tem o direito de se manter atualizado sobre os resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas, assim como não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se houver a qualquer despesa adicional, a mesma será coberta pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante terá direito a tratamento médico na instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Os pesquisadores comprometem-se a utilizar os dados e o material coletado apenas para esta pesquisa.

Declaro que li e compreendi os objetivos da pesquisa e consinto em participar da mesma

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

10. ANEXO III
MMSE

Agora faremos algumas perguntas para saber como está sua memória. Sabemos que com o tempo as pessoas vão tendo mais dificuldades para se lembrar das coisas. Não se preocupe com o resultado das perguntas.

(1) Certo (0) Errado

47) Qual o dia em que estamos?

- 1() ano
- 2() semestre
- 3() mês
- 4() dia do mês
- 5() dia da semana

47a) Onde nós estamos?

- 1() clínica
- 2() rua
- 3() bairro
- 4() cidade
- 5() estado

47b) Repita as palavras(um segundo para dizer cada uma, depois pergunte todas as três)

- 1() Caneca
- 2() Tijolo
- 3() Tapete

Se ele não conseguir repetir as três, repita até que aprenda as três. Conte as tentativas_____

47c) Se de 100 Reais forem tirados 7, quanto resta? E se tirarmos mais 7, quanto resta?
(total de 5 subtrações)

- 1() _____(93)
- 2() _____(86)
- 3() _____(79)
- 4() _____(72)
- 5() _____(65)

47d) Soletrar a palavra “mundo” de trás para frente.

- 1() _____O
- 2() _____D
- 3() _____N
- 4() _____U
- 5() _____M

47e) Repita as três palavras que disse há pouco:

1() _____

2() _____

3() _____

47f) Mostre um relógio de pulso e pergunte: O que é isto? Repita com o lápis.

1() Relógio

2() Lápis

47g) Repita o seguinte:

() “Nem aqui, nem ali, nem lá”

47h) Siga uma ordem em três estágios

() Tome um papel com a mão direita

() Dobre-o ao meio

() Ponha-o no chão

47i) Leia e execute o seguinte:(cartão) “Feche os olhos” ()

47j) Escreva uma frase: _____ ()

47k) Copie este desenho: (cartão) ()

11. ANEXO IV
CDR

CDR CLINICAL DEMENTIA RATING

DANO	NENHUM 0	QUESTIONÁVEL 0,5	LEVE 1	MODERADO 2	GRAVE 3
Memória (Critério original)	Nenhuma perda ou leve esquecimento inconsistente	Leve e consistente esquecimento, parcial recordação de eventos	Moderada perda de memória, mais marcada para eventos recentes, interfere nas atividades diárias	Perda de memória grave, somente material altamente aprendido é retido, novo material é rapidamente perdido	Grave perda de memória, somente fragmentos persistem
Memória (Expansão do critério)					
Compromissos	Raramente perde compromissos (menos que 3 vezes ao ano)	Pode perder compromissos várias vezes ao ano	Frequentemente perde compromissos (várias vezes, meses ou semanalmente)		
			Perde importantes compromissos		
			Depende muito de alguém para lembrar compromisso		
Uso da agenda	Aumento da dependência da agenda, devido ao aumento de compromissos; aumenta envolvimento em atividades ou mudança de atividades a partir da aposentadoria	Aumento da dependência da agenda, apesar de menos responsabilidade desde a aposentadoria	Quase sempre necessita agenda		
		Ocasionalmente esquece de olhar a agenda	Frequentemente esquece de olhar a agenda		
			Tem que checar várias vezes a agenda no decorrer do dia		
			Recorda incorretamente dados da agenda		

DANO	NENHUM 0	QUESTIONAVEL 0.5	LEVE 1	MODERADO 2	GRAVE 3
	Insignificante aumento nos lembretes ou lembretes relativos a novas responsabilidades	Frequentes lembretes para recordar - se de coisas que previamente não necessitava de lembretes	Precisa escrever tudo ou esquecerá		
Lembretes		Uso recente de listas	Esquece coisas, apesar do uso novo de listas		
		Ocasionalmente esquece de pequenas tarefas ou obrigações a não ser que use listas	Frequentemente esquece pequenas tarefas a não ser que use listas		
			Faz listas, mas esquece de usa-las (não inclui lista de compras)		
Repete histórias ou questões	Pode repetir histórias ou questões para outros, mas isso não é uma mudança, troca ocorre raramente ou é devido a problemas auditivos	Aumenta a repetição de histórias ou questões	Frequentemente repete histórias ou questões		
		Dificuldade em lembrar se já contou uma história, de tal forma que sempre pergunta: "Eu já contei?"	Decresce percepção que já contou história, ou deixa de perguntar se já contou		
		Repete questões dentro da semana ou dia (várias vezes no mês, poucas na semana)	Frequentemente repete questões já perguntadas na semana, no dia ou algumas vezes na hora		

DANO	NENHUM 0	QUESTIONÁVEL 0,5	LEVE 1	MODERADO 2	SEVERO 3
Conversação e mensagens	Nenhuma dificuldade de recordar conversações ou mensagens, preserva perfil pré-mórbido	Esquece detalhes de conversação ocasionalmente, representa mudanças do perfil	Esquece detalhes de conversação regularmente		
		Ocasionalmente esquece de passar mensagens	Regularmente esquece de passar mensagens		
		Progressivamente escreve recados	Deve escrever recados		
		Ocasionalmente esquece importantes informações contadas para ele	Progressivamente esquece passar mensagens		
			Pode ficar chateado por não ter sido comunicado de fatos, que na verdade lhe foram transmitidos		
Itens extraviados (colocar em lugar impróprio)	Pode extraviar coisas, mas nenhuma mudança ou mínima mudança	Aumenta dificuldade em localizar itens comuns (chaves, óculos), várias vezes por semana	Extravio de itens quase diariamente		
	Raramente esquece importantes itens (jóias, documentos)	Ocasionalmente extravio de itens importantes	Frequentemente extravia itens importantes		
		Dificuldade em localizar itens extraviados, os localiza	Pode nunca encontrar itens extraviados		
		Aumento de sistema para combater a dificuldade de localizar itens, (ex: comprar muitos óculos, chaves)	Dificuldade para localizar itens continua a ocorrer, apesar dos meios para preveni-los		

DAÑO	NENHUM 0	QUESTIONAVEL 0.5	LEVE 1	MODERADO 2	GRAVE 3
	difficuldade ocasional	Notável aumento desta (pode ocorrer várias vezes na semana ou mesmo diariamente, mas, raramente múltiplas vezes num mesmo dia)	ocorre múltiplas vezes ao dia.		
	As vezes leva um tempo maior para lembrar-se de palavras	Frequentemente leva mais tempo para lembrar-se de palavras	Frequentemente incapaz de lembrar-se de palavras		
Dificuldade em encontrar palavras	Terceiros ocasionalmente sugerem palavras	Progressivamente terceiros devem sugerir palavras	Terceiros constantemente devem sugerir palavras		
	imperceptível a terceiros	progressivamente perceptível a terceiros	Dificuldade óbvia a terceiros		
		Ocasionalmente substitui por palavras mais simples	Progressivamente utiliza linguagem simplificada		
			Decrescente expressão verbal em público		
		Dificuldade de pensar em nomes, mas não é uma mudança	Dificuldade de pensar em nomes ocorre múltiplas vezes no mês, mas não diariamente	Dificuldade com nomes quase diariamente	
Encontrar nomes de pessoas	Ocasional dificuldade com nomes não familiares, pessoas famosas pessoas que não vê mais regularmente, como colegas de trabalho antigos	Notável aumento na dificuldade de encontrar nomes não familiares	Grande dificuldade com nomes não familiares		
		Ocasional dificuldade com nomes familiares	Notável aumento na dificuldade com nomes familiares		
		Recente desenvolvimento de estratégias para enfrentar o aumento da dificuldade em encontrar nomes	Aumento na dificuldade de encontrar nomes, apesar das estratégias		
Eventos Recentes	As vezes se esquece de eventos recentes e isto é uma mudança	Frequentemente se esquece de eventos recentes			

DANO	NENHUM 0	QUESTIONÁVEL 0,5	LEVE 1	MODERADO 2	GRAVE 3
Orientação Critério Original	Totalmente orientado	Totalmente orientado, com exceção de leve dificuldade com relações de tempo	Dificuldade moderada com relações de tempo; orientado em relação ao local do exame; pode ter desorientação geográfica em outros lugares	Grave dificuldade com relação ao tempo, frequentemente no espaço	Apenas orientado em relação às pessoas
Orientação Critério expandido					
Orientação	Completamente orientado em relação a pessoas	Completamente orientado em relação a pessoas	Orientada em relação a pessoas na hora do exame		
	Completamente orientado em relação a lugar	Completamente orientado em relação ao local do exame	Podem não estar orientados em relação ao local do exame		
	Completamente orientado em relação a tempo e data	Podem não saber a data exata, mas estão orientados em relação a dia, mês e ano	Frequentemente não sabe a data e às vezes o dia, mas está orientado em relação a mês e ano		
Relações de Tempo	Não tem dificuldade com relações de tempo	Leve dificuldade com relações de tempo (ex.: às vezes confundindo a ordem de eventos importantes)	Aumento progressivo de dificuldade com relações de tempo		
			Podem não ser capazes de calcular o tempo dentro de uma hora, sem olhar o relógio		
Áreas Familiares	Orientado nas áreas familiares	Ocasional desorientação passageira em áreas familiares (ex.: sente-se perdido)	Desorientação mais frequente em áreas familiares, podem ocorrer em bases semanais ou mensais		
		Ocasionalmente pode não reconhecer áreas familiares, momentaneamente (ex.: sentimento de "Onde estou?")	Progressivamente não reconheça, momentaneamente, lugares familiares		
			Perde-se em áreas familiares		
			Podem não encontrar o caminho de volta sem ajuda		

DANO	NENHUM 0	QUIESTIONAVEL 0,5	LEVE 1	MODERADO 2	GRAVE 3
Áreas não familiares	Sem mudança na habilidade de encontrar seu caminho em áreas não familiares	As vezes perde-se em áreas não familiares e isto é uma mudança	Freqüentemente se perde em áreas não familiares		
		Aumento de incerteza ao localizar-se em áreas não familiares	Evita ir a áreas não familiares porque pode perder-se		
Direções	Sem mudança no sentido de direção	Nóvel mudança no sentido de direção	Mudança significativa no sentido de direção		
		Aumento de dependência em terceiros para localizar-se	Depende muito de terceiros para localizar-se		
		Aumento de dependência de mapas ou direções escritas	Freqüentemente necessita de mapas ou direções escritas		
			Uso de direções escritas/mapas não o previne de perder-se		

DANO	NENHUM 0	QUESTIONAVEL 0,5	LEVE 1	MODERADO 2	GRAVE 3
Julgamento e soluções de problemas (critério original)	Soluciona problemas diários bem; maneja negócios e assuntos financeiros; bom julgamento em relação ao desempenho no passado	Leve dificuldade em solucionar problemas, similtandades, diferenças	Moderada dificuldade no manejo de problemas, similtandades, diferenças, julgamento social geralmente mantido	Dano grave no manejo de problemas, similtandades, diferenças; julgamento social geralmente prejudicado	Incapaz de fazer julgamentos e solucionar problemas
Julgamento e soluções de problemas (Expansão do critério)					
Julgamento e solução de problemas	Soluciona bem problemas em relação ao desempenho passado	Leve dificuldade no manejar problemas	Aumento da dificuldade em manejar problemas		
		Aumento da dependência de outro para solucionar problemas ou fazer planos	Quase sempre precisa da ajuda de outros para solucionar problemas ou fazer coisas		
		Suaavemente mais concreto ao solucionar problemas diários	Progressivamente concreto ao solucionar problemas diários		
		Ocasionalmente se confunde quando maneja mais de um problema ao mesmo tempo	Frequentemente se confunde quando maneja mais de um problema ao mesmo tempo		
		Acompanhante relata leve mudança no modo de dirigir com maior ou menor cautela	Acompanhante relata notável mudança no modo de dirigir com menor ou maior cautela		
Direção (dirigir)	Nenhuma mudança ou diminuição na direção secundária à dificuldade visual	Um pouco mais de dificuldade em tomar decisões	Clara dificuldade em tomar decisões quando dirige		
		Podem ter escapado por um litz, e/ou tido acidentes no passado, mas, geralmente, não é sua culpa	Podem ter escapado por um litz, e/ou tido acidentes no passado e, geralmente, é sua a culpa		
		Manejo da direção segundo cuidador, não é tão bom devido às falhas citadas acima	Cuidador frequentemente dirige, porque o sujeito não dirige tão bem quanto antes		
Classificação do julgamento pelo cuidador	Julgamento e solução de problemas tão bons quanto antes	Bom julgamento, mas não tão bom quanto antes	Julgamento e solução de problemas definido com razoável, mudança definitiva no nível pré-mórbido		

DANO	NENHUM 0	QUESTIONAVEL 0,5	LEVE 1	MODERADO 2	GRAVE 3
Habilidade no manuseio de pequenas somas em dinheiro	Nenhuma mudança ou mudança mínima na habilidade pré-mórbida de manusear pequenas quantias de dinheiro	Pequena perda na habilidade de manusear pequenas somas em dinheiro			
		Pode levar mais tempo quando calculando uma gorjeta ou um troco	Constantemente confuso quando calculando uma gorjeta ou um troco		
	Crescente dependência em outros para calcular gorjetas	Sempre precisa que outros calculem a gorjeta e isto é uma mudança			
		Crescente uso de cartões de crédito para evitar ter de dar ou receber troco			
Habilidade de enfrentar transações financeiras e de negócios mais complicados	Sem mudanças, ainda independente ou pode nunca ter sido bom nisso ou nunca ter se envolvido; considera transações comerciais um desafio, mas isso acontece pelo aumento das atividades (acompanhante deve dizer este é o caso)	Precisa de conselhos quando remaneando finanças mais complicadas, e isto é uma mudança	Desistiu de tomar decisões mais complicadas, de forma independente, Pode não mais ter talão de cheques independente		
	Talão de cheques bem mantido	Cometeu pelo menos 2 ou 3 erros em talões de cheques (transpõe números, mistura as colunas de retirada e depósito)	Frequentemente comete erros em talões de cheques		
		Aumento no número de cheques perdidos	Repetidamente pula cheques		
	Pode ter esquecido de pagar contas 1 vez em um ano, mas isto é um incidente isolado	Esqueceu-se de pagar contas, ou pagou-as 2x pelo menos 2 ou 3 vezes num ano - este comportamento é novo	Constantemente se esquece de pagar contas e precisa ser lembrado por outros para que o faça		
		Recentemente implementou um sistema para lidar com transações financeiras e de negócios	Dificuldade em gerenciar transações financeiras apesar do sistema desenvolvido para prevent-las		

DANO	NENHUM 0	QUESTIONAVEL 0.5	LEVE 1	MODERADO 2	GRAVE 3
Emergências domiciliares (E.D.)	Manejo de ED tão bom quanto antes, se maior dificuldade, devido a problemas físicos ou sensoriais, não no pensamento ou memória	Menos eficiente no manejo da E.D., devido a memória ou dificuldade no pensamento	Necessita de pistas, orientações no manejo de ED (ex.: pode precisar ser orientado sobre o que fazer se o companheiro adormecer à noite)		
		Eventualmente capaz de manejar E.D. por si	Não é confiável para o manejo E.D. por si próprio		
			Toma decisões e faz ações sem segurança em atividades de ED		
Compreensão e conceitos de situações	Nenhuma mudança na função pré-mórbida; usualmente compreende situações, se encontra dificuldade é devido à perda dos sentidos (ex. audição)	Algumas vezes necessita mais detalhes da explanação ou repetições	Freqüentemente necessita de mais detalhes de explicações ou repetições		
		Eventualmente compreenderá conceitos	Somente algumas vezes compreende situações, mesmo com repetições ou explicações		
			Pode necessitar de indicações precisas para compreender conceitos		
Julgamento social e interações	Julgamento social bem mantido	Mantém julgamento social	Pode apresentar lapsos ocasionais no julgamento social		
	Interação social bem mantida	Mantém interações sociais	Menos envolvido com membros da família e amigos		
		Levemente mais passivo, mostra menos iniciativa	Aumento da passividade e pode mostrar menos iniciativa		
Compreensão de estudo	Sabe propósito de estudo (pode necessitar um pouco de ajuda)	Compreensão vaga do estudo, não melhora muito com ajuda	Dá errada razão; desconhece como interessou-se pelo estudo, pode oferecer informação tangencial		

DANO	NENHUM 0	QUESTIONÁVEL 0,5	LEVE 1	MODERADO 2	GRAVE 3
Abstração Verbal (Semelhanças e diferenças)	Habilidade de abstração verbal mantida	1 ou 2 erros (não constantes com a função pré-mórbida)	Menos de 1 ou 2 erros (não constantes com a função pré-mórbida)		
	Não há necessidade de "dicas"	Capaz de dar melhores respostas com auxílio de "dicas"	Erros não corrigidos com as "dicas"		
Cálculos	Se o cálculo falha, é julgado consistente com a função pré-mórbida (auto-correção e erros)	Podem cometer erros de cálculos que não são constantes com o nível pré-mórbido	Frequentemente comete erros de cálculos que não são constantes com o nível pré-mórbido		
	Não há necessidade de correção	Podem se auto corrigir em erros de cálculos	Incapaz de corrigir-se e pode não ter certeza de erros cometidos		
Pergunta por amigos em cidade estranha	Resposta correta (auto correção se ocorrer erro)	Alguma dificuldade em encontrar resposta correta	Dificuldade clara em encontrar respostas corretas		
	Não há necessidade de "dicas"	Podem necessitar de "dicas"	"Dicas" não ajudam melhorar a resposta		

DANO	NENHUM 0	QUESTICIONAVEL C 5	LEVE 1	MODERADO 2	GRAVE 3
Relações comunitárias critério original	Função independente em nível comum no trabalho, nas compras e grupos sociais e voluntários	Leve dano no trabalho, nas compras e em grupos sociais e voluntários	Incapaz de funcionar independentemente nessa atividades, embora possa estar ainda engajado em alguma parece normal a um inspeção casual	Sem pretensão de função independente fora de casa; parece bem o bastante para ser levado a funções fora da casa da família de casa	Sem pretensão de função independente fora de casa Parece muito doente para ser levado a funções fora de casa
Relações comunitárias (critério expandido)					
Serviço	Funciona independentemente no trabalho	Tem ocasional dificuldade em desenvolver tarefas no trabalho por causa da memória ou pensamento	Dificuldade constante em desenvolver tarefas	Não pode desenvolver tarefas fora de casa	
		Aumento de necessidade de ajuda para completar as tarefas	Necessita de auxílio para completar as tarefas ou as deixará incompletas		
		Pode diminuir as responsabilidades ou assumir menos coisas para fazer	Aposenta-se devido a dificuldade no trabalho, por causa da memória e pensamento		
		Outros no trabalho podem perceber as dificuldades do sujeito em desenvolver as tarefas	A dificuldade em desenvolver o trabalho é cada vez mais perceptível aos outros		
		(Se aposentado) Freqüentes dificuldades de memória acarretaria problemas no serviço	(Se aposentado) Freqüentes dificuldades de memória produziam muitos problemas no trabalho		
Nas compras	Pode confiar em listas para as compras, mas não se esquece continuamente de itens ou com frequência deixa a lista em casa	Constantemente necessita de uma lista de compras e isto é uma mudança	Deve usar uma lista de compras e isto é uma mudança	Já não vai às compras sozinho	
		Mesmo com a lista, pode se esquecer de itens	Mesmo com a lista, constantemente se esquece de itens necessários, compra itens desnecessários		
		Pode deixar a lista em casa ou guardá-la em local impróprio	Freqüentemente deixa a lista em casa ou a guarda em local impróprio		
			Crescente dependência em outros para ajuda nas compras por causa da dificuldade de lembrar-se de itens e de onde encontrá-los		

DANO	NENHUM 0	QUESTIONAVEL 0,5	LEVE 1	MODERADO 2	GRAVE 3
	Tão ativo em atividades sociais quanto antes	Suave decréscimo na participação em atividades sociais	Significativo decréscimo na participação em atividades sociais	Nenhuma atividade social independente	
		Crescente dificuldade em lidar com atividades sociais (ex.: agenda)	Notável dificuldade em lidar com responsabilidades envolvendo atividades sociais		
Atividades Sociais			Passos tomados para diminuir responsabilidades e ou envolvimento		
			Declínio notado por aqueles que são mais próximos		
			É mais passivamente envolvido		

DANO	NENHUM - 0	QUESTIONAVEL - 0.5	LEVE - 1	MODERADO - 2	3
Lar e hobbies Critério original	Vida em casa, hobbies, interesses intelectuais bem mantidos	Vida em casa, hobbies, interesses intelectuais, levemente danificado	Dano suave, porém definitivo nas funções domésticas; tarefas mais difíceis abandonadas; hobbies mais complicados e interesses abandonados	Apenas tarefas simples são preservadas, interesses muito restritos, manidos com dificuldade	
Lar e Hobbies - critério expandido					
Lar	Sem mudança nas tarefas de casa, como com aparelhos de trabalho	Problemas ocasionais trabalhando em tarefas domésticas	Constantes mudanças na habilidade de cumprir tarefas domésticas		
		Pode ter dificuldade em aprender a utilizar novos aparelhos, mas geralmente acaba tendo sucesso	Incapaz de aprender a usar aparelhos novos		
			Pode ter dificuldade em usar aparelhos velhos		
			Parou de utilizar alguns aparelhos		
Cozinhar	Sem mudanças na cozinha	Pode super cozinhar o alimento mas o sabor, geralmente é tão bom quanto antes	A comida não é tão saborosa quanto antes		
		Confia mais em receitas escritas	Tem de usar receitas escritas para fazer comidas simples		
		Pode esquecer-se de ingredientes	Frequentemente se esquece de ingredientes		
			Cozinha menos, tende a comprar comida pronta		

DANO	NENHUM - 0	QUESTIONÁVEL - 0.5	LEVE - 1	MODERADO - 2	- 3
Consertos	Nenhuma mudança na atividade de consertar coisas	Leva mais tempo para consertar coisas	Frequentemente não completa projetos de consertar coisas		
		Toma projetos menos complexos ou tende a recusar projetos complexos	Desistiu de consertar coisas		
O uso do fogão e o forno		Crescente dependência de outros para orientá-lo nos consertos	Precisa de outros para ler as coisas consertadas		
	Podem deixar a chaleira no fogo mas é parte de um velho hábito	Podem esquecer de ligar as coisas do forno ou de desligar o forno	Frequentemente esquece de ligar as coisas do forno ou de desligá-lo		
		Recentemente desenvolveu estratégias para prevenir que panelas queimem no forno ou fogão (ex.: uso de timer, não cozinhar enquanto ao telefone, o uso de micro ondas, cozinhar menos)	Apesar das estratégias, geralmente se esquece comida no forno ou fogão		
			Significativas consequências repetidas por causa de esquecimento de coisas no forno ou fogão ex.: panelas queimadas, alarme de incêndio disparado		
			Significativa restrição em cozinhar secundária aos fatos acima		

Hobbies	Nenhuma mudança nos hobbies atribuídas à memória ou pensamento	Decrescente envolvimento com hobbies	Hobbies mais complexos abandonados ou menos frequentemente feitos	
Artesanato	Tem mais dificuldade do que a que seria esperada em aprender um novo hobby Ocasionalmente fica confuso com padrões se tricotando ou costurando	Não consegue aprender novos hobbies Maior dificuldade em seguir padrões interfere no cumprimento da tarefa artesanal Artesanato não sai mais bem feito		
Jogos	Ocasional dificuldade em participar de jogos ou esportes que envolvam calcular gols ou pontos, seguir regras, ou usar estratégias (ex.: bridge, golf, ou natação) Ocasional dificuldade em participar de jogos que envolvam lembrar-se de palavras ou informações (ex.: caça palavras, palavras cruzadas)	Aumento de dificuldade em participar de jogos ou esportes Crescente dificuldade em participar de jogos que envolvam lembrar-se de palavras ou informações		
Leitura	Crescente necessidade de rere ler coisas para mantê-las na mente	Continua a ler, mas não consegue falar sobre o que leu Decrescente leitura devido a dificuldade em lembrar-se		
TV / Cinema	Confusão ocasional em seguir tramas de peças ou filmes	Dificuldade em seguir tramas de peças ou filmes		

DANO	NENHUM - 0	QUESTIONAVEL - 0.5	LEVE - 1	MODERADO - 2	- 3
Cuidado pessoal (critério original)	Completamente capaz de se cuidar	Completamente capaz de cuidar de si	Necessita de alguma ajuda	Necessita de ajuda para vestir - se, higiene e outros cuidados pessoais	Necessita muita ajuda com cuidados pessoais, frequentemente incontinente

Expansão de critério

Vestir-se	Completamente capaz a menos que tenha problemas físicos	Completamente capaz de cuidar-se a menos que haja alguma mudança atribuída a problemas físicos	Ocasional dificuldade em vestir-se ex.: roupa abotoada errada	Frequente dificuldade em vestir-se	
			Podem usar muitas vezes a mesma roupa pode precisar de lembretes para trocar-se	Frequentemente necessita de ajuda para lembrar de se trocar	
			Ocasionalmente veste-se inadequadamente (ex.: roupa de inverno no verão, roupas mal combinadas)	Necessita de ajuda para escolher roupa apropriada	
Lavar - se e Arrumar - se	Nenhuma mudança na habilidade de lavar-se ou arrumar-se, a menos que haja problemas físicos	Nenhuma mudança na habilidade de lavar-se ou arrumar-se, a menos que haja problemas físicos	Ocasionalmente necessita de ajuda para banhar-se, barbear-se, pentear os cabelos ou escovar os dentes	Frequentemente necessita de ajuda para lavar-se e arrumar-se (ex.: esquece-se de banhar-se ou coloca as roupas em ordem errada)	
	Nenhuma mudança no hábito de comer, exceto se por problemas físicos	Nenhuma mudança no hábito de comer, exceto se por problemas físicos	Faz sujeira quando come; aumenta as ocorrências de derrubar comida e espirrar líquidos	Ocasional uso incorreto de talheres	
Comer	Completamente capaz de controlar esfínteres, exceto por problemas físicos	Completamente capaz de controlar esfínteres, exceto por problemas físicos	Ocasionalmente se esquece se comeu ou não	Frequentemente precisa ser lembrado de que comeu	
	Ocasionalmente = aprox. 1x/mês Frequentemente = +/- semanal			Ocasional incontinência urinária (não consegue calcular tempo)	