

ISIS AMARAL ZAINAGHI

Fosfolipase A₂, fluidez de membrana e proteína precursora do amilóide em plaquetas na Doença de Alzheimer e Comprometimento Cognitivo Leve

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Área de concentração: Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. Wagner Farid Gattaz

São Paulo

2006

Este trabalho é dedicado a Gerson Zainaghi (*in memoriam*), meu querido pai; a Dona Mariazinha, minha mãe e ao meu marido Ademar Arvati Filho por todo amor e presenças constantes em minha vida.

Agradecimentos

Ao Prof. Gattaz, por seus ensinamentos, e pela oportunidade de trabalhar no laboratório LIM- 27 sob sua orientação.

Ao Dr. Orestes Vicente Forlenza pelos grupos de discussões e pela colaboração da confecção do artigo.

A minha amiga e colega de trabalho Leda Leme Talib por toda sua ajuda com a etapa analítica e por sua amizade incondicional.

Ao Dr. Breno Satler de Oliveira Diniz por sua atenção e colaboração com o banco de dados do grupo.

A Dra. Evelin L. Schaeffer, por seu interesse em meu trabalho e por todas nossas discussões científicas.

As alunas de Iniciação Científica Carolina Akkari Torres e Vanessa Rodrigues de Paula por toda colaboração e participação em meu trabalho.

A Gisele Cristina Madeira, pela amizade e pelo trabalho de convocar os pacientes para as coletas de sangue sempre que necessário.

Aos amigos Luciana de Souza Jardim e Pedro E. M. Guimarães pela amizade e por todas as discussões científicas.

A Zelinda Garcia por sua amizade e eficiência como secretária.

Aos amigos do LIM- 27, Nádia R. Barbosa, Elida B. Ojopi, Fabio Mury, Elisa H. Ikenaga, Amanda F. Frade, Camila Teixeira, Sheila P. Gregório, Carolina Almeida, Alaione Lima, Heloísa Muller, Karisa Belotto e Patrícia por toda colaboração.

A Sandra Cardoso, Edivani P. da Silva e a Girlene L. Sena por todo apoio e colaboração durante toda minha permanência no laboratório.

Ao grupo de médicos e neuropsicólogos coordenados pelo Dr. Orestes pelo diagnóstico dos pacientes envolvidos no estudo e por toda boa vontade em esclarecer dúvidas.

A Eliza Fukushima, secretária da pós- graduação da Psiquiatria por toda sua atenção.

Aos meus familiares, irmãos e amigos por compreenderem minha ausência em vários momentos em virtude da minha dedicação à pesquisa.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo financiamento do projeto Temático “Metabolismo dos Fosfolípidos nas Doenças Neuropsiquiátricas”, no qual este trabalho está inserido.

(...) Desejo que você, sendo jovem, não amadureça depressa demais,
E que sendo maduro, não insista em rejuvenescer. E que sendo velho,
não se dedique ao desespero. Porque cada idade tem o seu prazer e a
sua dor e é preciso deixar que eles escorram por entre nós.

(...) Desejo também que você plante uma semente, por mais minúscula
que seja, e acompanhe o seu crescimento, para que você saiba de
quantas muitas vidas é feita uma árvore.

(...) Desejo também que nenhum de seus afetos morra, por ele e por
você. Mas que se morrer, você possa chorar sem se lamentar e sofrer
sem se culpar.

(...) Desejo por fim que você sendo homem tenha uma boa mulher,
E que sendo mulher, tenha um bom homem
E que se amem hoje, amanhã e nos dias seguintes,
E quando estiverem exaustos e sorridentes,
Ainda haja amor para recomeçar...

Trecho extraído do poema *Desejo*, de Victor Hugo

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro de Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aspectos gerais.....	1
1.1.1 Doença de Alzheimer e Comprometimento Cognitivo Leve.....	4
1.1.2 Fatores de Risco.....	7
1.2 Alterações histopatológicas da Doença de Alzheimer.....	8
1.3 Proteína Precursora do Amilóide – APP.....	13
1.3.1 Metabolismo da Proteína Precursora do Amilóide.....	16
1.4 Fluidez de membrana.....	23
1.5 Doença de Alzheimer e atividade da PLA ₂	25
1.6 Uso de plaquetas como modelo periférico de neurônios.....	28
2 OBJETIVOS.....	31
3 MÉTODOS.....	32
3.1 Casuística.....	32
3.2 Métodos.....	34
3.2.1 Obtenção e preparo das plaquetas.....	34
3.2.2 Western Blot para análise da Proteína Precursora do Amilóide em plaquetas.....	37
3.2.3 Determinação da fluidez de membrana total em plaquetas.....	40
3.2.4 Método radioenzimático para a determinação da atividade da PLA ₂ em plaquetas.....	42
3.2.5 Determinação da quantidade de proteína das amostras.....	44
3.2.6 Análise estatística.....	45
3.2.7 Lista de reagentes e soluções.....	46
4 RESULTADOS.....	48
4.1 Coleta e descrição das amostras.....	48
4.2 Western Blot da Proteína Precursora do Amilóide em plaquetas.....	50
4.3 Medida da fluidez de membrana total em plaquetas.....	54
4.4 Medida da atividade da enzima PLA ₂ em plaquetas.....	56
4.5 Correlações entre APP, fluidez de membrana e PLA ₂	59
4.6 Correlações da APP e iPLA ₂ com parâmetros cognitivos.....	60
5 DISCUSSÃO.....	62
6 CONCLUSÃO.....	78
7 ANEXOS.....	79
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
Apêndice	

RESUMO

Zainaghi, IA. *Fosfolipase A2, fluidez de membrana e proteína precursora do amilóide em plaquetas na Doença de Alzheimer e Comprometimento Cognitivo Leve* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 102p.

A Doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa progressiva que causa comprometimento cognitivo em idosos. O diagnóstico clínico da DA é complexo. Existe uma grande necessidade de técnicas capazes de detectar a doença nos estágios iniciais, tanto para auxiliar o diagnóstico quanto para monitorar a efetividade dos tratamentos disponíveis. As alterações bioquímicas da DA são resultado de processos celulares como o metabolismo da proteína precursora do amilóide (APP), fosforilação da *tau*, stress oxidativo, inflamação e desregulação lipídica. Até o momento não existem marcadores bioquímicos para auxiliar o diagnóstico da DA. Este trabalho avaliou três possíveis candidatos a marcadores bioquímicos para a DA. Foram investigados a razão da APP (rAPP) de 130/110 kDa, fluidez de membrana e atividade da fosfolipase A₂ em plaquetas de pacientes com DA e Comprometimento Cognitivo Leve (CCL), comparando-se seus resultados com controles idosos saudáveis. A fluidez das membranas das plaquetas foi avaliada por meio da anisotropia com a sonda fluorescente DPH (Difenilhexatrieno); a comparação das razões da APP foi realizada por Western Blotting empregando o anticorpo 22C11 e a da atividade da PLA₂ foi determinada por ensaio radioenzimático com substratos e concentrações de cálcio específicas para cada um dos três principais grupos da enzima. A rAPP, as atividades da sPLA₂ e iPLA₂ estavam significativamente reduzidas na DA quando comparadas com controles, enquanto que a cPLA₂ e a fluidez de membrana não apresentaram diferenças entre os grupos. A rAPP e a iPLA₂ também apresentaram diferenças significativas entre CCL e DA, além de estarem correlacionadas com os parâmetros cognitivos MEEM e CAMCOG. A rAPP também estava correlacionada com a anisotropia do DPH.

Descritores: 1.Doença de Alzheimer 2.Transtornos Cognitivos 3.Plaquetas 4.Proteína do amilóide 5. Fluidez de membrana 6.Fosfolipases A 7.Marcadores biológicos 8.Idoso

SUMMARY

Zainaghi, IA. *Phospholipase A₂, membrane fluidity and amyloid precursor protein in platelets in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 102p.

Alzheimer disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder that causes cognitive impairment in the elderly. The clinical diagnosis of AD is complex. Thus, there is a great need for sensitive techniques to detect neurodegeneration in the early stages to assist in the diagnosis and to follow the effectiveness of therapy. The biochemical alterations in the AD brain result from cellular processes such as amyloid precursor protein (APP) metabolism, *tau* phosphorylation, oxidative stress, inflammation and lipid dysregulation. So far there are no biochemical markers to help the AD diagnosis. The purpose of this study was to evaluate three possible candidates to biochemical marker of AD. The APP 130/110 kDa ratio, membrane fluidity and phospholipase A₂ activity in platelets of patients with AD and mild cognitive impairment (MCI) were investigated compared to their results with healthy elderly controls. The membrane fluidity of platelets was assessed by the fluorescence anisotropy of DPH (diphenyl-hexatriene); the levels of APP isoforms were evaluated by Western Blot analysis using 22C11 antibody and the PLA₂ activity was measured by radio-enzymatic assay with enzyme specific substrate and calcium concentrations for each one of the three main groups of the enzyme. The APP ratio (APP_r), the sPLA₂ and iPLA₂ activity were markedly decreased in AD in comparing with controls, whereas a cPLA₂ and membrane fluidity didn't show any alteration between the groups evaluated. The APP_r and iPLA₂ also showed significant differences between MCI e AD, and were correlated with cognitive parameters MMSE and CAMCOG. The APP_r was also correlated with DPH anisotropy.

Descriptors: 1.Alzheimer Disease 2.Cognitive disorders 3.Platelets 4.Amyloid beta protein 5.Membrane fluidity 6.Phospholipases A 7.Biological markers 8.Aged

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa progressiva que causa comprometimento cognitivo e demência, sobretudo em idosos. É a causa mais comum de demência, correspondendo a aproximadamente 50 – 60 % dos casos de demência em pessoas com mais de 65 anos (Francis et al., 1999). A prevalência da DA aumenta com a idade, afetando de 1 a 3% da população americana entre 60 e 70 anos, 3 a 12% das pessoas entre 70 e 80 anos, e de 25 a 35% dos idosos acima de 85 anos (Walsh e Selkoe, 2004). Na população brasileira a prevalência da DA é semelhante, afetando 1,6% dos indivíduos entre 65 e 69 anos, 7,9% entre 75 e 80 anos e 38,9% de indivíduos com mais de 85 anos (Herrera et al., 2002).

A duração média da DA é difícil de precisar, pois o início insidioso, com queixas de perda de memória ou apatia, pode se confundir com outras condições como depressão, perda de memória associada ao envelhecimento, ou ainda estes sintomas podem passar despercebidos pelos pacientes ou familiares. De qualquer forma, é possível encontrar pacientes com duração de doença entre um ano e meio a 15 anos (Brucki, 2000). Os custos para a saúde pública com tratamentos para DA são altos, equivalentes aos custos com o tratamento da diabetes mellitus. Já os custos psicológicos e emocionais para os familiares e cuidadores são mais difíceis

de serem mensurados e não menos importantes (Francis et al., 1999; Standridge, 2004).

Os tratamentos da DA são considerados bem sucedidos se forem capazes de estabilizar ou retardar a progressão dos sintomas da doença. Atualmente nenhum tratamento curativo está disponível. O diagnóstico clínico da DA é mais simples quando a doença já está estabelecida, mas em estágios iniciais pode ser bem complicado, e algumas terapias que seriam benéficas nos estágios iniciais da doença, podem não ser em estágios mais avançados. Portanto, existe uma grande necessidade de técnicas capazes de detectar a doença nos estágios iniciais, não apenas para auxiliar o diagnóstico, mas também para monitorar a efetividade dos tratamentos disponíveis. Neste sentido, muitos pesquisadores estão empenhados em desenvolver técnicas neuropsicológicas, de neuroimagens e testes bioquímicos que possam funcionar como marcadores capazes de auxiliarem o diagnóstico e monitorar a evolução da DA (Diaz-Arrastia, 2001).

Atualmente o diagnóstico da Doença de Alzheimer é baseado, na maioria dos casos, no DSM – IV, Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais – 4ª edição (American Psychiatric Association, 1994). A comprovação do diagnóstico de demência depende de avaliação objetiva das funções cognitivas e um dos testes de avaliação global mais empregado é o Mini Exame do Estado Mental (MEEM) de Folstein et al. (1975). O MEEM permite avaliar a orientação espacial e temporal, memória de fixação, atenção e cálculo, linguagem, praxias e habilidades construtivas. A limitação do MEEM é a influência da escolaridade. Desta forma, dependendo do nível

de escolaridade do paciente, pontos de cortes específicos devem ser utilizados. A associação de outros testes ao MEEM, como testes de memória e fluência verbal aumentam a sensibilidade do diagnóstico. A investigação complementar da demência inclui exames de sangue, exames de neuroimagem e em algumas situações especiais podem ser realizados exames no líquido e eletroencefalograma (Caramelli e Nitrini, 1997).

Para auxiliar o diagnóstico da DA em estágios iniciais, uma ferramenta diagnóstica deve ser sensível para detectar precocemente alterações cognitivas e biológicas, e deve ser capaz de diferenciar DA do envelhecimento normal, de distúrbios afetivos, de pseudo-demências e também de outras demências como a Demência Vascular, Demência com corpúsculos de Lewy, entre outras. Esta ferramenta deve ser confiável, simples e facilmente aplicável (Di Lucca et al., 2005).

As alterações bioquímicas e patológicas da DA são resultado de processos celulares como o metabolismo da proteína precursora do amiloide, fosforilação da *tau*, stress oxidativo, inflamação e desregulação lipídica. Os marcadores bioquímicos da DA pretendem detectar estas alterações em fluidos biológicos. Apesar de muitas pesquisas na busca de um marcador da DA, até o presente não existem marcadores bioquímicos capazes de auxiliar o diagnóstico da DA na prática clínica (Irizarry, 2004; Padovani et al., 2001a). O líquido reflete com bastante precisão a composição dos fluidos extracelulares cerebrais, sendo uma possível fonte para a pesquisa de marcadores bioquímicos da DA. Pacientes com DA leve mostram elevados níveis de proteína *tau* e reduzidos níveis do peptídeo β -

amilóide em líquido, quando comparado com controles. Desta maneira, a proteína *tau* e o peptídeo β -amilóide são propostos como prováveis marcadores bioquímicos para a DA (Hampel et al., 2004). As análises da proteína *tau* fosforilada, da *tau* total e do peptídeo β -amilóide em líquido são considerados marcadores de risco para o desenvolvimento da DA em pacientes com comprometimento cognitivo leve (Hansson et al., 2006). Contudo a obtenção do líquido envolve punção lombar, um procedimento delicado que não faz parte dos procedimentos de cuidados primários, tanto na clínica psiquiátrica quanto na geriátrica. Desta maneira, encontrar marcadores bioquímicos para a DA no sangue tem sido o desafio de vários pesquisadores, pois a obtenção de amostras de sangue é uma técnica rápida, barata e pouco invasiva (Irizarry, 2004).

Nos últimos anos, vários grupos de pesquisa têm medido os níveis de algumas proteínas relacionadas a DA em plaquetas, como por exemplo, proteína precursora do amilóide (APP), alfa secretase e beta secretase, pois as plaquetas contêm várias das mesmas enzimas encontradas em neurônios, que são responsáveis pelo processamento da APP (Di Lucca et al., 2005).

1.1.1 Doença de Alzheimer e Comprometimento Cognitivo Leve

Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) define um estágio transitório entre o envelhecimento normal e a demência, e reflete uma situação clínica

onde o indivíduo apresenta queixas de memória e evidências de problemas cognitivos, mas sem evidências de demência. O reconhecimento do CCL é importante na identificação de pessoas com elevado risco de desenvolver demência, que poderiam se beneficiar de estratégias preventivas (Burns e Zaudig, 2002). Contudo a noção de "um estágio transitório entre o envelhecimento normal e a DA" é difícil de ser estabelecida. Isto porque a DA é caracterizada por uma progressiva disfunção neuronal e os déficits cognitivos resultantes desta disfunção ocorrem continuamente, começando leve e sutilmente até condições graves, com a doença avançada. Baseado nesta condição intermediária entre o normal e a demência, os indivíduos portadores de CCL vem sendo alvo de pesquisas clínicas de fármacos para o tratamento da DA, para avaliar se a conversão para a DA pode ser prevenida ou atrasada (Morris, 2006).

CCL é uma condição heterogênea, onde com o passar do tempo, nem todos convertem para DA; uma significativa porção reverte para "normal" e outros desenvolvem condições relacionadas à DA, mas não DA. Embora a perda de memória seja, por definição, essencial aos critérios de "demência", aparentemente não é para CCL, visto a crescente tendência em se distinguir CCL amnésico e não-amnésico (Royall, 2006). O termo CCL amnésico (CCLa) foi introduzido para classificar pessoas que apresentam problemas de memória, mas não preenchem os critérios convencionais de demência. CCLa é um fator de risco para DA, com vários estudos indicando uma conversão anual de CCLa para DA de 10% (Lehrner et al., 2005).

Apesar de muitos artigos científicos mostrarem uma alta taxa de exatidão no diagnóstico (de 80 a 90%), estes estudos são realizados em centros de pesquisa especializados e na maioria das vezes com pacientes em estágios mais avançados da doença. A taxa de exatidão no diagnóstico diminui quando são considerados hospitais gerais e em casos de estágios muito precoces da doença (Andreasen e Blennow, 2002). A dependência demasiada dos testes cognitivos e a subutilização dos conhecimentos dos informantes podem levar a uma falha na diferenciação entre DA leve, CCL e até mesmo do envelhecimento normal (Morris et al., 2001). Em recente trabalho, Markesbery et al. (2006), mostraram algumas semelhanças neuropatológicas entre tecidos cerebrais *post-mortem* de pacientes com CCL e DA em comparação com tecidos de idosos normais, sugerindo que os pacientes diagnosticados como CCLa (*pre-mortem*) eram na verdade DA inicial. A principal semelhança foi quanto às placas neuríticas neocorticais, que estavam acentuadamente elevadas em CCL e DA quando comparadas com controles (Markesbery et al., 2006).

Assim, torna-se evidente a necessidade de se aprimorar cada vez mais o diagnóstico da DA e do CCL e, este estudo teve a finalidade de investigar algumas alterações bioquímicas em plaquetas destes pacientes, compará-las com os resultados obtidos de controles idosos e avaliar sua contribuição para auxiliar o diagnóstico.

1.1.2 Fatores de risco da DA

A prevalência da DA aumenta consideravelmente com o avanço da idade, desta maneira, o envelhecimento é o fator de risco mais importante. Homens e mulheres são igualmente afetados, mas como as mulheres vivem em média mais que os homens, o número de mulheres acometidas pela DA é maior que o número de homens. A DA também não distingue etnia e classe socioeconômica. Fatores ambientais são difíceis de serem identificados, mas existem evidências de que pessoas com alto nível de escolaridade estão menos susceptíveis a desenvolverem DA na velhice (Stern et al., 1994). Alguns fatores genéticos foram identificados e relacionados a casos de DA (Mohs e Haroutunian, 2002).

A DA pode ocorrer de duas formas: 1) Alzheimer de início precoce (pré-senil), antes dos 65 anos, que está associada com mutações genéticas específicas e é responsável por menos de 2 % do total de casos; 2) Alzheimer de início tardio (senil), acima de 65 anos, que representa a maioria dos casos (Raffai e Weisgraber, 2003). Além disto, a DA pode ser familiar ou esporádica. Mutações genéticas são responsáveis por casos agressivos de DA familiar pré-senil e os principais genes envolvidos neste tipo de DA são os genes da proteína precursora do amilóide (APP) presente no cromossomo 21, presenilina-1 e presenilina-2, presentes nos cromossomos 14 e 1, respectivamente. Nestes casos, mutações alteram o metabolismo da APP, resultando num aumento da formação do peptídeo β -amilóide (HELISALMI, 1998; Lovestone, 2000).

Quanto a DA senil esporádica, um dos principais fatores de risco é a presença do alelo $\epsilon 4$ da apolipoproteína E (Apo E), que é uma proteína transportadora de colesterol. Pessoas que possuem o alelo $\epsilon 4$ ao invés do alelo $\epsilon 3$ ou $\epsilon 2$, apresentam risco aumentado de desenvolverem DA entre os 65 e 75 anos (Selkoe, 2005). De um modo geral, apenas a idade, o histórico familiar e a presença do alelo $\epsilon 4$ da Apo E são fatores de risco confirmados para a DA. Contudo, a presença do alelo $\epsilon 4$ da Apo E, apesar de ser um fator de risco não é condição necessária e nem suficiente para o desenvolvimento da doença. Além disto, seu significado biológico no desenvolvimento da DA não é completamente conhecido, sendo necessário cuidados na interpretação dos resultados quanto à presença ou ausência do alelo $\epsilon 4$ da Apo E (Loveman et al., 2006; Vallada, 2000).

1.2 Alterações histopatológicas da Doença de Alzheimer

As principais regiões cerebrais afetadas na DA são córtex e hipocampo, regiões associadas a importantes funções cerebrais. Clinicamente, a DA é caracterizada por uma gradual perda de memória seguida por um progressivo declínio cognitivo e físico. A avaliação de tecido cerebral *post-mortem* de pacientes com a DA mostra alterações características. Estas alterações são basicamente: as placas senis, composta principalmente pelo peptídeo β -amilóide; os emaranhados

intracelulares de neurofibrilas, que são agregados da proteína *tau* hiperfosforilada (uma proteína do citoesqueleto celular); a perda de neurônios piramidais e degenerações sinápticas no hipocampo e neocórtex (Francis et al., 1999; Racchi e Govoni, 2003; Caramelli, 2000) (Figura 1).

Nos estágios finais da doença, o cérebro apresenta atrofia do hipocampo e córtex (sendo a atrofia mais proeminente nas regiões frontais, temporais e parietais, afetando principalmente as áreas corticais associativas), aumento dos ventrículos, alargamento dos sulcos e erosão dos giros (Walsh e Selkoe, 2004; Mohs e Haroutunian, 2002; Caramelli, 2000). A atrofia está relacionada com a perda neuronal, podendo ocorrer perda de 40 a 50% dos neurônios dos córtices frontais e temporais. A extensão da perda neuronal está relacionada com a progressão da gravidade e o tempo de duração da doença (Mohs e Haroutunian, 2002) (Figura 2).

A característica fisiopatológica mais importante da DA são as placas senis, cujo principal componente é o peptídeo β -amilóide (A β). O A β é um peptídeo altamente hidrofóbico de 39-43 aminoácidos formado a partir da proteína precursora do amilóide (APP), que se agrega formando oligômeros. Os oligômeros, por sua vez se agregam, formando fibras que se depositam no parênquima cerebral, dando origem às placas senis (Haass, 2004). O depósito do A β é acompanhado por neurites distróficas, microglias ativadas e astrócitos reativos. O A β presente nas placas senis é uma mistura de uma grande porção de fibrilas de amilóide insolúveis (placas neuríticas) e uma pequena porção de formas não-fibrilares do peptídeo (placas difusas). Existe

uma significativa correlação estatística entre a quantidade de placas neuríticas (medidas *post-mortem*) e o grau de comprometimento cognitivo (medido *pre-mortem*) (Selkoe, 2004). As placas senis formadas nas regiões corticais e límbicas parecem induzir disfunções sinápticas e dendríticas, além de ativar microglias e astrócitos, representando uma resposta inflamatória local. Estas alterações que no início são sutis e vão evoluindo em intensidade, são acompanhadas por alterações celulares e bioquímicas, como a formação de radicais livres, reações oxidativas, prejuízo na homeostase iônica e por último, morte neuronal (Selkoe, 2005).

Outra importante característica fisiopatológica encontrada no tecido cerebral de pacientes com DA são os emaranhados neurofibrilares intracelulares, que são compostos principalmente pela proteína *tau* hiperfosforilada. A proteína *tau*, em condições normais, é específica e exclusiva de neurônios. É tradicionalmente descrita como uma proteína associada aos microtúbulos celulares com a finalidade de estabilizá-los. Contudo, ela tem outras funções como a ativação da fosfolipase C, regulação da atividade motora dos microtúbulos e transmissão dos sinais de transdução para o citoesqueleto celular (Jenkins e Johnson, 1999). Os microtúbulos são componentes essenciais do citoesqueleto, pois são responsáveis pela manutenção do funcionamento e da estrutura neuronal. São também responsáveis pelo transporte axonal até as terminações sinápticas de organelas e vesículas. Foi demonstrado que a capacidade da *tau* se ligar e estabilizar os microtúbulos é drasticamente reduzida com a fosforilação (Jameson et al., 1980; Lindwall and Cole, 1984). No cérebro de

pacientes com doença de Alzheimer, a proteína *tau* hiperfosforilada se acumula intracelularmente na forma de filamentos helicoidais pareados em vez de se ligar aos microtúbulos, danificando assim sua estrutura. Os filamentos helicoidais pareados se agregam como emaranhados neurofibrilares (Jenkins e Johnson, 1999; Sanchez et al., 2001; Lovestone, 2000) (Figura 3).

No desenvolvimento da doença, os emaranhados neurofibrilares são inicialmente formados no córtex entorrinal, seguido pelo hipocampo, amígdala e então por outras regiões do córtex. A densidade dos emaranhados neurofibrilares aumenta em função da gravidade da doença (Mohs e Haroutunian, 2002). Apesar de serem uma importante característica da DA, os emaranhados neurofibrilares são encontrados em outras desordens neurodegenerativas além da DA. São encontrados, por exemplo, na demência frontotemporal, encefalites esclerosantes subagudas, Parkinson pós-encefálico e paralisia supra nuclear progressiva, sugerindo que estes emaranhados ocorrem em resposta a certas injúrias neuronais e no caso da DA, os emaranhados neurofibrilares podem ocorrer em resposta ao depósito do A β (Selkoe, 2004).

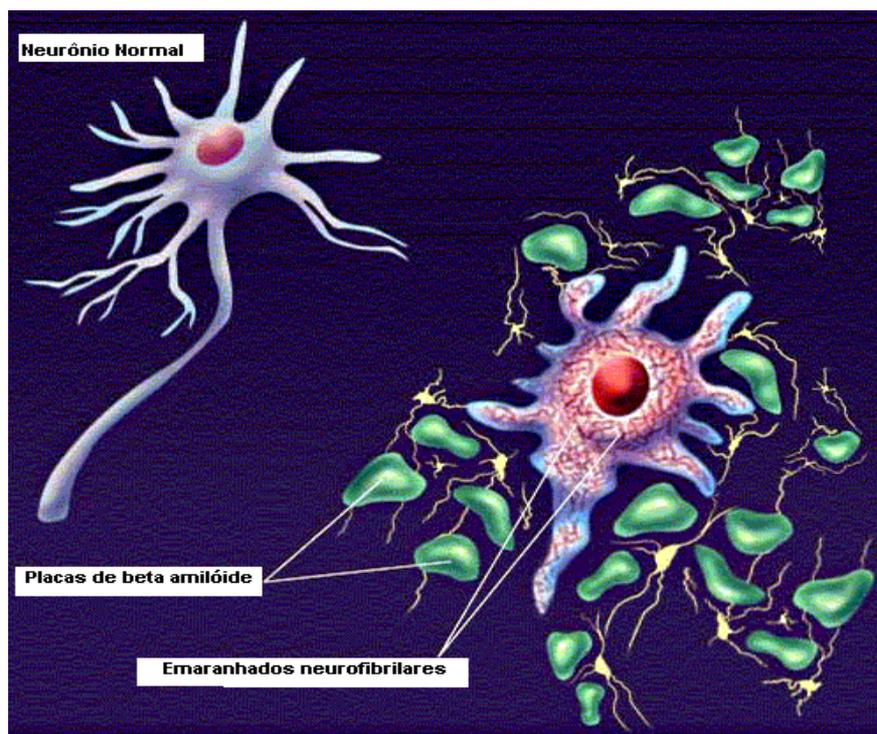


Figura 1: Ilustração de neurônio normal e neurônio na Doença de Alzheimer, com as placas senis (placas de beta amiloide) e os emaranhados de neurofibrilas.

Fonte: <http://merck.micromedex.com/images/bhg/BHG01NE09F01.gif>

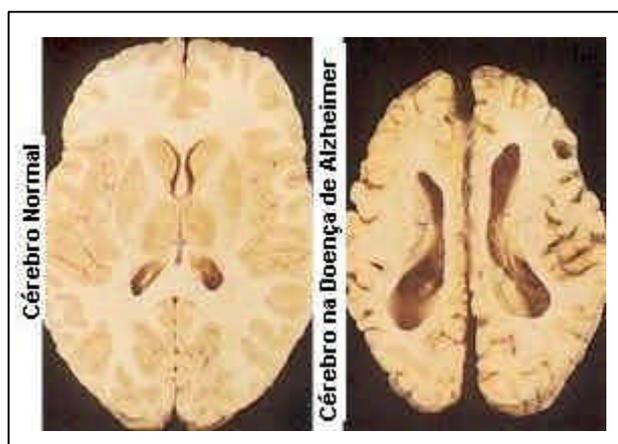


Figura 2. Comparação de cérebro normal e cérebro na DA, mostrando atrofia do tecido cerebral, aumento dos ventrículos, alargamento dos sulcos e erosão dos giros.

Fonte: <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh25-4/299-306.htm>

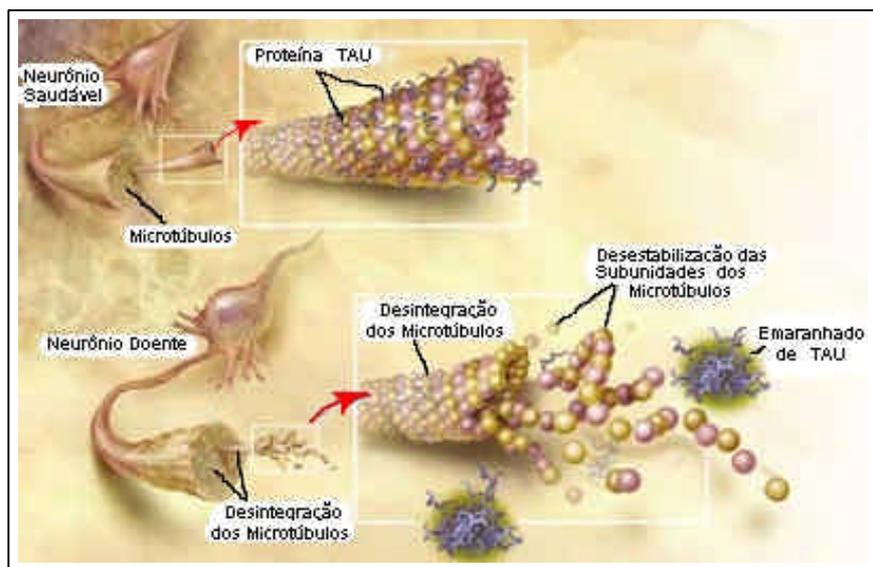


Figura 3. Ilustração da origem dos emaranhados de neurofibrilas, formados a partir da hiperfosforilação da proteína tau e desestabilização dos microtúbulos celulares. Fonte: http://wildiris2.securesites.net/cms_prod/files/course/94/AD_tangles.jpg

1.3 Proteína Precursora do Amilóide – APP

Proteína precursora do amilóide (APP) é uma proteína integral de membrana encontrada na superfície de muitos tipos celulares e é expressa principalmente como três isoformas *spliced* (APP₆₉₅, APP₇₅₁, APP₇₇₀), derivadas a partir de um único mRNA (Figura 4). É uma proteína transmembrana (tipo I) com uma grande porção N-terminal extracelular, uma única passagem através da membrana e uma pequena porção C-terminal intracelular (Daly IV et al., 1998). É uma das proteínas mais abundantes no sistema nervoso central e também é expressa em tecidos periféricos, como as células musculares, epiteliais e sanguíneas (Di Luca et al., 2000,

Skovronsky et al., 2001, Racchi e Govoni 2003). Entre as diferentes células periféricas que expressam APP, as plaquetas representam uma importante fonte, pois contêm mais de 95% da APP circulante. As plaquetas também apresentam concentrações das isoformas da APP equivalentes às encontradas no tecido cerebral, com exceção da isoforma 695, que é abundante no cérebro e praticamente indetectável em plaquetas, onde a mais abundante é a isoforma 770 (Padovani et al., 2001b).

Foi proposto por Li et al. (1998), que as plaquetas contêm toda maquinaria enzimática para produzir os subprodutos de clivagem da APP, a partir da ação das α e β -secretases e que tanto o fragmento solúvel da APP (APPs) quanto o peptídeo β -amilóide podem ser estocados nos α -grânulos e liberados com a ativação das plaquetas. Desta maneira, sob algum estímulo fisiológico, as plaquetas liberam o conteúdo de seus grânulos, secretando fragmentos de APP solúvel para o meio exterior e translocando algumas proteínas de membrana, como a APP intacta, para a membrana plasmática de modo que a face anteriormente interna agora fique voltada para o meio exterior (Davies et al., 1997).

Fisiologicamente, o processamento da APP na membrana celular ocorre através de uma clivagem proteolítica no meio da região β -amilóide, liberando a APP solúvel e evitando assim a formação do A β . Uma variedade de estímulos leva a secreção da APP solúvel, como por exemplo, fatores de crescimento, neurotransmissores (especialmente os muscarínicos), citocinas e proteína quinase ativa. Várias funções fisiológicas foram atribuídas a APP solúvel, entre elas estão atividade na adesão celular, propagação de

neuritos e potenciação de longa duração, entre outras. Contudo, ainda existem muitos questionamentos quanto a sua função primordial (Koo, 2002). Além disto, a APP solúvel contém o domínio KPI (Kunitiz Protease Inhibitor), que é altamente homólogo à protease Nextin II, e inibe a atividade de coagulação sanguínea dos fatores IXa, Xa e XIa. Também foi verificado que a APP solúvel inibe o fator XII da cascata de coagulação, além de prolongar o tempo de tromboplastina (Cattabeni, 2004).

Um distúrbio no processamento da APP pode resultar na liberação do A β , levando a formação das placas de amilóide (Haass e Selkoe, 1993; Skovronsky et al., 2001). Portanto, o processamento da APP pode levar ao produto amiloidogênico ou não e este processamento é mediado por pelo menos três enzimas proteolíticas: α , β e γ -secretases (Racchi e Govoni 2003).

As plaquetas contêm pequenas quantidades da APP intacta, com peso molecular entre 140 e 150 kDa e possui grandes quantidades da APP solúvel, carboxil-truncada com peso molecular entre 120 e 130 kDa, que são armazenadas nos α -grânulos e liberadas sob ativação das plaquetas. A APP solúvel presente nos α -grânulos corresponde às isoformas 770 e 751 onde está presente o domínio KPI (Bush e Tanzi, 1998; Rosenberg et al., 1997; Di Luca et al., 1998).

Rosenberg et al. (1997) encontraram uma razão entre APP de 120-130 kDa e 110 kDa reduzida em pacientes com DA, quando comparada com controles. Estes achados foram corroborados por Di Lucca et al. (1998),

despertando o interesse em se estudar a APP plaquetária como marcador periférico para a DA.

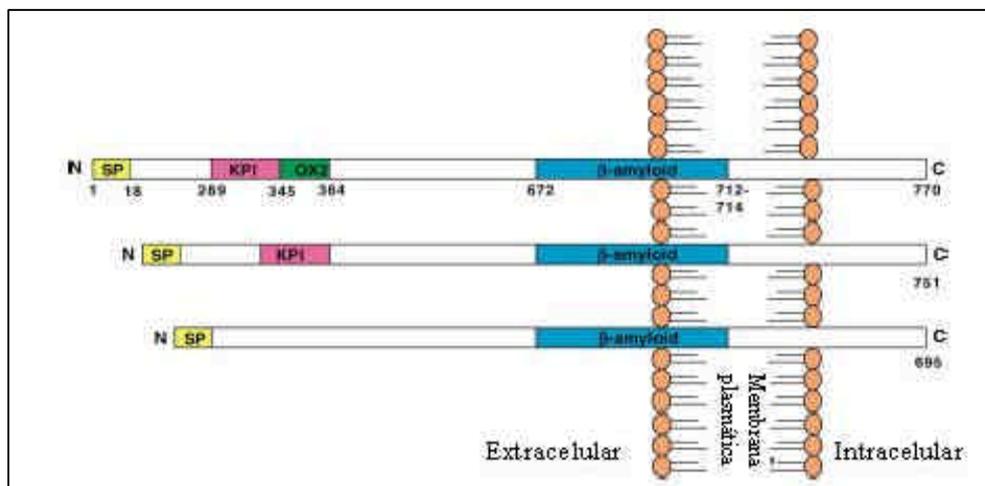


Figura 4. Esquema da APP e suas três principais isoformas. APP apresenta um extenso prolongamento extracelular amino-terminal, uma porção transmembrana e uma curta porção carboxi-terminal intracelular. Fonte: Andreasen e Blenow, 2002.

1.3.1 Metabolismo da proteína precursora do amilóide

Conforme citado anteriormente, o peptídeo β -amilóide é um resíduo hidrofóbico de 39-43 aminoácidos e é proteoliticamente derivado de uma proteína integral de membrana chamada proteína precursora do amilóide (APP), que está presente no cromossomo humano 21. Notavelmente, pacientes com a trissomia do 21 (Síndrome de Down), desenvolvem alterações neuropatológicas idênticas às de pacientes com a DA, diferindo apenas na idade precoce de início. Os achados de que uma cópia extra do cromossomo que contém o gene da APP acarretava alterações patológicas

típicas da DA, suportaram a hipótese de que o metabolismo da APP pode ter um papel crucial na patogênese da DA. Além disto, esta hipótese também foi fundamentada nos achados de Yankner et al. (1990), onde foi demonstrado que o peptídeo β -amilóide sintético produziu efeitos tóxicos em culturas de neurônios, e também na constatação de que mutações no gene da APP levavam a casos graves de DA (Haass e Selkoe, 1993).

O metabolismo da APP pode ser, resumidamente, de duas maneiras distintas (Figura 5). Na primeira, conhecida como via não-amiloidogênica, a clivagem da APP ocorre dentro do domínio A β (entre os resíduos Lys16 e Leu17) pela ação da α -secretase, liberando para a circulação uma fração N-terminal grande e solúvel, também chamada de α -sAPP. A seguir, a fração C-terminal (C83- α CTF) que permaneceu ligada à membrana, é clivada pela γ -secretase liberando um pequeno peptídeo chamado p3. Estudos recentes demonstraram que duas enzimas pertencentes à família ADAM (desintegrinas e metaloproteases) apresentam atividade de α -secretase: 1) enzima conversora do fator de necrose tumoral alfa, TACE, ou ADAM 17 (Buxbaum et al., 1998) e 2) ADAM 10 (Lammich et al., 1998). Os membros da família de proteases ADAM contêm um domínio auto-inibitório que é removido para tornar a protease ativa, um domínio do tipo desintegrina, um domínio rico em cisteína e o mais importante para ter a APP como substrato, que é possuir um domínio transmembrana (Buxbaum et al., 1998). Apesar da TACE humana e da ADAM 10 humana apresentarem apenas 21% de identidade na composição de aminoácidos, existem evidências de que seus

domínios catalíticos possuem propriedades estruturais comuns, podendo ambas agirem como α -secretase (Lammich et al., 1998).

Na via conhecida como amiloidogênica, a APP é clivada na porção amino terminal pela β -secretase (Asp1 e Glu11), liberando um fragmento grande de proteína solúvel chamado β -sAPP. Num segundo passo, o fragmento carboxi-terminal de 99 aminoácidos (β -CTF) que permaneceu ligado à membrana, é clivado pela γ -secretase, formando assim o peptídeo β -amilóide (Andreasen e Blennow, 2002; Di Luca et al., 2000). A etapa da clivagem pela α -secretase é dominante no processamento da APP, e uma vez ela ocorrendo dentro da região do A β , a formação do peptídeo β -amilóide é prevenida. Desde que α e β -secretases competem pela clivagem no substrato APP, a compreensão de como estas enzimas são reguladas é primordial para entender a geração do peptídeo β -amilóide (Ehehalt et al., 2003).

A β -secretase, conhecida como enzima de clivagem do sítio β da APP (BACE-1), é uma proteína transmembrana tipo 1 com atividade de protease do tipo aspartil (Haass, 2004). Foi identificada em 1999 e pertence à família de proteases pepsinas do grupo aspartil, mas vem sendo caracterizada como um novo subgrupo de hidrolases associadas à membrana. BACE-1 apresenta uma longa cadeia de 501 aminoácidos e é gerada como uma pré-proenzima composta por um peptídeo sinalizador (1–21 aminoácidos), um prodomínio (22–45 aminoácidos) e um domínio transmembrana único (461–477 aminoácidos). Após a remoção do peptídeo sinalizador, o prodomínio é clivado por uma protease do tipo furina e a

BACE é secretada para a membrana plasmática, posicionada dentro da região rica em colesterol e esfingolípides (*lipid rafts*) (Haass, 2004; Johnston et al., 2005). Pouco tempo depois da identificação da BACE-1, foi caracterizada uma proteína homóloga, a BACE-2. E apesar de serem homólogas, a BACE-2 cliva a APP de maneira semelhante a α -secretase, ou seja, prevenindo a formação do peptídeo β -amilóide. A não participação da BACE-2 na via amiloidogênica foi confirmada pelos resultados de animais *knockout* homozigotos para o gene da BACE-1, onde não houve nenhuma produção detectável do peptídeo β -amilóide (Haass, 2004; Johnston et al., 2005).

Uma vez na membrana celular, a BACE-1 assim como a APP, podem ser internalizadas em endossomas. Desta maneira, BACE e APP seguem rotas semelhantes e se encontram dentro de endossomas, que é provavelmente, o local preferencial de ação da BACE-1 devido à acidez seu pH (Haass, 2004).

A BACE-1 apresenta outros substratos pouco conhecidos, mas sabe-se que a APP não é o principal, pois a APP não proporciona um sítio de clivagem ideal para a BACE-1. Em DA do tipo familiar associada à mutação no gene da APP, a clivagem da APP pela BACE-1 é significativamente aumentada apenas por existir um sítio de clivagem ideal (Haass, 2004).

Depois que a BACE-1 realizou a primeira clivagem na APP pela via amiloidogênica gerando o fragmento solúvel β -sAPP e um fragmento de APP carboxi-terminal ligado à membrana (β -CTF, com 99 aminoácidos), este último passa a ser substrato para a γ -secretase. A γ -secretase realiza

uma clivagem incomum entre as proteases, pois cliva a porção da APP inserida na membrana celular, dentro do ambiente hidrofóbico da bicamada lipídica (Haass, 2004; Capell et al., 2005).

γ -Secretase é uma aspartil protease complexa composta por quatro componentes centrais: 1) PS-1 e PS-2 (presenilina-1 e presenilina-2); 2) Nct (nicastrina); 3) APH-1 (anterior pharynx-defective phenotype) e 4) PEN-2 (presenilina enhancer-2) (Figura 6). Aparentemente as duas presenilinas, PS1 e PS2, são de extrema importância para a atividade da γ -secretase. Isto ficou claro quando foram descobertos vários casos de DA familiar relacionados a mutações genéticas das presenilinas. Muitos pontos de mutações autossômicas dominantes das presenilinas foram identificados e relacionados com casos agressivos de DA de início precoce, onde pode ser observado um aumento da produção do peptídeo $A\beta_{42}$. Alguns autores têm sugerido que as presenilinas estejam diretamente relacionadas à atividade da γ -secretase ou ainda que sejam a própria γ -secretase, uma vez que animais *knockout* para o gene da presenilina 1 apresentam uma drástica redução na geração do peptídeo β -amilóide, e *knockouts* para os genes da presenilina1 e presenilina 2 não apresentam nenhuma geração de β -amilóide. A importância das presenilinas na atividade da γ -secretase também é evidenciada quando inibidores da γ -secretase se ligam diretamente às presenilinas, mostrando que provavelmente as presenilinas forneçam o sítio catalítico central para a atividade do tipo aspartil protease da γ -secretase (Wolfe e Haass, 2001; Haass, 2004).

Contudo, apesar de muito importantes, as presenilinas sozinhas não são suficientes para a atividade da γ -secretase, que requer cofatores adicionais para formar uma multiproteína complexa e de alto peso molecular. A purificação bioquímica da γ -secretase levou a identificação da nicastrina e um *screening* genético permitiu que fossem identificados APH-1 e PEN-2. Quando estes quatro componentes da γ -secretase humana são expressos juntos em *Saccharomyces cerevisiae*, um organismo que não apresenta nenhuma atividade do tipo da γ -secretase, a atividade da γ -secretase é reconstituída (Edbauer et al., 2003).

A localização celular da γ -secretase é alvo de muita discussão. Kaether et al. (2006), através de ensaio usando o marcador fluorescente *green fluorescent protein* (GFP) ligado ao fragmento carboxi-terminal β -CTF, substrato da γ -secretase, mostrou que a γ -secretase é proteoliticamente ativa na membrana plasmática e em endossomas, e que o retículo endoplasmático, complexo de Golgi e vesículas secretoras não são locais importantes na atividade catalítica.

Embora a composição e a função biológica da γ -secretase estejam cada vez mais claras, pouco se sabe sobre a função individual de cada componente. De maneira especulativa, acredita-se que APH-1 seja um estabilizador das presenilinas, enquanto a PEN-2 é requerida para o início da endoproteólise pelas presenilinas. A reunião dos quatro componentes se iniciaria com a nicastrina, que é estável no retículo endoplasmático, recrutando APH-1 e formando um pré-complexo Nct-APH-1. A seguir, as

presenilinas se ligariam ao pré-complexo formando uma composição trimérica e finalmente a PEN-2 se juntaria ao complexo, favorecendo a endoproteólise e proporcionando uma eventual ativação da atividade da γ -secretase (Haass, 2004).

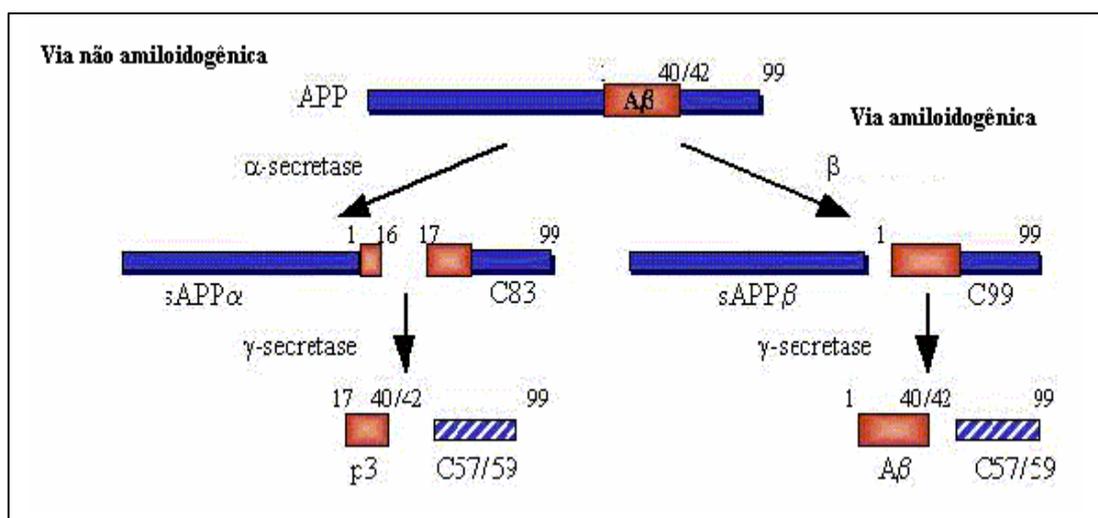


Figura 5. Esquema do processamento proteolítico da APP, evidenciando as via amiloidogênica e não-amiloidogênica.

Fonte: www.bioinformatics.leeds.ac.uk.

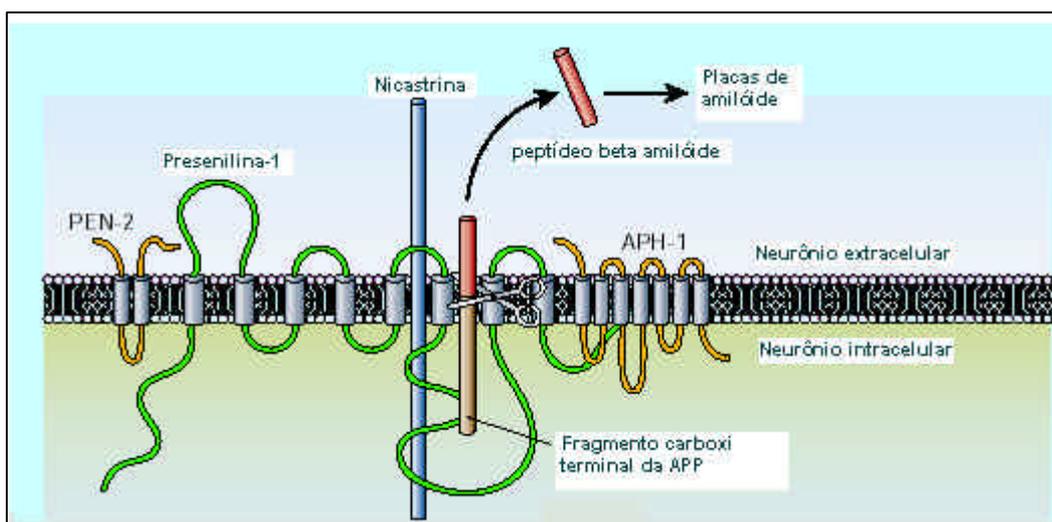


Figura 6. Ilustração da enzima γ -secretase clivando a APP e liberando o peptídeo β -amilóide. Fonte: De Strooper e Woodgett, 2003.

1.4 Fluidez de membrana

A observação de que A β tinha propriedades neurotóxicas, foi o primeiro indício de que havia correlação entre o A β e as lesões neuropatológicas específicas da DA. Com isto foi proposto que a fisiopatologia inicial na DA induzida pela A β , envolveria alterações na estrutura e função das membranas celulares (Müller et al., 1995; Wood et al., 2003).

Mudanças no estado físico-químico da membrana podem alterar consideravelmente a atividade de proteínas de membrana. Vários estudos avaliaram os efeitos do peptídeo β -amilóide na fluidez de membranas em modelos de membranas, em membranas de ratos, camundongos e humanos, propondo que os efeitos do A β na fluidez da membrana levam a interrupção de diferentes funções celulares, como a sinalização do cálcio, atividade enzimática e transporte de lípidos (Wood et al., 2003). A maioria destes estudos encontrou redução na fluidez das membranas celulares cerebrais o que pode ser explicado pelo aumento do colesterol em relação aos fosfolípidos das membranas cerebrais e pelo aumento da peroxidação lipídica que leva a uma maior concentração de ácidos graxos saturados (Müller et al., 1997a).

Na busca por marcadores ou fatores de risco específicos para a Doença de Alzheimer, Zubenko e colaboradores iniciaram estudos sobre a fluidez da membrana em plaquetas de pacientes com DA.

Os achados de Zubenko mostram um aumento da fluidez das membranas de plaquetas de pacientes com DA familiar de início precoce, e que as anormalidades nas membranas das plaquetas são herdadas como um traço autossômico dominante. Desta maneira, Zubenko propõe a medida da fluidez de membrana de plaquetas como um marcador genético da DA familiar (Zubenko et al., 1987b, Pettegrew, 1993).

As evidências disponíveis indicam que o aumento da fluidez da membrana em plaquetas está especificamente relacionado com a DA quando comparada com outras desordens mentais que levam a demência. Este fenótipo de membrana parece ser um traço familiar estável, transmitido verticalmente em familiares de pacientes com DA. Em nível celular, estudos ultra-estruturais, bioquímicos e biofísicos sugerem que o aumento da fluidez da membrana, em plaquetas, na DA seja devido a uma desregulação na biogênese ou remodelação da membrana, resultando no acúmulo de um compartimento de membrana interna semelhante ao retículo endoplasmático liso (REL) que se torna funcionalmente anormal (Zubenko et al., 1987a, b, Zubenko et al., 1999a, b).

O REL é uma organela importante na maturação e localização de proteínas celulares, além disto, no REL e complexo de Golgi estão armazenadas grandes concentrações de APP e presenilinas (Zubenko et al., 1999b). Mutações nos genes estruturais da presenilina aumentam o risco da DA, além de aumentar a produção do A β . Estas observações sugerem que o sítio de anormalidade da membrana interna associada com o aumento da fluidez da membrana em plaquetas, pode estar posicionado de modo a

alterar o processamento da APP, favorecendo a formação e secreção do produto amiloidogênico (Zubenko et al., 1999b).

De um modo geral, o termo fluidez de membrana é usado para descrever o movimento dos lípides nas membranas (Wood et al., 2003). Em relação às plaquetas, a fluidez da membrana interna é maior que a fluidez da membrana externa, desta maneira, o aumento na fluidez da membrana interna, que pode ser medido pela anisotropia do DPH, seria responsável pela fluidez de membrana aumentada encontrada em pacientes com a DA (Zubenko et al., 1987b). Assim, a sonda fluorescente DPH (1,6-difenil-1, 3,5-hexatrieno) é a mais indicada para avaliar a fluidez de membrana de plaquetas através da anisotropia, pois ela se insere na região mais profunda da membrana, região hidrofóbica rica em hidrocarbonetos (Zubenko et al., 1999b).

1.5 Doença de Alzheimer e a atividade da PLA₂

A função e a plasticidade do cérebro são profundamente influenciadas pelas propriedades físico-químicas da membrana neuronal. Esta membrana é formada por uma camada dupla de fosfolípides, que formam uma matriz na qual se inserem receptores, canais iônicos e outras proteínas envolvidas na transdução de sinais inter - e intracelulares. Assim, a estrutura da membrana determina sua fluidez, influencia o número e a afinidade dos receptores nela

ligados, e modula os processos de transdução de sinais. Adicionalmente, os próprios fosfolípidos servem também como substrato para a síntese de mediadores inter e intracelulares, aumentando sua relevância para a neurotransmissão (Farooqui et al., 1992, 1994, Fenton et al., 2000, Rapoport, 2001).

O metabolismo de fosfolípidos é controlado por enzimas ligadas à membrana e a fosfolipase A₂ (PLA₂) tem aqui uma função primordial. As PLA₂ pertencem a uma superfamília de enzimas que catalisam especificamente a hidrólise de ácidos graxos ligados à posição sn-2 dos fosfolípidos de membrana, liberando ácidos graxos livres e lisofosfolípidos. Segundo a localização celular, as PLA₂ podem ser classificadas em extracelulares (secretadas) e intracelulares. A maioria das classes de PLA₂ são de enzimas secretadas (sPLA₂) encontradas nos fluidos pancreáticos e inflamatórios. Estas enzimas requerem concentrações milimolares de Ca²⁺ para sua atividade, têm baixo peso molecular (12-18 kDa) e apresentam reduzida preferência ao ácido araquidônico na posição sn-2. Já as PLA₂ intracelulares, apresentam alto peso molecular (39-110 kDa) e podem ser Ca²⁺-dependente ou Ca²⁺-independente (cPLA₂ e iPLA₂ respectivamente). Sendo que a cPLA₂ apresenta grande preferência ao ácido araquidônico (Bazan et al., 1993, Piomelli 1993, Farooqui et al., 1999). Contudo, a iPLA₂, assim como a sPLA₂ não apresenta preferência ao ácido graxo da posição sn-2 do fosfolípido (Balsinde et al., 1999). O ácido araquidônico livre e o lisofosfolípido gerados pela PLA₂ são moduladores das funções neuronais, podendo funcionar como “segundos mensageiros” na modulação da fluidez

da membrana, organização e reorganização da bicamada lipídica, estabilidade e atividade de proteínas de membrana como canais iônicos, enzimas e receptores (Bazan et al., 2002). A partir do ácido araquidônico são produzidos mediadores inflamatórios como as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. Estes metabólitos também são chamados de eicosanóides, e diferem dos outros segundos mensageiros por serem capazes de atravessar a membrana celular, sair da célula onde foram gerados e agir em células vizinhas (Farooqui et al., 2000).

Assim, alterações na atividade da PLA₂ podem ser relevantes para o surgimento e para o curso de diferentes doenças neuropsiquiátricas. De fato, distúrbios da PLA₂ já foram descritos em pacientes com epilepsia do lobo temporal (Simonato, 1993), esquizofrenia (Gattaz et al., 1987; Gattaz et al., 1995a; Ross et al., 1999; Tavares et al., 2003), e doença de Alzheimer (Ross et al., 1998; Gattaz et al., 1995b).

A PLA₂ também influencia o processamento e a secreção da APP. Uma ativação da PLA₂ aumenta a liberação da APP solúvel no meio extracelular (Emmerling et al., 1993, Cho et al., 2006). Como o aumento da secreção da α -APPs diminui a formação do A β , é razoável supormos que uma redução da PLA₂ reduz a secreção da APP, contribuindo assim para um aumento da produção do A β . Esta suposição é apoiada nos achados de Gattaz et al. (1996), que mostram uma correlação entre a diminuição da PLA₂ e o número de placas senis no cérebro de pacientes com DA. Além disso, sugere-se uma relação entre a diminuição da PLA₂ e a gravidade clínica da DA, visto que a redução da atividade da enzima correlacionava-se

com início da doença e com óbito mais precoces. Neste estudo também foi mostrado que em plaquetas de pacientes com DA a atividade da PLA₂ está reduzida quando comparada com controles sadios e controles psiquiátricos, sugerindo assim uma especificidade do achado para a DA. A redução da atividade da enzima em plaquetas também se correlacionava com a gravidade da doença (Gattaz et al., 1996).

Também foi investigada a atividade da PLA₂ em pacientes com a DA, pacientes com Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) e controles sadios (Gattaz et al., 2004). Neste estudo, a atividade da PLA₂ estava reduzida em pacientes com DA quando comparada com controles e com CCL. A diminuição da PLA₂ também estava correlacionada com piores rendimentos cognitivos medidos pelo MEEM e CAMDEX.

Em face destes dados, pode-se especular que as alterações ocorridas em plaquetas, relacionadas com a atividade da PLA₂, fluidez da membrana e variação na quantidade de APP, podem servir como marcadores periféricos para a DA em si, ou como preditores de sua gravidade.

1.6 O uso de plaquetas como modelo periférico de neurônios

A principal função fisiológica das plaquetas é a homeostase, ou seja, conter a perda de sangue quando um vaso sanguíneo é lesado. As plaquetas contêm três tipos de grânulos: grânulos densos, α -grânulos e

lisossomas. Os grânulos e seus conteúdos são liberados após a ativação das plaquetas em resposta a algum estímulo. Os principais estímulos plaquetários fisiológicos são: trombina, colágeno, ADP, adrenalina, vasopressina e serotonina. Existem também estímulos não fisiológicos como substâncias cationóforas divalentes e éster de forbol. A membrana das plaquetas contém vários tipos de receptores em sua superfície, que respondem aos estímulos externos, podendo ser uma resposta inibitória ou de ativação (Holmsen, 1991).

A idéia de se usar plaquetas como modelo neurofarmacológico se iniciou em meados dos anos 50, com a descoberta de que as plaquetas armazenavam o neurotransmissor serotonina (Barradas e Mikhailidis, 1993).

O uso das plaquetas como um marcador periférico do metabolismo cerebral é baseado nas similaridades entre plaquetas e neurônios: 1) plaquetas estocam e liberam neurotransmissores (nos α -grânulos e grânulos densos); 2) a liberação dos grânulos é controlada pela concentração intracelular de cálcio; 3) as plaquetas expressam algumas proteínas de membrana relacionada com neurônios como os receptores NMDA, 4) conforme já citado anteriormente, as plaquetas contêm as enzimas envolvidas no processamento da APP (Li et al., 1998) e 5) e plaquetas apresentam processos na membrana plasmática semelhante a neurites que são provocadas por proteases extracelulares. Estas similaridades são intrigantes, pois plaquetas e neurônios não são derivados da mesma origem embrionária. Contudo, as plaquetas há muitos anos são usadas como marcadores clínicos para muitas desordens neuropsiquiátricas, como

depressão, esquizofrenia e doença de Alzheimer (Bush e Tanzi, 1998, Di Luca et al., 2000).

Estudos realizados em plaquetas de pacientes com Alzheimer moderado e grave, mostraram anormalidades citoesqueléticas, fluxo citoplasmático anormal de cálcio, atividade anormal no transportador de glutamato, atividade diminuída de fosfolipases e aumento os níveis citoplasmáticos de proteína quinase C. Além disto, vários laboratórios descrevem alterações no metabolismo e na concentração de APP em plaquetas de pacientes com DA (Di Luca et al., 2000).

De acordo com estas observações, as plaquetas podem ser consideradas uma célula ideal para se estudar mecanismos metabólicos, espelhando num compartimento periférico, a evolução de processos bioquímicos relacionados com a DA, que ocorrem no sistema nervoso central. Também devem ser mencionadas a facilidade e conveniência na obtenção das plaquetas, que também são características de um candidato a marcador bioquímico (Padovani et al., 2001b).

2 OBJETIVOS GERAIS

Investigar as alterações relacionadas à PLA₂, APP e fluidez da membrana que ocorrem em plaquetas de pacientes com doença de Alzheimer, comparando-os com pacientes portadores do Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) e controles idosos saudáveis.

2.1 Objetivos Específicos

- Determinar a razão da APP (130/110 kDa) em plaquetas de pacientes com doença de Alzheimer, com CCL e em controles idosos saudáveis pela técnica de *Western Blot*.
- Determinar a fluidez da membrana das plaquetas de pacientes com doença de Alzheimer, com CCL e em controles idosos saudáveis empregando a leitura da anisotropia do DPH.
- Determinar a atividade dos diferentes grupos de PLA₂ em plaquetas de pacientes com a doença de Alzheimer, com CCL e em controles saudáveis, por ensaio radioenzimático.
- Correlacionar os achados da fluidez da membrana e da razão da APP com a atividade da PLA₂.
- Correlacionar os dados de fluidez de membrana, APP e PLA₂ em plaquetas de pacientes com doença de Alzheimer com parâmetros cognitivos.

3 MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foram colhidas amostras de sangue de pacientes em seguimento no Ambulatório de Psiquiatria Geriátrica do Laboratório de Neurociências – LIM 27, Departamento e Instituto de Psiquiatria, USP.

A avaliação do estado mental foi realizada usando-se a versão brasileira do CAMDEX (The Cambridge Examination for Mental Disorders in the Elderly, Roth, 1986; Bottino,1999), que produz pontuação para o CAMCOG (Cambridge Cognitive Test), o MEEM (MiniExame do Estado Mental, Folstein, 1975), a Escala de Demência de Blessed (EDB, Blessed, 1968) , o Teste de Informação e Memória – 10 itens (Roth, 1953), e para Escore Isquêmico de Hachinski (Hachinski, 1975). Também foram aplicados o teste do relógio (pontuação de Sunderland, Sunderland, 1989) e o IQCODE (Informant Questionnaire of Cognitive Disorders of the Elderly, Jorm, 1989) para avaliar a gravidade do comprometimento cognitivo. E para avaliar sintomatologia depressiva, aplicou-se a Escala de Depressão de Hamilton - 21 itens (Hamilton, 1960).

A avaliação neuropsicológica foi realizada por neuropsicólogos e incluiu os testes RBMT (Rivermead Behavioral Memory Test, Wilson, 1985; Oliveira, 1999), FOME (Fuld Object-Memory Evaluation, Fuld, 1980), SKT (Short Cognitive Test, Erzigkeit, 1991; Flaks, 2006), Trilhas A e B (Army,

1944), Wais-R (Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised) – vocabulário e desenho de blocos (Wechsler, 1981).

Em todos os indivíduos envolvidos no estudo foram realizados exames laboratoriais (função tireoidiana, hemograma completo, exames bioquímicos no sangue, dosagem de ácido fólico e vitamina B12, testes de sífilis e perfil de lípides sanguíneos) com a finalidade de afastar possíveis causas reversíveis de demência. Nos casos de pacientes com suspeita de demência realizaram-se estudos de neuroimagem (Tomografia Computadorizada ou Ressonância Magnética Nuclear do crânio).

Foram excluídos do estudo, pacientes com idade inferior a 60 anos (com exceção de pacientes portadores de DA pré-senil), analfabetos, portadores de deficiências visuais ou auditivas ou condições de saúde gravemente alteradas que inviabilizassem a execução de testes neuropsicológicos e exames subsidiários. Também foram excluídos pacientes com demência avançada, doença psiquiátrica grave concomitante e evidências clínicas de forte componente vascular na etiologia dos déficits cognitivos.

Todos os indivíduos envolvidos no estudo foram informados sobre o objetivo da pesquisa e foram incluídos após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, já aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

O diagnóstico clínico de consenso foi realizado por uma equipe de especialistas multidisciplinares levando-se em consideração dados clínicos, neuropsicológicos, laboratoriais e neuroimagem, estabelecendo desta

maneira um diagnóstico de consenso. Os pacientes foram divididos em três grupos de acordo com o diagnóstico: Controle, CCL (comprometimento cognitivo leve) e Doença de Alzheimer. O diagnóstico de demência foi realizado de acordo com os critérios da Associação Psiquiátrica Americana (DSM-IV, 1994) e de McKhann et al. (1984). O diagnóstico de comprometimento cognitivo leve (CCL) foi realizado de acordo com os critérios de Petersen et al., 1999.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção e preparo das plaquetas:

Para realização das análises de Western Blot da APP, fluidez de membrana e radioenzimático para atividade da PLA₂ em plaquetas, a coleta de sangue e preparo das plaquetas envolvem cuidados especiais na prevenção da agregação, como coleta e manuseio das amostras em tubos plásticos, o uso de scalp 21 e mínima permanência do torniquete no momento da punção. As amostras foram processadas no máximo 30 minutos após as coletas e foram mantidas a temperatura ambiente, durante o procedimento. Para cada um dos ensaios o preparo das plaquetas foi diferente:

A) Obtenção e preparo das plaquetas para o ensaio de Western Blot da proteína APP

Foram coletados 15 mL de sangue em tubos a vácuo do tipo *monovet* contendo anticoagulante citrato de sódio. Adicionou-se 200µL de EDTA 0,09 M para cada 10 mL de sangue. Homogeneizou-se delicadamente por inversão e centrifugou-se por 10 minutos a 1300 rpm a 20°C. O sobrenadante PRP (Plasma Rico em Plaquetas) foi transferido para tubo com capacidade de 15 mL (tipo falcon) e centrifugado por 15 minutos a 2400 rpm a 20°C. O sobrenadante foi removido por inversão e o *pellet* de plaquetas foi lavado com 5 mL de Tris 10 mM, pH = 7,4. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* com aproximadamente 1 mL de Tampão de Lise, contendo inibidores de proteases. As plaquetas foram congeladas e descongeladas para facilitar a lise e armazenadas em criotubos em freezer -70° C.

B) Obtenção e preparo das plaquetas para o ensaio de fluidez de membrana

Foram coletados 10 mL de sangue em 2 tubos a vácuo do tipo *monovet* contendo anticoagulante EDTA. Adicionou-se 200µL de EDTA 0,09M e 2 mL de Tampão BSG em cada tubo. Homogeneizou-se delicadamente por inversão e centrifugou-se por 5 minutos a 500 g a 20°C. Transferiu-se 2 mL do sobrenadante para tubos de ultra centrífuga que foram reservados em gelo. Adicionou-se mais 2 mL Tampão BSG,

centrifugou-se por mais 5 minutos a 500 g a 20°C e transferiu-se mais 2 mL do sobrenadante para o tubo de ultra centrífuga. Este procedimento foi repetido um total de 4 vezes, sempre juntando-se os sobrenadantes. O *pool* de sobrenadantes foi centrifugado a 25.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de plaquetas foi ressuspensão com o mesmo volume de Tampão Tris isosmótico, sendo a seguir centrifugado novamente a 25.000 g por 10 minutos a 4°C. O *pellet* foi ressuspensão em Tampão Tris Hipotônico e triturado em *Polytron* por 30 segundos na posição 5. A suspensão de membranas totais foi centrifugada a 36.000 g por 10 minutos a 4°C. O *pellet* de membranas foi ressuspensão em Tampão PBS e armazenado em criotubos a -70° C.

C) Obtenção e preparo das plaquetas para o ensaio radioenzimático da atividade da PLA₂

Foram coletados 20 mL de sangue em tubos a vácuo do tipo *monovet* contendo anticoagulante citrato de sódio. Em cada tubo foi adicionado 1 mL de ACD-NH. Homogeneizou-se delicadamente por inversão e centrifugou-se durante 15 minutos a 1600 rpm a 20°C. O sobrenadante PRP (Plasma Rico em Plaquetas) foi transferido para tubo com capacidade de 50 mL (tipo falcon) e o pH ajustado para 6,5 com ACD-NH. Transferiu-se o PRP para 2 tubos de poliestireno. Centrifugou-se durante 10 minutos a 2400 rpm a 20°C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente por inversão. Adicionou-se 2,5 mL de solução de lavagem e deixou-se descansar 10 minutos. As plaquetas foram cuidadosamente homogeneizadas com pipeta e adicionou-

se mais 2,5 mL de solução de lavagem. Centrifugou-se por 8 minutos a 2400 rpm. Removeu-se cuidadosamente o sobrenadante e cada *pellet* foi ressuspensão delicadamente com 500 µL de tris-sacarose. As plaquetas foram armazenadas em criotubos e mantidas em freezer -70° C.

3.2.2 Western Blotting para análise da APP em plaquetas

Após o preparo da amostra conforme item 3.2.1 A, foi dosado o conteúdo de proteínas totais da suspensão de plaquetas pelo método Lowry (ver item 3.2.5). Com o resultado da quantidade de proteína, as amostras foram diluídas com Tampão de Amostra (*Laemmli buffer*) para concentrações de proteína variando de 0,65 a 1 mg/mL. No gel de poliacrilamida 8% foram aplicados 24 µg de proteína de cada amostra. Antes da aplicação no gel, as amostras foram fervidas por 5 minutos em banho seco (*DRI-BLOCK DB-3*, Techne). A eletroforese para a separação das proteínas se desenvolveu em Tampão de Corrida por 120 minutos a 120 V. Terminada a eletroforese, o gel foi submetido à transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose, onde foi possível a reação com os anticorpos específicos. A transferência ocorreu em Tampão de Transferência por 90 minutos a 200 mA. A eletroforese e transferência ocorreram em sistema *Mini-Protean⁰ II Cell*, da Bio-rad. Em seguida, a membrana foi bloqueada com leite desnatado a 5% em TBS-Tween por 1 hora sob agitação, a temperatura ambiente, a fim de se evitar interações inespecíficas

do anticorpo primário. Após esta incubação de 1 hora, a membrana foi lavada por 4 vezes de 5 minutos cada com TBS-Tween e a seguir foi incubada por 2 horas, a temperatura ambiente, sob agitação com o anticorpo primário diluído 1:1500 (22C11, *CHEMICON International*) que reconhece os aminoácidos 66-81 da porção N-terminal da APP. Após esta incubação de 2 horas, a membrana foi novamente lavada 4 vezes por 5 minutos cada com TBS-Tween. Então a membrana foi incubada por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação com o anticorpo secundário diluído 1:10.000 (anti-mouse IgG – conjugado a peroxidase, Sigma). Após esta última incubação a membrana passou por mais um ciclo de 4 lavagens de 5 minutos e foi então revelada e realizada a densitometria das bandas. As lavagens foram realizadas em agitador do tipo *Roto Mix* – 50800 da Barnstead/Thermolyne. Para o bloqueio e as incubações com os anticorpos foi empregado o agitador *Platform Vari Mix*, também da Barnstead/Thermolyne. A revelação ocorreu dentro do equipamento de imagem *ChemiiagerTM 4000* da Alpha Innotech, *Multimage Light Cabinet*. Sobre a membrana foi adicionado o reagente ECL (GE) que após reagir com a peroxidase conjugada ao anticorpo emitiu luz, que foi captada pelo equipamento de imagem e salva no computador através de software específico. A emissão de luz foi continuamente captada por 15 minutos, sendo então realizada a densitometria das bandas. A razão da APP foi obtida dividindo-se os resultados da densitometria das bandas de 130 kDa pelos resultados da densitometria das bandas de 110 kDa.

Foi preparado um pool de amostras de plaquetas seguindo-se o mesmo protocolo de preparo para as amostras e feitas várias alíquotas, que foram congeladas a -80°C . Em cada gel foi aplicada esta amostra padrão em duplicata, chamada de padrão interno (Pi), para corrigir variações analíticas entre os dias. Foi calculada a razão da APP para o Pi e o resultado das amostras foi dividido pela razão do Pi correspondente a cada gel. Todas as alíquotas de Pi têm a mesma concentração de APP, então se houver alguma alteração relacionada à técnica, esta alteração ocorrerá com as amostras e com o Pi. Por exemplo, se a densitometria das bandas do Pi está aumentada ou diminuída comparando-se entre os dias, é possível saber que não foi devido a maior ou menor quantidade de APP e sim por alguma variação analítica, pois a quantidade de APP é a mesma em todas as alíquotas. O protocolo foi adaptado á partir dos estudos de Di Luca et al. (1998) e Rosenberg et al. (1997).

A revelação do Western Blotting dentro deste gabinete só foi possível por que este modelo (*Multimage Light Cabinet, ChemiimagerTM 4000*) tem a capacidade de captar quimioluminescência. O valor da densitometria foi obtido com a seleção das bandas, realizada por ferramentas do software, onde foi possível delimitar um retângulo ao redor das bandas. Este retângulo, durante todo o estudo teve a mesma área (1404, unidade arbitrária de densitometria).

3.2.3 Determinação da fluidez de membranas totais de plaquetas.

A técnica para avaliação da fluidez de membrana foi padronizada através de medida de anisotropia (ou polarização) por fluorescência. Essa técnica emprega uma molécula fluorescente, o DPH (1,6 - difenil - 1,3,5 - hexatrieno), que por ser uma molécula rica em lípidos, insere-se no centro da membrana, na porção hidrofóbica de hidrocarbonetos (Bondy et al., 1990) (Figura 7). O movimento e/ou velocidade de rotação da sonda DPH no centro hidrocarbono reflete o estado dinâmico da membrana (Zubenko et al., 1999).

Após o preparo da amostra conforme item 3.2.1 B, foi dosado o conteúdo de proteínas totais da suspensão de membranas pelo método *Lowry* (ver item 3.2.5). Com o resultado da quantidade de proteína, as amostras foram diluídas com Tris-HCl 5,0 mM, pH 7,4 para a concentração de proteína de 300 µg/mL. Foi preparada a solução com a sonda fluorescente DPH 33 µM, em Tris-HCl pH 7,4, partindo-se de solução estoque de DPH 5,0 mM em tetrahidrofurano. Esta solução fluorescente foi mantida em béquer envolto por papel alumínio e sob agitação magnética durante todo o ensaio. Feito isto, foram pipetadas, em quintuplicata: 0,9 mL de Tris-HCl 5,0 mM, pH 7,4 + 0,1 mL da suspensão de membrana + 1,0 mL da solução fluorescente. Essa mistura foi homogeneizada por 10 segundos em vórtex e incubada por 30 min em banho-maria com agitação a 37 °C (Neslab RTE – 111, Neslab Instruments). As leituras foram realizadas em um espectrofluorímetro de dupla emissão MD-5020 (Photon Technology

International–PTI, Mommouth Junction), com comprimento de onda de excitação $\lambda = 360$ nm e de emissão $\lambda \approx 450$ nm. O valor da anisotropia, que é o inverso da fluidez de membrana, foi obtido através do *software* Felix, também da PTI. O protocolo foi adaptado a partir dos estudos de Zubenko et al. (1987c) e Müller et al. (1998).

Para a validação da técnica, foram preparadas três amostras de voluntários, aliquotadas, congeladas e o ensaio foi repetido por 4 dias consecutivos, descongelando-se uma alíquota por dia. A leitura foi feita em quintuplicata e para calcular o valor médio da anisotropia de cada amostra foram excluídos os valores mais baixo e mais alto, calculando-se a média dos três valores restantes.

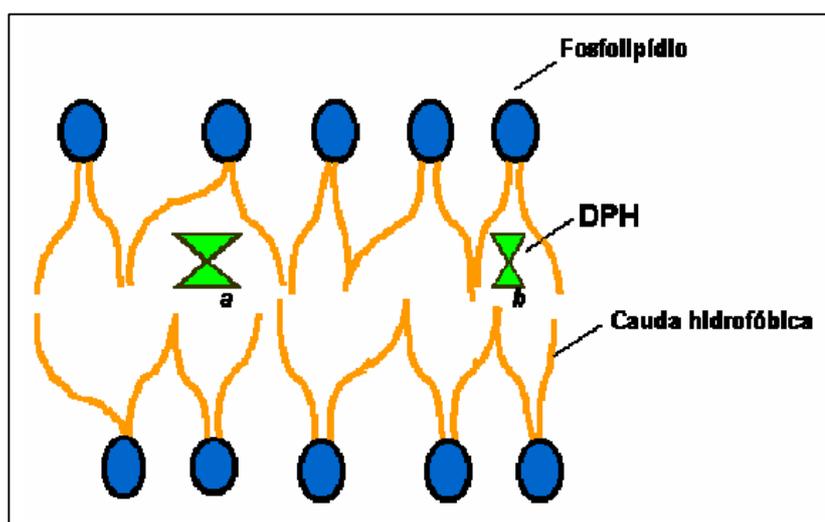


Figura 7. Medida da fluidez da membrana com DPH. O movimento da molécula DPH intercalada no interior das membranas fornece uma medida de anisotropia que é utilizada para caracterizar a fluidez das membranas. O DPH fornece uma medida de anisotropia da região hidrofóbica de membranas. A anisotropia é proporcionalmente inversa à fluidez de membranas. Assim, a menor absorção de luz por uma molécula fluorescente com movimento menos restrito (a) é seguida por uma menor emissão de luz polarizada, indicando uma fluidez de membranas aumentada, enquanto a maior absorção de luz por uma molécula fluorescente com movimento mais restrito (b) é seguida por uma maior emissão de luz polarizada, indicando uma fluidez de membranas reduzida. Fonte: Schaeffer, 2004.

3.2.4 Método radioenzimático para a determinação da atividade da PLA₂ em plaquetas.

O método utilizado para determinar a atividade dos grupos da PLA₂ foi o rádio-enzimático, desenvolvido por Talib L, 2006 (dados submetidos para publicação) a partir dos métodos descritos previamente por Flesch et al. (1985) e Gattaz et al. (1995). Os substratos da enzima utilizados foram o L- α -1-palmitoil-2-araquidonil-fosfatidilcolina marcado com [1-¹⁴C] na cauda araquidonil na posição *sn*-2 (araquidonil-1-¹⁴C-PC) (PerkinElmer) e o L-3-Phosphatidylcholine, 1-palmitoyl-2-[1-¹⁴C]palmitoyl marcado com [1-¹⁴C] na cauda palmitoil na posição *sn*-2 (palmitoil-1-¹⁴C-PC) (GE). Neste ensaio, o [1-¹⁴C]-ácido graxo, ligado à posição *sn*-2 da fosfatidilcolina, é clivado pela PLA₂ e extraído. A radioatividade do [1-¹⁴C]-ácido graxo liberada é medida em um contador de cintilação líquida e utilizada para calcular a atividade da PLA₂.

As amostras previamente armazenadas em freezer -70°C foram descongeladas e mantidas sob gelo. Após determinação dos níveis de proteínas pelo método de *Lowry* (ver item 3.2.5), foi pipetado um volume de cada amostra, necessário para obter uma concentração de proteína de 0,2 mg/mL. O volume da amostra foi completado para 400 μ L com Tris-sacarose pH 7,4 (Tris 50 mM e sacarose 233 mM, tampão de lise) e adicionou-se 600 μ L de Tris 50 mM pH 8,5. A amostra referente ao branco continha 400 μ L de Tris-Sacarose pH 7,4 (Tris 50 mM e sacarose 233 mM) e 600 μ L de Tris 50mM. Cada amostra foi realizada em três lotes diferentes, em triplicata para

cada lote: um para a atividade da PLA₂ independente de cálcio (iPLA₂), outro para a atividade da PLA₂ citosólica (cPLA₂) e outro para a atividade da PLA₂ secretada (sPLA₂). Após homogeneização, para a atividade da iPLA₂ pipetado em cada tubo: 100 µL de EDTA 5mM + 50 µL de Tris-HCl 1,0 M pH = 8,5 + 200 µL da amostra diluída (ou do branco) + 150 µL (0,06 µCi) do substrato radioativo PC-¹⁴C – palmitoil; para a atividade da cPLA₂ foi pipetado em cada tubo: 100 µL de CaCl₂ 500 µM + 50 µL de Tris-HCl 1,0 M pH = 8,5 + 200 µL da amostra diluída (ou do branco) + 150 µL (0,06 µCi) do substrato radioativo PC-¹⁴C – araquidonil e para a atividade da sPLA₂ foi pipetado em cada tubo: 100 µL de CaCl₂ 25 mM + 50 µL de Tris-HCl 1,0 M pH = 8,5 + 200 µL da amostra diluída (ou do branco) + 150 µL (0,06 µCi) do substrato radioativo PC-¹⁴C – araquidonil.

Homogeneizou-se novamente e as misturas de cada um dos lotes foram incubadas por 30 min em banho-maria sob agitação a 37 °C. Após a incubação, as amostras foram colocadas imediatamente em banho de gelo e foram adicionados 700 µL de solução de parada, para interromper a reação. Em seguida as amostras foram levadas à temperatura ambiente e após 10 min de repouso, adicionou-se 700 µL de *n*-heptano, para extração do ácido graxo marcado através de agitação rigorosa em vórtex por 30 seg. As misturas foram então, centrifugadas a 4000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Transferiu-se 500 µL da fase orgânica para tubos contendo 60 mg de sílica gel e 300 µL de *n*-heptano para reter os fosfolípidos e centrifugou-se novamente a 4000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Transferiu-se 500 µL do sobrenadante para tubos contendo 6,0 mL de líquido de cintilação

e após homogeneização, colocou-se para contar em um contador de cintilação líquida (Tri-Carb 2100 TR, Packard) na seguinte ordem: Branco, 100% (somente o substrato marcado) e amostras, para cada um dos lotes. Os resultados foram fornecidos em CPM, e então, corrigidos para pmol/mg prot/min utilizando a seguinte fórmula:

Atividade da PLA₂ (pMol/mg prot/min)= CPM x 25/ A x 0,988 x 2,22 x B.

Sendo, CPM= contagens por minuto; 25= fator de ajuste para 1 mg de proteína (1 mg/0,04 mg concentração final de proteína); A= atividade específica do radioativo em mCi/mMol; B= tempo de incubação em minutos; 0,988= Eficiência do equipamento.

3.2.5 Determinação da quantidade de proteína das amostras:

As proteínas foram quantificadas utilizando o kit Bio-Rad *DC Protein assay* (Bio-Rad Hercules) que é um ensaio colorimétrico para a determinação de proteínas, baseado no método de *Lowry* (Lowry et al., 1951). O ensaio consiste na reação de proteínas com uma solução alcalina de tartarato de cobre (Reagente A) e com o reagente de Folin (*1,2-naphthoquinone-4-sulfonate*) (Reagente B). Como no ensaio de *Lowry*, existem duas etapas que levam ao desenvolvimento da cor: 1) a reação entre proteínas e o cobre em um meio alcalino, e 2) a subsequente ligação do reagente de Folin às proteínas tratadas com cobre. Quando o reagente

de Folin liga-se a essas proteínas, ele é reduzido pela perda de 1, 2 ou 3 átomos de oxigênio, e muda a cor do amarelo para um azul característico, cuja absorvância é lida entre 405 e 750 nm (Peterson,1979).

A determinação da concentração de proteínas totais foi obtida por meio de uma curva padrão de proteínas, empregando-se albumina de soro bovino (*bovine serum albumin* ou BSA; Sigma-Aldrich) nas seguintes concentrações: 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 1,5 mg/mL.

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços (em temperatura ambiente), onde pipetou-se 25 µL do Reagente A, 5 µL do padrão de proteínas de BSA nas seis diferentes concentrações ou 5 µL das amostras ou branco (Tris-sacarose) e 200 µL do Reagente B. Após incubação de 15 min em temperatura ambiente em um agitador de placas (Wallac-PerkinElmer), as absorvâncias das amostras foram lidas em um leitor de microplacas (Spectracount, da Packard) a 680 nm. Todas as determinações dos níveis de proteínas foram realizadas em triplicatas.

3.2.6 Análise Estatística

As médias das medidas bioquímicas da APP, fluidez da membrana e PLA₂ em cada um dos três grupos de interesse foram comparadas por meio de análise de variância (ANOVA). Nos casos em que a análise indicou diferenças significantes entre as médias (com $p < 0,05$), comparações entre

dois grupos foram feitas com t – test. Para correlações usamos o coeficiente de Pearson, corrigindo-se pelo método de Bonferroni nos casos de comparações múltiplas. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 13.0 para Windows.

3.2.7 Lista de reagentes e soluções:

01) ACD-NH: Glicose 124 mM, citrato de sódio dihidratado 84 mM, ácido cítrico 41 mM;

02) Solução de Lavagem: Citrato de sódio 0,1 M, KCl 0,155 M, MgCl₂ 0,1 M, glicose 0,33 M, CaCl₂ 0,1 M, albumina 200mg/mL, NaCl 0,9% e apyrase 2U/mL;

03) Tris – sacarose: Tris-HCL 50 mM pH = 7,4, sacarose 233 mM;

04) Tampão de Lise: Tris-HCl 10 mM, pH=7,4, EGTA 1mM. Adicionar no momento do uso, para cada 1 mL de tampão: 10 µL de PMSF 100 mM e 10 µL do coquetel de inibidor de protease (AEBSF, aprotinina, bestatina, E64, leupeptina, da AMRESCO);

05) BSG: NaCl 117 mM, citrato de sódio diidratado 13.6 mM, glicose 11.1 mM, Na₂HPO₄ 8.6 mM, K₂HPO₄ 1.6 mM, pH=7,4;

06) Tris Isosmótico: Tris-HCl 50 mM, NaCl 10 mM, EDTA 20 mM, pH=6,3;

07) Tris Hipotônico: Tris-HCL 5mM, EDTA 5 mM, pH=8,0;

08) PBS: NaCl 120 mM, Na₂HPO₄ 15,3 mM, K₂HPO₄ 1,46 mM, KCl 1,68 mM, pH=7,4;

09) Tampão de amostra (*Laemmli Buffer*): Tris 0,8 M, Mercaptoetanol 12%, glicerol 10%, SDS 8%, azul de bromofenol 0,2%;

10) Gel de poliacrilamida a 8%: 3,30 mL de Acrilamida:bisacrilamida (30:0,8), 3,73 mL de Tris 1 M pH=8,8, 4,93 mL de água, 67 µL de SDS 10%, 100 µL de glicerol, 100 µL de persulfato de amônia e 7 µL de temed; Gel de acomodação a 5%: 785 µL de Acrilamida:bisacrilamida (30:0,8), 595 µL de Tris 1 M pH=6,8, 3,4 mL de água, 48 µL de SDS 10%, 25 µL de persulfato de amônia e 5 µL de temed;

11) Tampão de corrida: Tris 25 mM, glicina 160 mM, SDS 1%;

12) Tampão de transferência: Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%;

13) TBS - Tween: Tris 25 mM, NaCl 140 mM, KCl 5 mM, Tween 0,2%.

4 RESULTADOS

4.1 Coleta e descrição das amostras:

Foram colhidas amostras de 23 pacientes com a Doença de Alzheimer (DA), 25 com Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) e 30 controles sadios (Tabela 1). A idade média dos indivíduos envolvidos no estudo foi semelhante nos três grupos. Quanto ao sexo, os grupos também foram semelhantes, pois apesar de haver predominância do sexo feminino, esta predominância foi mantida entre os grupos. A escolaridade foi avaliada quanto aos anos de estudo e o grupo DA apresentou a mais baixa escolaridade, de 6 anos, diferindo significativamente tanto do grupo controle, com média de 14 anos ($p < 0,001$) quanto do CCL com média de 10,9 ($p < 0,001$). Entre os grupos controle e CCL a diferença também foi significativa ($p = 0,018$). Quanto aos parâmetros cognitivos, como esperado e por definição, o grupo DA foi significativamente diferente em relação aos grupos controle e CCL para os resultados de CAMCOG Total, os escores de memória do CAMCOG e MEEM ($p < 0,001$ em todos os testes). As diferenças entre os grupos controle e CCL foram menores e sem significância. O grupo DA foi composto por 23 indivíduos e a gravidade da doença foi classificada em leve (13 pacientes, ou 56,5%) e moderada (10 pacientes, ou 43,5%). Entre os pacientes com DA, apenas 3 (13%) não faziam uso de inibidores da acetilcolinesterase. O grupo CCL foi composto

por 25 indivíduos e o comprometimento cognitivo leve foi classificado em amnésico (7 indivíduos, 28%), não-amnésico (7 indivíduos, 28%) e múltiplas funções (11 indivíduos, 44%).

Tabela 1: Descrição da amostra e distribuição dos indivíduos envolvidos no estudo.

	Controle (n = 30)	CCL (n = 25)	DA (n = 23)
Idade ^a (média ± DP)	70,2 ± 5,7	70,9 ± 5,7	74,4 ± 9,0
Sexo ^{b, c} (n)	23 F, 7 M	17 F, 8 M	15 F, 8 M
Escolaridade ^{e, d} (média dos anos de estudo ± DP)	14,0 ± 3,6	10,9 ± 4,3	6,0 ± 4,4
CAMCOG Total ^f (média ± DP)	100 ± 3,3	92,7 ± 7,1	62,4 ± 19,1
CAMCOG-memória ^f (média ± DP)	24 ± 2,2	21,6 ± 3,0	10,5 ± 6,2
MEEM ^f (média ± DP)	29 ± 1,1	27,3 ± 2,3	18,6 ± 5,1

^a= as médias das idades (em anos) entre os grupos são semelhantes ($p = 0,072$); ^b F= sexo feminino e M= sexo masculino; ^c = os grupos não diferem quanto ao sexo ($\chi^2 = 0,933$ e $p = 0,627$). ^d= $p < 0,001$ entre DA & CCL e DA & controle; ^e = $p < 0,018$ entre controle & CCL; ^f = $p < 0,001$ entre DA & CCL e DA & controle.

O sangue de cada paciente envolvido no estudo foi dividido em três porções e para cada uma delas realizou-se uma preparação de amostra diferente, sendo uma para o Western Blot de APP, uma para fluidez de membrana e a outra para o ensaio radioenzimático da PLA₂.

Foi necessário dosar a quantidade de proteína de cada uma das preparações, uma vez que o modo do preparo influencia na quantidade de

proteína resultante. Em todos os ensaios, as diluições das amostras foram realizadas a partir de uma concentração conhecida de proteína.

A seguir estão descritos os resultados obtidos para cada uma das análises realizadas com as plaquetas dos envolvidos no estudo:

4.2 Western Blot da proteína precursora do amilóide:

Após a padronização, o protocolo para preparo das plaquetas e o procedimento da eletroforese, imunoreações e revelação dos blottings, foram estabelecidos como está apresentado em “Métodos”.

Considerando-se as dificuldades analíticas da técnica e o fato de ser uma técnica semi-quantitativa, foi considerado o coeficiente de variação limite de 15% entre as replicatas, que é a variação empregada para diversas técnicas analíticas quantitativas, como por exemplo, a cromatografia.

Foram realizadas análises de 77 amostras. As médias da razão da APP de 130/110 kDa foram significativamente menores na DA do que no grupo controle. A média do grupo controle foi 1,24 (\pm 0,21) e para o grupo DA foi 1,01 (\pm 0,21), $p= 0,001$. O grupo CCL apresentou média para a razão da APP de 1,18 (\pm 0,21), que foi semelhante da média do grupo controle ($p= 0,904$), mas foi diferente da média do grupo DA ($p= 0,027$). Na tabela 2 está apresentado um resumo da estatística descritiva dos resultados da razão dos fragmentos de 130/110 kDa da APP.

Tabela 2. Estatística descritiva dos resultados da razão da APP de 130/110 kDa obtidos pela técnica de Western Blotting.

	Controle (n = 29)	CCL (n = 25)	DA (n = 23)
Média (± DP)	1,24 (± 0,21)	1,18* (± 0,21)	1,01** (± 0,21)
Mínimo	0,88	0,79	0,61
Máximo	1,72	1,54	1,47
Valor de p	0,001		

CCL= comprometimento cognitivo leve; DA= doença de Alzheimer. **= Controle & DA, $p= 0,001$; * = CCL & DA, $p= 0,027$; Controle & CCL, $p= 0,904$; DP= Desvio Padrão.

Os resultados individuais do Western Blot da APP e a descrição das amostras encontram-se em anexo na Tabela 6 (página 79). A seguir, a representação gráfica dos resultados médios da APP:

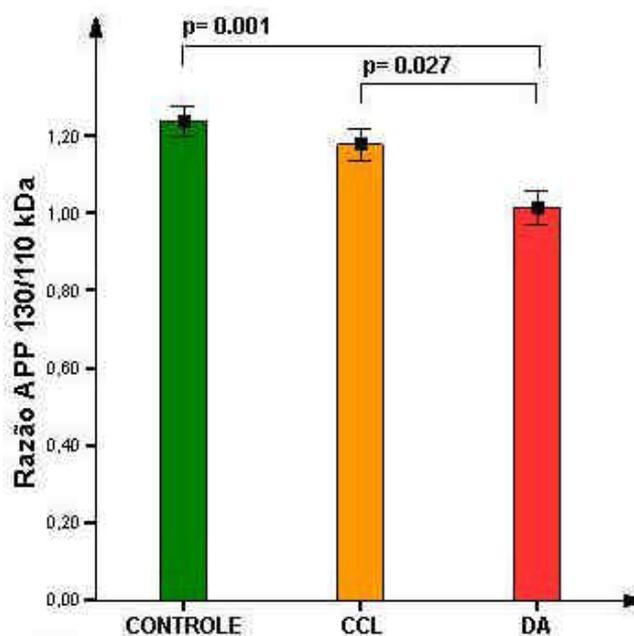
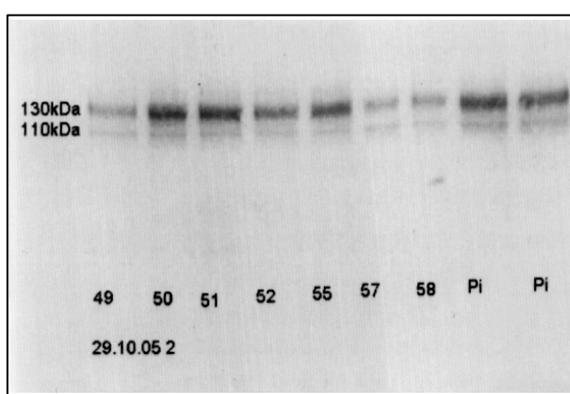
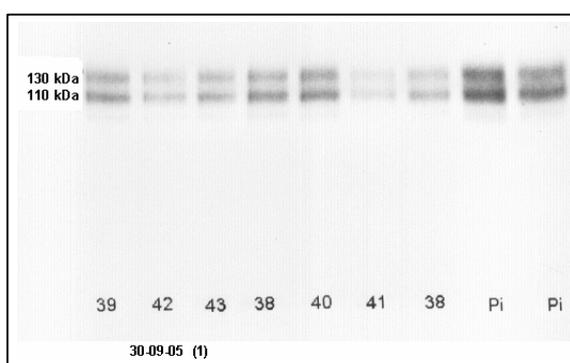


Figura 8. Médias ± EP da razão da APP 130/110 kDa entre os grupos. A média do grupo DA (1,01) foi significativamente menor que a média do grupo Controle (1,28), $p= 0,001$ e que a média do grupo CCL (1,17), $p= 0,027$.

Neste estudo foi empregada uma nova maneira de revelação dos blottings, utilizando o *Multimage Light Cabinet, Chemiimager™ 4000*, da Alpha Innotech. Este modo de revelação apresenta como vantagem a inexistência do *background* que ocorre nas revelações tradicionais, além da facilidade e rapidez na execução (Figura 9). Porém apresenta como fator limitante a necessidade de maior quantidade de proteína (foram aplicados 24 µg de proteína), e dos anticorpos primário 22C11 (diluição 1:1.500) e secundário (anti-IgG, diluição 1:10.00), quando o recomendado pelo fabricante era 1:2000 para o anticorpo 22C11 e 1:20.000 para o anticorpo secundário.



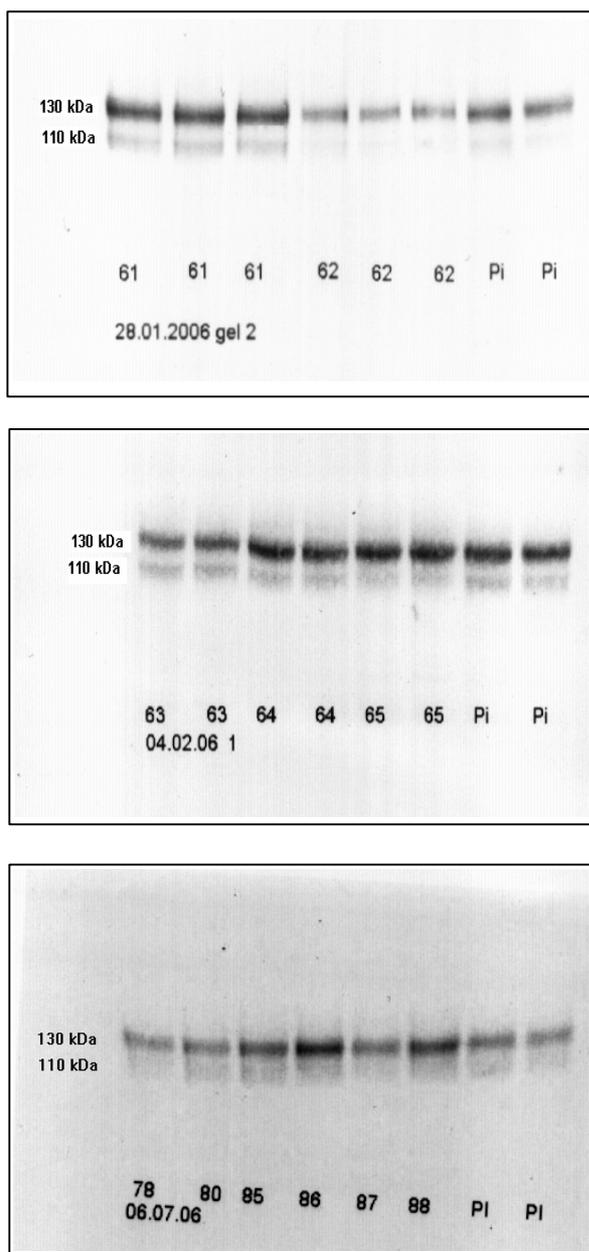


Figura 9. Blot para a proteína precursora do amilóide empregando-se o anticorpo 22C11 e revelação com ECL por 15 min dentro do gabinete (Chemiimager™ 4000 da Alpha Innotech):. 130 e 110 kDa são os pesos moleculares aparente das bandas. Os números abaixo são a identificação dos pacientes e do padrão interno.

4.3 Medida da fluidez de membranas totais de plaquetas

A validação do método mostrou pequena variação do método dentro do mesmo dia (coeficiente de variação máximo de 2%) e entre os dias (coeficiente de variação máximo de 5,7%). A tabela a seguir mostra o resultado da validação, com o desvio padrão das triplicatas e o coeficiente de variação.

Tabela 3. Valores de anisotropia plaquetas de três voluntários empregados para a validação da metodologia. Os valores são médias de triplicatas.

Amostra 1			
Dia	Anisotropia*	Desvio Padrão	CV (%)
1	0,2338	0,0043	1,8 %
2	0,2267	0,0013	0,58 %
3	0,2065	0,0044	2,0 %
4	0,2130	0,0042	1,98 %
Médias	0,2200	0,012471	5,7 %
Amostra 2			
Dia	Anisotropia*	Desvio Padrão	CV (%)
1	0,2199	0,0009	0,42 %
2	0,2224	0,0013	0,57 %
3	0,2118	0,0010	0,45 %
4	0,2099	0,0031	1,49 %
Médias	0,2160	0,00608	2,8 %
Amostra 3			
Dia	Anisotropia*	Desvio Padrão	CV (%)
1	0,2032	0,0021	1,0 %
2	0,2151	0,0008	0,38 %
3	0,2097	0,0034	1,6 %
4	0,2235	0,0019	0,38 %
Médias	0,2129	0,0086	4,0 %

* = o valor da anisotropia é resultado médio de triplicatas. CV= coeficiente de variação.

Após a padronização, foram avaliadas 77 amostras. A anisotropia tem uma relação inversa com a fluidez de membrana, ou seja, um aumento na anisotropia indica uma diminuição na fluidez da membrana. As médias das leituras da anisotropia do DPH em plaquetas não foram diferentes entre os grupos (Tabela 4, Figura 10). A média do grupo controle (0,223) não foi diferente da média do grupo CCL (0,216), $p= 0,517$. O grupo DA apresentou média de 0,215, que também não foi diferente da média do grupo controle ($p= 0,307$).

Tabela 4. Estatística descritiva dos resultados da fluidez de membrana

	Controle (n = 30)	CCL (n = 24)	DA (n = 23)
Média (± DP)	0,223 (± 0,017)	0,216 (± 0,014)	0,215(± 0,017)
Mínimo	0,181	0,198	0,184
Máximo	0,254	0,242	0,238

CCL= comprometimento cognitivo leve; DA= doença de Alzheimer; DP= Desvio Padrão

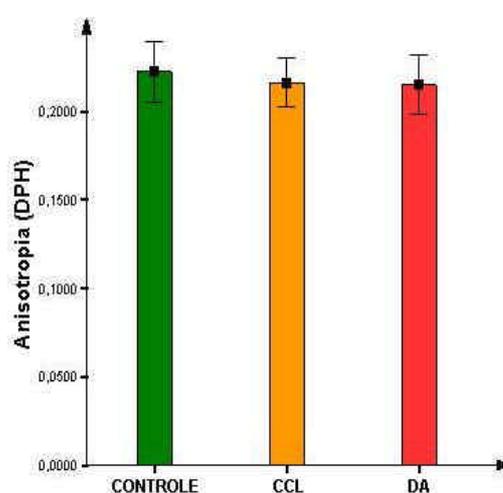


Figura 10. Médias ± DP da anisotropia do DPH em plaquetas. A média do grupo controle (0,223) não foi diferente das médias do grupo CCL (0,216) e do grupo DA (0,215).

Os resultados individuais das análises da anisotropia do DPH em plaquetas, assim como as descrições das amostras estão apresentados em anexo na Tabela 7 (página 82).

4.4 Medida da atividade da enzima PLA₂ em plaquetas

Foi avaliada a atividade da PLA₂ de 74 amostras. A atividade da PLA₂ obtida com o substrato araquidonil e 100 µM de Ca⁺² foi determinada como PLA₂ citosólica (cPLA₂) e neste ensaio as médias entre os grupos foram semelhantes (controle= 7,04 pMol.mg/min; CCL= 6,45 pMol.mg/min e DA= 5,88 pMol.mg/min). A atividade obtida com o substrato araquidonil e 5 mM de Ca⁺² foi determinada como PLA₂ secretada (sPLA₂) e estava reduzida em DA em comparação com controles (p= 0,02). A média para CCL foi semelhante aos grupos controle e DA (p= 0,081 e 0,509, respectivamente). Quando foi empregado o substrato palmitoil e EDTA 1 mM foi determinada a atividade da PLA₂ independente de Ca⁺² (iPLA₂), que está presente em pequena quantidade nas plaquetas. Os valores das médias foram 1,72 pMol.mg/min para o grupo controle; 1,81 pMol.mg/min para CCL e 1,32 pMol.mg/min para o grupo DA, apresentando diferenças entre Controle e DA (p= 0,047) e CCL e DA (p= 0,046). Ao somar as atividades dos subgrupos da PLA₂ foi possível obter a atividade enzimática total da PLA₂, que estava reduzida em DA comparado com controles (p= 0,018) (Tabela 5, Figura 11).

Tabela 5. Descrição dos resultados da atividade da PLA₂ em plaquetas

iPLA2	Controle (n = 30)	CCL (n = 22)	DA (n = 23)
Média (± DP)	1,73 ± (0,69)	1,81± (0,83)	1,32 ± (0,77)*
Mínimo	0,68	0,40	0,21
Máximo	3,44	3,07	2,61
cPLA2			
Média (± DP)	7,04 ± (3,90)	6,44 ± (3,91)	5,88 ± (2,93)[§]
Mínimo	1,59	2,30	1,26
Máximo	21,71	14,86	12,35
sPLA2			
Média (± DP)	16,70 ± (7,11)	13,32 ± (6,25)	11,84 ± (7,72)**
Mínimo	6,05	5,87	3,01
Máximo	32,63	30,03	33,17
PLA2 Total			
Média (± DP)	25,46 ± (9,10)	21,59 ± (8,77)	19,04 ± (9,76)^{§§}
Mínimo	11,01	10,13	6,97
Máximo	49,95	45,60	42,20

CCL= comprometimento cognitivo leve; DA= doença de Alzheimer; DP= Desvio Padrão. * = iPLA₂ entre Controle & DA p= 0,047, entre Controle & CCL p= 0,699 e entre CCL e DA p= 0,046; [§] = cPLA₂, Controle & DA p= 0,245, entre Controle & CCL p= 0,592 e entre CCL e DA p= 0,587 **= sPLA₂ entre DA & Controle p= 0,02; Controle & CCL p= 0,081 e CCL & DA p= 0,509; ^{§§} PLA₂ total entre Controle & DA p= 0,018, entre Controle & CCL p= 0,130 e entre CCL e DA p= 0,368.

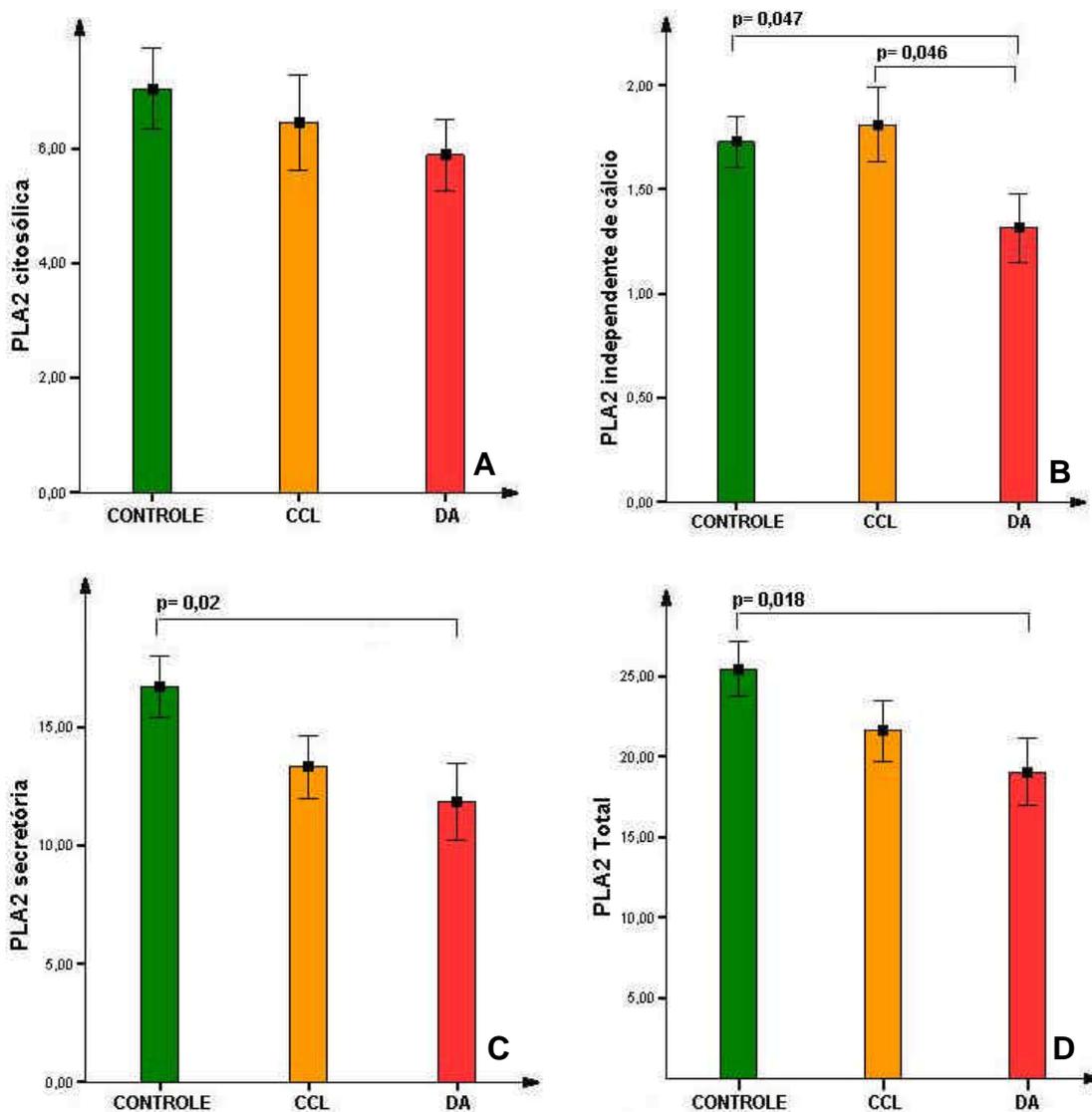


Figura 11. A) Médias \pm EP da atividade da cPLA2 ($p= 0,245$ entre controle & DA, $p= 0,592$ entre controle & CCL e $p= 0,587$ entre CCL e DA); **B)** Médias \pm EP da atividade da iPLA2 ($p= 0,047$ entre controle & DA, $p= 0,699$ entre controle & CCL e $p= 0,046$ entre CCL e DA); **C)** Médias \pm EP da atividade da sPLA2 ($p= 0,02$ entre controle & DA, $p= 0,081$ entre controle & CCL e $p= 0,509$ entre CCL e DA); **D)** Médias \pm EP da atividade total da PLA2 em ($p= 0,018$ entre controle & DA, $p= 0,130$ entre Controle & CCL e $p= 0,368$ entre CCL e DA).

Os resultados individuais das atividades dos diferentes grupos da PLA₂, assim como as descrições das amostras, estão apresentados em anexo na Tabela 8 (página 86).

4.5 Correlações entre APP, fluidez de membrana e PLA₂

Foram realizadas correlações entre os parâmetros bioquímicos estudados, sendo encontrada correlação entre a anisotropia do DPH e a razão da APP 130-110 kDa em plaquetas ($r = 0,30$, $p = 0,01$) (Figura 12). A PLA₂ não se mostrou correlacionada com os outros dois parâmetros bioquímicos, a anisotropia e a APP. A anisotropia do DPH apresenta uma relação inversa com a fluidez de membrana, ou seja, uma diminuição da anisotropia indica um aumento de fluidez. A correlação positiva encontrada entre a anisotropia e a razão da APP mostrou que uma diminuição da razão APP é acompanhada por um aumento da fluidez de membrana.

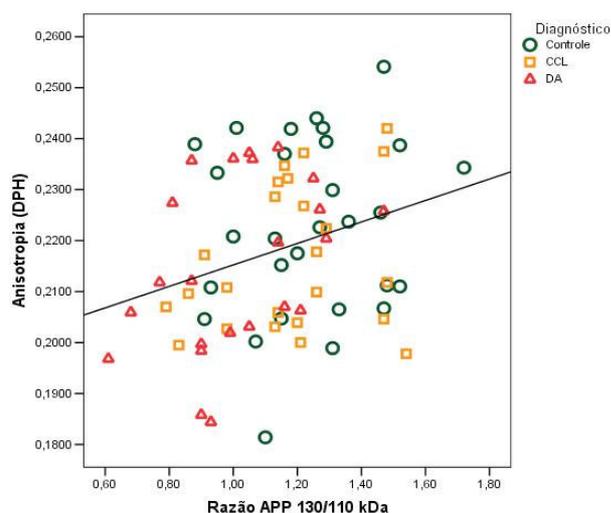


Figura 12. Gráficos mostrando correlação da APP com a anisotropia do DPH em plaquetas ($r=0,30$, $p= 0,01$).

4.6 Correlações da APP e iPLA₂ com parâmetros cognitivos

Foram realizadas correlações com os resultados de APP e de iPLA₂ com parâmetros cognitivos, como os escores do MEEM (Mini exame do estado mental), escores de memória do CAMCOG e CAMCOG Total. Esta avaliação mostrou correlação significativa da razão da APP com o MEEM ($r= 0,33$, $p= 0,003$), com os escores de memória do CAMCOG ($r= 0,38$, $p= 0,001$) e com os escores totais do CAMCOG ($r= 0,37$, $p= 0,001$) (Figura 13). A iPLA₂ também se correlacionou com o MEEM e CAMCOG, apesar de mostrar menor força de correlação ($r= 0,24$, $p= 0,037$ e $r= 0,24$, $p= 0,039$ respectivamente) (Figura 14) e não mostrou correlação com os escores de memória do CAMCOG.

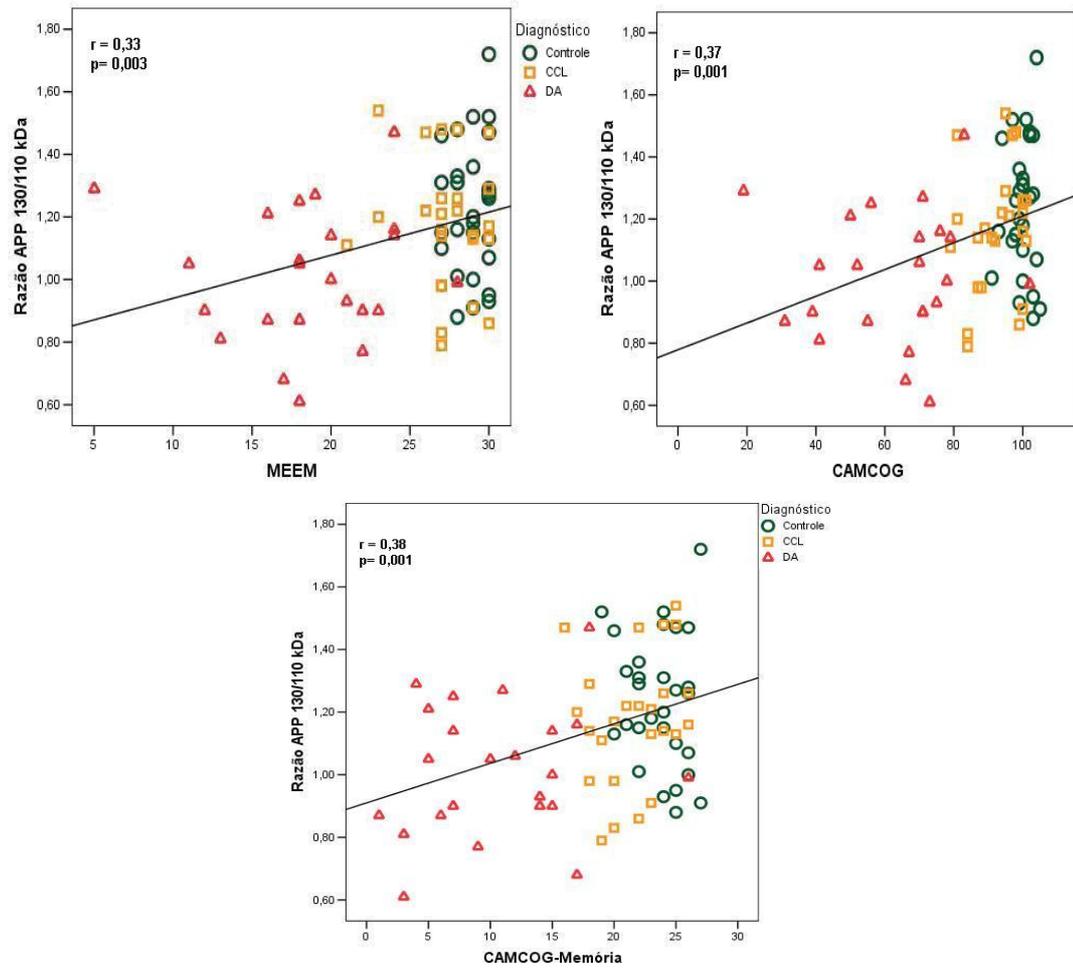


Figura 13. Gráficos mostrando correlação da APP com os testes MEEM ($r=0,33$, $p=0,003$), CAMCOG Total ($r=0,37$, $p=0,001$) e escores de memória do CAMCOG ($r=0,38$, $p=0,001$).

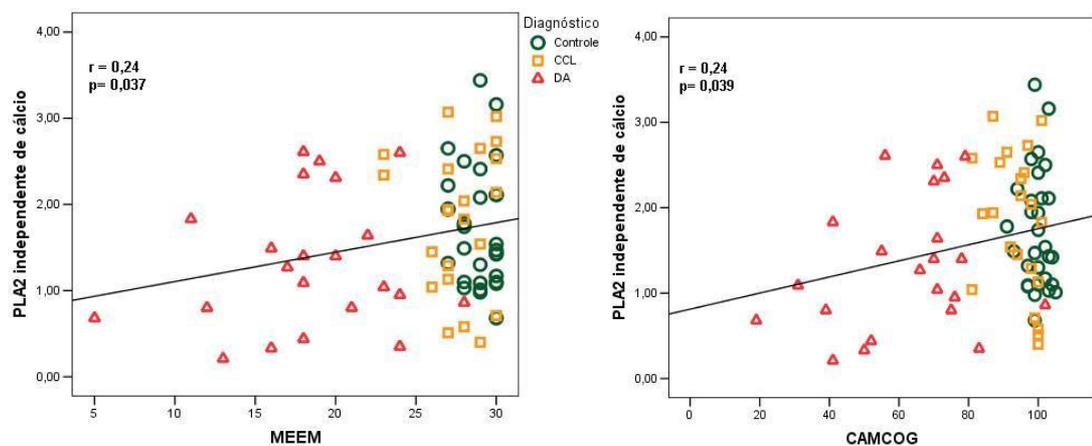


Figura 14. Gráficos mostrando correlação da iPLA2 com os testes MEEM ($r=0,24$, $p=0,037$) e CAMCOG Total ($r=0,24$, $p=0,039$).

5 DISCUSSÃO

Mesmo após um século da sua caracterização inicial, o diagnóstico da doença de Alzheimer (DA) permanece um desafio em muitos aspectos, sobre tudo nas formas iniciais da doença. É nesse cenário que se situa a busca por marcadores biológicos da doença, tanto em fluidos periféricos, como no líquido cefalorraquidiano, e também por métodos de neurimagem funcional. Um marcador bioquímico ideal deve ser eficiente não apenas na diferenciação entre a DA entre as demais formas de demência, mas também devem ser capazes de detectar precocemente as alterações indicativas da doença.

O estudo de propriedades plaquetárias, como modelo periférico de determinados processos cerebrais, tem sido realizado desde a década de 1950. Por exemplo, as plaquetas passaram a ser utilizadas largamente em na neurofarmacologia após a constatação de acúmulos apreciáveis de uma indolamina com propriedades neurotransmissoras em seus grânulos (posteriormente caracterizada como a própria serotonina) (Barradas e Mikhailidis, 1993). Desde então, inúmeros outros modelos foram propostos para a compreensão de processos metabólicos neuronais a partir da análise dos correlatos em plaquetas (Pandey et al., 2003; Meltzer et al., 1981).

As plaquetas têm a vantagem de serem de fácil obtenção a partir de amostras de sangue periférico. Contudo, alguns cuidados são

indispensáveis na coleta, manuseio e processamento das amostras, a fim de evitar a ativação plaquetária.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar, em plaquetas, determinadas características bioquímicas supostamente relacionadas à patogênese DA. Algumas dessas determinações já têm sido aventadas como candidatas a marcadores bioquímicos da doença em fluidos periféricos, como é o caso das proporções entre fragmentos de APP em grânulos plaquetários (Rosenberg et al., 1997; Di Luca et al., 1998) e, em situações específicas como os casos de DA familiar, a anisotropia de DPH em membranas plaquetárias (Zubenko et al., 1987b). Foram avaliadas as alterações no processamento da proteína precursora do amilóide (APP) utilizando-se a técnica de Western Blotting, as alterações na fluidez da membrana pela leitura da anisotropia do DPH e as alterações na atividade da enzima fosfolipase A₂, determinada pelo ensaio radioenzimático.

Proteína precursora do amilóide

No presente estudo, a razão da APP 130-110 kDa em plaquetas estava diminuída na DA em comparação com controles ($p= 0,001$) e CCL ($p= 0,027$). Entre os grupos controle e CCL não houve diferenças. Os resultados das razões de APP deste estudo foram obtidos dividindo-se a densitometria relativa à banda de 130 kDa pela densitometria da banda de 110 kDa.

Estes resultados estão de acordo com os achados prévios de Rosenberg et al. (1997), Di Luca et al. (1998) e Borroni et al. (2002), que também encontraram diminuição na razão da APP 130-110 kDa em plaquetas de pacientes com DA em comparação com controles. Di Luca et al. (1998), encontraram valores médios de razão na ordem de 0,84 para grupo controle e 0,31 para Alzheimer ($p= 0,001$). Rosenberg et al. (1997) encontraram valores de razão da APP 130-110 kDa na ordem de 8,01 para controles e 5,7 para Alzheimer ($p= 0,002$). O estudo de Borroni et al. (2002) mostrou valor de razão da APP de 0,91 para controles e 0,46 para DA. Padovani et al. (2002) também avaliaram a razão da APP 130-110 kDa em plaquetas de indivíduos com CCL em comparação com controles, DA leve e DA moderada. Neste estudo, a razão da APP estava diminuída em DA moderada (0,44), em DA leve (0,49) e CCL (0,62) em comparação com controles (0,93), $p<0,001$. As diferenças nos valores das razões entre os diferentes estudos foram ocasionadas provavelmente por variações analíticas de cada protocolo. Nos resultados apresentados por Rosenberg, a imunoreatividade da banda de 130 kDa é dominante quando comparada com a banda de 110 kDa, já nos resultados apresentados por Di Luca, Borroni e Padovani (pesquisadores relacionados ao mesmo grupo), existe uma duplicação da banda de 110 kDa (106 e 110 kDa) e uma menor imunoreatividade da banda de 130 kDa.

Os mecanismos que levam a esta redução na razão da APP em plaquetas na DA ainda não são bem esclarecidos. Se o conteúdo de APP presente nas plaquetas corresponde a APP solúvel gerada pela α -secretase

(via não amiloidogênica), e este conteúdo está diminuído na DA, pode-se sugerir que a via secretória, não-amiloidogênica está reduzida em plaquetas de pacientes com DA, talvez devido a uma diminuição na atividade da α -secretase, ou um aumento na atividade da β -secretase, ou ambos. Neste caso, os níveis de APP em plaquetas refletem em um compartimento periférico as anormalidades intracerebrais do metabolismo da APP que ocorrem em pacientes com DA. Esta hipótese é suportada por recente trabalho de Tang et al. (2006) que mostrou diminuição da α -secretase, aumento da β -secretase e aumento do peptídeo β -amilóide em plaquetas de pacientes com DA em comparação com controles, também empregando a técnica de Western Blot.

A avaliação da APP solúvel (APPs) em líquido e tecido cerebral pela técnica Western Blot realizada por Palmert et al. (1989), demonstrou que tanto em líquido quanto em tecido cerebral (córtex, núcleo basal de Meynert, hipocampo e cerebelo) o ensaio de Western blot empregando anticorpos para a APP solúvel, detectou duas bandas: uma de APPs com 125 kDa, que mostrou possuir o domínio KPI e outra banda de APPs com 105 kDa, sem o domínio KPI, que provavelmente corresponderia a isoforma 695, que não é encontrada em plaquetas. Em plaquetas não foram realizados estudos conclusivos que permitam a compreensão das identidades das isoformas de APP correspondentes às bandas de 130 kDa e 110 kDa, sendo ainda necessários novos estudos analíticos que busquem determinar a estrutura destas espécies protéicas.

Di Luca et al. (1998) também demonstraram que as diferenças no padrão de APP em plaquetas de pacientes com DA não são resultado de diferenças na expressão da APP. Pois através de experimentos de RT-PCR (PCR-transcriptase reversa) a expressão de RNA mensageiro foi a mesma em todos os grupos estudados, até mesmo em casos de DA avançada, reforçando a hipótese que esta diminuição da razão da APP em plaquetas de pacientes com DA seja mesmo decorrência de alterações no metabolismo da APP.

Os valores da razão da APP também estavam correlacionados com parâmetros cognitivos como o MEEM ($r= 0,33$, $p= 0,003$), CAMCOG ($r= 0,37$, $p= 0,001$) e ainda com escore de memória do CAMCOG ($r= 0,38$, $p= 0,001$). Estes dados sugerem que a medida da razão da APP em plaquetas é eficiente na avaliação da gravidade da DA, tendo em vista que a diminuição da razão da APP reflete maior comprometimento cognitivo e consequentemente maior gravidade da doença.

Portanto, as anormalidades do processamento da APP, que levam ao acúmulo do peptídeo β -amilóide no cérebro de pacientes com DA, podem ser representadas em plaquetas. Se esta hipótese for provada correta, as determinações do metabolismo da APP em plaquetas podem contribuir para a pesquisa de marcadores periféricos para a DA. A medida da razão da APP 130-110kDa em plaquetas, preenche alguns requisitos críticos para a seleção de um candidato a biomarcador da DA, uma vez que as plaquetas são facilmente obtidas a partir de amostras de sangue, sendo necessários apenas alguns cuidados no manuseio e processamento.

Fluidez de membrana

Em relação ao método de anisotropia para a medida da fluidez de membranas totais de plaquetas, os resultados da padronização mostraram que o método é apropriado para avaliar diferenças entre os grupos, visto que as variações de uma mesma amostra são pequenas, tanto dentro do mesmo dia, quanto em dias separados (no máximo 2% intra-dia e no máximo 5,7 % entre-dias).

A anisotropia é inversamente proporcional à fluidez de membrana e os achados da literatura (Zubenko et al., 1987a, b, c; Zubenko et al., 1988 e Zubenko et al., 1999a, b) mostram que a diminuição da anisotropia em plaquetas de pacientes com a DA é apenas em relação à sonda fluorescente DPH (difetilhexatrieno) e não ao TMA-DPH (trimetilamino-DPH), significando que as alterações biofísicas que ocorrem na porção profunda de hidrocarbonetos não se estendem para a superfície da membrana celular, pois o DPH se liga apenas na porção hidrofóbica da membrana (na região profunda e rica em hidrocarbonetos), e o TMA-DPH na porção superficial e hidrofílica da membrana (Zubenko et al., 1999b).

Em relação à fluidez da membrana de plaquetas dos indivíduos envolvidos neste estudo, os resultados não mostraram diferenças significativas entre os grupos. As médias para controle (0,2225), CCL (0,2164) e DA (0,2151) foram semelhantes. Os resultados do presente trabalho corroboram achados anteriores, como o trabalho de Kukull et al. (1992), que também não encontraram diferenças na fluidez de membrana de plaquetas entre controles e DA, empregando o DPH, mesmo sendo

envolvidos no estudo um grande número indivíduos (95 pacientes com DA e 133 controles). Fernandes et al. (1999) também avaliaram a fluidez de membranas de plaquetas de pacientes com DA, subgrupados de acordo com o genótipo da apo E, e também não encontraram diferenças na fluidez de membrana das plaquetas dos pacientes com DA em comparação com controles, empregando tanto o TMA-DPH quanto o DPH.

De acordo com Zubenko et al. (1999a) o aumento na fluidez de membrana plaquetária encontrada por seu grupo estava relacionado com casos de Alzheimer familiar, sugerindo que as alterações nas membranas destes pacientes são um traço familiar estável transmitido verticalmente (Zubenko et al., 1987b). Se as alterações na fluidez de membrana de plaquetas estiverem relacionadas apenas com casos de DA familiar, talvez seja esta a razão pela qual nossas médias foram iguais entre os grupos, pois a grande maioria dos nossos pacientes eram casos de DA esporádico e senil, com exceção de apenas uma paciente com 44 anos, apresentando histórico de DA familiar pré-senil.

Estudos anteriores avaliaram a fluidez de membranas cerebrais na presença do peptídeo β -amilóide. Müller et al. (1995) mostraram uma significativa diminuição na fluidez de membranas cerebrais de ratos, de camundongos e membranas de linfócitos humanos, quando estas membranas foram tratadas com o peptídeo β -amilóide e a fluidez das membranas foi avaliada por meio da anisotropia do DPH. A fluidez de membranas cerebrais humanas também foi avaliada por Müller et al. (1998), onde membranas de córtex (parietal e frontal) foram tratadas com o peptídeo

β -amilóide, mostrando significativa diminuição na fluidez das membranas em comparação com controles (membranas sem o β -amilóide). No estudo de Müller et al. (1998) foram empregadas as sondas TMA-DPH e DPH, mostrando diminuição na fluidez tanto nas porções profundas da membrana quanto na porção superficial. A fluidez de membranas sinaptossomais de cérebro de ratos também foi avaliada e foi mostrado diminuição na fluidez quando estas membranas foram incubadas com o peptídeo β -amilóide e avaliada a anisotropia do DPH (Avdulov et al., 1997).

No presente trabalho, apesar da leitura da anisotropia do DPH não ter apresentado diferenças significativas entre os grupos avaliados, foi encontrada correlação positiva entre a anisotropia e a razão da APP 130-110 kDa ($r = 0,30$, $p = 0,01$), mostrando que a diminuição da razão da APP é acompanhada pelo aumento da fluidez de membrana, pois a anisotropia é o inverso da fluidez de membrana. Uma possível explicação para as alterações na fluidez de membranas em plaquetas na DA seria o aumento do peptídeo β -amilóide (Tang et al., 2006), implicando, provavelmente em alterações nas membranas celulares, que levariam ao aumento da fluidez de membranas. Os efeitos neurotóxicos do peptídeo β -amilóide estão provavelmente relacionados com a sinalização do Ca^{2+} celular e/ou com o *stress* oxidativo. Além disto, altas concentrações do peptídeo β -amilóide provocam fluxo de Ca^{2+} em bicamadas lipídicas de membranas artificiais, sugerindo alterações na estrutura da membrana (Müller et al., 2001). Contudo, no presente trabalho não foi encontrado aumento da fluidez de membranas em plaquetas no grupo DA, em comparação com CCL ou

controles, e os resultados desta correlação precisam ser cuidadosamente investigados, principalmente por mostrar-se contrário aos achados em tecidos cerebrais e modelos de membranas citados acima, onde ocorreu uma diminuição da fluidez de membrana após o tratamento com o peptídeo β -amilóide.

Fosfolipase A₂

Os resultados do presente estudo confirmaram os resultados anteriores de nosso grupo, ou seja, uma diminuição da atividade da PLA₂ em DA quando comparada com controles (Gattaz et al., 1995; Gattaz et al., 1996 e Gattaz et al., 2004). O método empregado para medir a atividade da enzima foi revisado e aprimorado para tornar possível a medida da atividade de grupos específicos da enzima (Talib e Gattaz, submetido para publicação). Empregando este novo método foi possível determinar a atividade da PLA₂ citosólica (cPLA₂), da PLA₂ independente de cálcio (iPLA₂) e da PLA₂ secretada (sPLA₂). A somatória das atividades dos três grupos foi chamada de PLA₂ total. As principais diferenças entre este método e o anterior, foram as quantidades de cálcio para cada um dos grupos (100 μ M para a cPLA₂, 5 mM para a sPLA₂ e 1 mM de EDTA para a iPLA₂) e o substrato marcado com ¹⁴C, que para a cPLA₂ e sPLA₂ foi a fosfatidilcolina com o ácido araquidônico na posição sn-2, e para a iPLA₂ foi empregada a fosfatidilcolina com a ácido palmítico na posição sn-2. O método anterior não diferenciava quanto ao substrato, sendo utilizada sempre a fosfatidilcolina

com o ácido araquidônico na posição sn-2, e quanto ao cálcio, sendo utilizado sempre 5 mM.

O resultado da atividade da PLA₂ mostrou diferenças significativas entre controle e DA para o grupo sPLA₂ (16,70 pMol.mg/min e 11,84 pMol.mg/min, respectivamente, p= 0,02), para a iPLA₂ (controle= 1,73 pMol.mg/min e DA= 1,32 pMol.mg/min, p= 0,047) e para a PLA₂ total (controle= 25,46 pMol.mg/min e DA= 19,04 pMol.mg/min, p= 0,018). A atividade da iPLA₂ também foi diferente entre o grupo CCL e DA (1,81 pMol.mg/min e 1,32 pMol.mg/min, respectivamente, p= 0,046). A cPLA₂ não apresentou nenhuma diferença entre os grupos. Nossos achados em plaquetas sugerem que a atividade total da PLA₂ foi devida principalmente à atividade da sPLA₂, que foi a predominante, com aproximadamente 63% da atividade total. A cPLA₂ correspondeu a 30% e a iPLA₂ aproximadamente 7% da atividade total.

De acordo com nossos resultados, as atividades da sPLA₂ e da iPLA₂ estão reduzidas na DA quando comparada com grupo controle, e além disto, a atividade da iPLA₂ foi a única que mostrou diminuição na DA quando comparada com CCL.

É crescente na literatura a evidência do envolvimento da PLA₂ em doenças neuropsiquiátricas, em especial a DA. As PLA₂ são importantes para várias funções celulares, mas principalmente para a manutenção dos fosfolípidos das membranas celulares e para a regulação da liberação de ácido araquidônico, um precursor de eicosanóides. Em tecido cerebral humano, a atividade da PLA₂ predominante é da iPLA₂, com sua atividade

correspondendo a cerca de 85% da atividade total de PLA₂ (Jardim, 2005). Contudo, no cérebro humano foi detectado também o RNA mensageiro (RNAm) de quatro subgrupos da sPLA₂ (Gelb et al., 2000; Suzuki et al., 2000). Adicionalmente, foi detectado o RNAm de três subgrupos da cPLA₂ em várias regiões cerebrais, como hipocampo, amígdala, substância negra, tálamo, núcleo subtalâmico, corpo caloso, lobo temporal, lobo frontal, pólo occipital, núcleo caudado, putamen e cerebelo (Sharp e White, 1993; Pickard et al., 1999; Song et al., 1999; Underwood et al., 1998).

Nossos resultados mostraram que em plaquetas, existe a predominância da atividade da sPLA₂ e que a iPLA₂ representa menos de 10% da atividade total da enzima. Geralmente, a sPLA₂ é secretada para o exterior da célula em resposta a algum estímulo pró-inflamatório. Na superfície externa da membrana ela libera o ácido araquidônico que será usado na produção de eicosanóides (Balsinde et al., 1999). A sPLA₂ está também envolvida com a agregação plaquetária e atribui-se essa ação na agregação das plaquetas à formação do ácido lisofosfatídico, que é um segundo mensageiro lipídico com potente ação na agregação plaquetária (Polgar et al., 1997; Snitko et al., 1997). O envolvimento da sPLA₂ na DA ainda não está descrito na literatura, principalmente em plaquetas, mesmo porque métodos com sensibilidade para separar os grupos da enzima são muito recentes na literatura. A diferenciação dos grupos com base no uso de inibidores específicos da atividade da PLA₂ não se mostrou eficiente em plaquetas, e inibidores como o BEL (bromo-enol lactona), que teoricamente é específico para a atividade da iPLA₂, em plaquetas também inibe a atividade

da sPLA₂, devido a grande predominância deste grupo da enzima nestas células. Novos estudos são necessários para maiores esclarecimentos quanto ao envolvimento de grupos específicos da PLA₂ na DA, em especial em relação à iPLA₂ e sPLA₂, que são dois grupos que não apresentam grande preferência ao ácido araquidônico na posição sn-2 do fosfolípide (Balsinde et al., 1999).

O grupo de iPLA₂ são os membros da superfamília PLA₂ mais recentemente descritos na literatura, e sua presença em plaquetas é ainda pouco estudada. Estas enzimas provavelmente não estão diretamente envolvidas na liberação do ácido araquidônico, mas sim no seu metabolismo e em particular na remodelação de ácidos graxos fosfolipídicos. Aparentemente a iPLA₂ participa da principal via de incorporação do ácido araquidônico e outros ácidos graxos nos fosfolípidos da membrana celular. Sugere-se que, por regular as reações de remodelação, a iPLA₂ possa influenciar na distribuição e concentração de ácido araquidônico entre os diferentes compartimentos celulares (Balsinde et al., 1999).

Fujita et al. (2000) sugeriram a participação da iPLA₂ na memória espacial após a observação de que o BEL, um potente inibidor da atividade da iPLA₂, quando injetado nos ventrículos cerebrais, piorava significativamente o desempenho de camundongos no teste de comportamento espontâneo alternado, medido no *Y maze*. Também na mesma linha, Schaeffer e Gattaz, (2005), encontraram que a redução da atividade da iPLA₂ e cPLA₂ na região CA1 do hipocampo prejudicou a

memória de curta e de longa duração em ratos, mostrando o envolvimento da iPLA₂ com aspectos cognitivos.

A atividade da iPLA₂ encontrada no presente estudo, também estava correlacionada com parâmetros cognitivos como o teste MEEM ($r= 0,24$, $p= 0,037$) e CAMCOG ($r= 0,24$, $p= 0,039$), sugerindo uma correlação deste grupo de PLA₂ com aspectos cognitivos da DA.

Os resultados do presente estudo quanto a PLA₂ são de interesse tendo em vista resultados anteriores de redução da atividade da enzima em cérebros *post-mortem* de pacientes com DA (Gattaz et al., 1995b) e também em plaquetas (Gattaz et al., 2004). Também foi demonstrada uma correlação entre a atividade reduzida da PLA₂ em DA e a gravidade da demência (Gattaz et al., 1996). Outros grupos também já demonstraram a diminuição da atividade da PLA₂ na DA em comparação com controles. Ross et al. (1998) encontraram redução na atividade da PLA₂ em tecido cerebral *post-mortem*, em especial no córtex e hipocampo de pacientes com DA, em comparação com controles. Talbot et al. (2000) também descreve diminuição da atividade da iPLA₂ em DA, contudo neste estudo foi avaliada uma variante frontal da DA, que difere da DA típica pela ocorrência de emaranhados neurofibrilares no córtex frontal tão intensos, ou mais intensos que os emaranhados neurofibrilares encontrados no córtex entorrinal (Johnson et al., 1999 citado por Talbot et al., 2000)*.

* Johnson JK, Head E, Kim R, Starr A, Cotman CW. Clinical e phatological evidence for a frontal variant of Alzheimer Disease. *Arch Neurol.* 1999; 56: 1233 – 1239.

Comprometimento cognitivo leve é um estágio limite ou transitório entre o envelhecimento normal e a demência (Petersen et al., 1999). O principal interesse em se estudar o CCL é tentar distinguir os pacientes que irão progredir para DA dos que não irão. Além disto, existe uma esperança de que a intervenção farmacológica neste estágio possa atrasar ou prevenir a progressão da DA. Por esta razão, muitas indústrias farmacêuticas estão realizando testes clínicos de fármacos para o tratamento da DA, como os inibidores da acetilcolinesterase, com pacientes diagnosticados como CCL (Morris et al., 2001).

A taxa de conversão de CCL para DA é em torno de 10 a 15% ao ano, contudo esta porcentagem pode variar muito, refletindo as diferenças nos critérios de diagnóstico, diferenças nos instrumentos de medida e também resultados obtidos em amostras pequenas (Petersen et al., 1999).

No presente estudo, o grupo CCL apresentou resultados próximos ao do grupo controle quanto à razão da APP e atividade da PLA₂. Apenas a atividade da sPLA₂ mostrou resultados do grupo CCL mais próximos do grupo DA (Controle= 16,70 pMol.mg/min, CCL= 13,33 pMol.mg/min e DA= 11,84 pMol.mg/min), mas de qualquer maneira, as diferenças entre o CCL e o grupo controle para sPLA₂ não foram significativas (p= 0,081). Assim, quanto aos parâmetros bioquímicos, não foi possível diferenciar o grupo CCL do grupo controle. Padovani et al. (2002) encontraram diferenças na razão da APP entre controles e CCL e entre controle e DA, contudo não encontraram diferenças entre CCL e DA, pois o grupo DA foi composto por indivíduos com DA leve ou moderado. No trabalho de Padovani et al. (2002),

o diagnóstico de CCL foi baseado nos critérios da Clínica Mayo, que são os mesmos critérios de Petersen et al. (1999). Contudo, uma vez que os valores da razão da APP 130-110 kDa dependem do estágio de evolução da patologia, uma possível especulação quanto ao fato de não encontramos diferenças entre controles e CCL, é que nosso grupo de CCL é composto de casos de declínios cognitivos sutis (escore de CAMCOG total de 92,7), incorrendo em um tempo maior para a conversão para DA. Um estudo de seguimento deste grupo CCL está em curso em nosso laboratório, e a avaliação prospectiva dos valores de razão da APP ajudará a determinar seu valor prognóstico.

Quanto aos parâmetros cognitivos, o grupo CCL também foi semelhante ao grupo controle, o que era esperado, uma vez que este grupo é bastante heterogêneo, sendo composto por 28% de indivíduos com CCL amnésico, 28% com CCL não-amnésico e 44% com CCL múltiplas funções. A associação entre CCL e DA é melhor definida para CCL com um ou múltiplos domínios amnésicos (Petersen et al., 2005). Além disto, os indivíduos portadores de CCL, de um modo geral, apresentam bom desempenho nas avaliações por MEEM e CAMCOG, incorrendo no efeito teto, onde os testes perdem poder de distinção, sendo necessária uma cuidadosa avaliação neuropsicológica para um diagnóstico mais preciso. É também válido ressaltar que CCL ainda não é bem estabelecido como uma entidade clínica distinta, dada sua heterogeneidade biológica e neuropsicológica.

Estudos longitudinais, neuropatológicos e estudos de marcadores biológicos sugerem que o diagnóstico de CCL está associado com maiores riscos de desenvolvimento de demências. Os estudos de marcadores biológicos para DA ou CCL com resultados mais consistentes foram realizados em líquido (Hansson et al., 2006; Hampel et al., 2004; Maruyama et al., 2001), onde foram avaliados a proteína *Tau* (total e fosforilada) e o peptídeo β -amilóide por diferentes métodos analíticos. Contudo, para a obtenção do líquido é necessário punção lombar, um método invasivo que ainda não é aprovado em muitos países para este propósito. Desta maneira, um marcador periférico, facilmente obtido como amostras de sangue, seria muito útil para o diagnóstico da DA na prática clínica.

6 CONCLUSÕES

1. A fluidez de membrana não apresentou nenhuma diferença entre os grupos, não sendo considerada um possível marcador bioquímico para a DA.

2. A razão das formas da APP com 130/110 kDa em plaquetas estava significativamente reduzida em DA quando comparada com controles e CCL.

3. A atividade da total da PLA₂ em plaquetas estava reduzida em DA quando comparada com controles, assim como a atividade da sPLA₂, confirmando resultados anteriores do grupo.

4. A atividade da iPLA₂ estava reduzida em DA quando comparada com controles e com CCL.

5. A anisotropia do DPH estava correlacionada com a razão das formas da APP com 130/110 kDa em plaquetas.

6. A APP e iPLA₂ estavam correlacionadas com parâmetros cognitivos como o MEEM e CAMCOG, e a APP também estava correlacionada com os escores de memória do CAMCOG.

7 ANEXOS

7.1 Resultados individuais da razão da APP, da anisotropia e da atividade da PLA₂ em plaquetas dos indivíduos envolvidos no estudo:

7.1.1 Resultados individuais da razão da APP:

Tabela 6. Descrição das amostras envolvidas e resultados do ensaio de Western Blot da APP.

Paciente	Diagnóstico	Idade (anos)	Sexo	Razão APP 130/110 kDa	CV (%)
3	CCL	65	F	1,26	15,00
4	CCL	74	M	1,29	12,06
6	Controle	72	F	1,46	5,72
7	Controle	76	F	1,15	4,92
9	CCL	73	F	1,54	0,92
10	Controle	72	F	1,15	13,53
11	CCL	68	F	1,20	7,07
12	CCL	71	M	1,47	15,01
13	DA	79	M	0,99	12,20
15	DA	82	F	0,87	7,36
16	DA	85	F	1,21	4,68
17	CCL	70	M	1,21	3,51
19	DA	73	M	0,90	6,81
20	CCL	69	F	1,48	4,31
21	CCL	70	F	1,14	14,90

Paciente	Diagnóstico	Idade (anos)	Sexo	Razão APP 130/110 kDa	CV (%)
22	CCL	70	F	0,83	6,00
23	CCL	74	F	0,98	3,63
25	Controle	82	F	0,93	7,60
28	DA	75	M	0,90	0,79
29	CCL	64	F	1,13	0,31
30	DA	44	F	1,05	6,09
31	CCL	69	M	1,14	9,35
32	DA	66	F	1,14	3,72
34	CCL	78	F	1,47	13,03
35	CCL	70	F	1,16	4,88
36	DA	78	F	1,14	1,87
37	CCL	68	F	1,48	15,02
38	DA	80	F	0,61	6,96
39	CCL	71	F	1,13	10,01
40	DA	74	F	1,25	4,84
41	DA	76	F	1,06	4,00
42	CCL	63	F	1,22	11,59
43	CCL	69	F	1,17	7,89
44	Controle	84	M	1,10	4,52
45	DA	80	F	1,05	6,09
46	Controle	58	F	1,16	4,88
47	Controle	68	F	1,28	7,21
48	DA	80	F	0,81	13,18
49	Controle	72	F	1,18	7,19
50	Controle	65	F	1,01	3,52
51	Controle	69	M	1,40	13,98

Paciente	Diagnóstico	Idade (anos)	Sexo	Razão APP 130/110 kDa	CV (%)
52	Controle	66	F	1,19	2,91
53	Controle	67	M	1,26	14,59
54	Controle	66	M	1,36	2,08
55	CCL	74	M	1,22	2,32
56	CCL	66	F	0,91	13,99
59	DA	70	M	1,00	4,97
61	CCL	62	F	0,86	3,29
62	DA	63	F	0,87	15,06
63	Controle	73	F	0,88	0,66
64	Controle	70	F	1,29	7,98
65	DA	70	M	1,29	4,03
66	DA	90	M	1,27	12,25
67	Controle	65	F	1,72	11,96
68	Controle	67	F	1,52	10,73
69	DA	77	DA	1,47	6,73
70	Controle	64	M	0,95	15,04
71	Controle	68	F	1,47	0,48
72	Controle	74	M	1,33	4,25
73	Controle	67	F	1,48	8,54
74	Controle	66	F	1,13	10,43
75	CCL	69	F	1,26	12,96
76	Controle	76	F	1,52	13,96
77	Controle	63	F	1,20	2,96
78	Controle	76	F	1,47	13,03
79	DA	70	M	0,93	10,64
80	CCL	88	M	0,79	5,09

Paciente	Diagnóstico	Idade (anos)	Sexo	Razão APP 130/110 kDa	CV (%)
82	DA	81	F	0,68	14,50
83	Controle	79	M	1,00	9,90
84	CCL	77	M	0,98	2,89
85	CCL	80	M	1,11	14,01
86	Controle	73	F	1,31	7,04
87	DA	72	M	1,16	12,11
88	Controle	71	F	1,07	2,99
89	DA	76	F	0,90	13,10
90	Controle	66	F	0,91	8,59
91	DA	71	M	0,77	14,69

CV= coeficiente de variação; CCL= comprometimento cognitivo leve; DA= doença de Alzheimer; F= sexo feminino e M= sexo masculino

7.1.2 Resultados individuais da medida da fluidez de membrana

Tabela 7. Resultados individuais da medida da fluidez de membrana de plaquetas nos pacientes envolvidos no estudo.

Paciente	Diagnóstico	Idade (anos)	Sexo	Anisotropia*	CV (%)
3	CCL	65	F	0,2178	0,40
4	CCL	74	M	0,2224	1,08
5	Controle	71	F	0,2255	1,46
6	Controle	72	F	0,2152	1,26
7	Controle	76	F	0,2047	2,57
10	Controle	72	F	0,2108	0,55

Paciente	Diagnóstico	Idade (anos)	Sexo	Anisotropia*	CV (%)
11	CCL	68	F	0,1978	1,17
12	CCL	71	M	0,2039	4,01
13	DA	79	M	0,2019	2,45
15	DA	82	F	0,2121	0,49
16	DA	85	F	0,2063	2,86
17	CCL	70	M	0,2046	1,09
19	DA	73	M	0,1858	1,32
20	CCL	69	F	0,2000	0,70
21	CCL	70	F	0,2118	1,00
22	CCL	70	F	0,2059	1,62
23	CCL	74	F	0,1995	2,14
25	Controle	82	F	0,1814	2,05
28	DA	75	M	0,1997	0,84
29	CCL	64	F	0,2027	0,72
30	DA	44	F	0,2031	3,10
31	CCL	69	M	0,2031	2,51
32	DA	66	F	0,2196	1,09
34	CCL	78	F	0,2315	1,02
35	CCL	70	F	0,2375	0,93
36	DA	78	F	0,2383	1,63
37	CCL	68	F	0,2347	0,56
38	DA	80	F	0,1968	1,82
39	CCL	71	F	0,2420	1,93
40	DA	74	F	0,2322	2,07
41	DA	76	F	0,2360	0,64
42	CCL	63	F	0,2286	1,82

Paciente	Diagnóstico	Idade (anos)	Sexo	Anisotropia*	CV (%)
43	CCL	69	F	0,2372	0,85
44	Controle	84	M	0,2370	0,27
45	DA	80	F	0,2372	0,57
46	Controle	58	F	0,2421	0,44
47	Controle	68	F	0,2419	0,48
48	DA	80	F	0,2274	1,35
49	Controle	72	F	0,2421	1,95
50	Controle	65	F	0,2226	1,69
51	Controle	69	M	0,2299	0,25
52	Controle	66	F	0,2440	0,98
53	Controle	67	M	0,2237	1,51
54	Controle	66	M	0,2389	1,17
55	CCL	74	M	0,2322	0,05
56	CCL	66	F	0,2268	1,26
59	DA	70	M	0,2361	1,65
61	CCL	62	F	0,2172	2,79
62	DA	63	F	0,2357	0,33
63	Controle	73	F	0,2394	1,26
64	Controle	70	F	0,2343	0,37
65	DA	70	M	0,2204	0,44
66	DA	90	M	0,2261	1,56
67	Controle	65	F	0,2387	0,34
68	Controle	67	F	0,2333	2,66
69	DA	77	DA	0,2258	0,52
70	Controle	64	M	0,2541	2,30
71	Controle	68	F	0,2065	4,22

Paciente	Diagnóstico	Idade (anos)	Sexo	Anisotropia*	CV (%)
72	Controle	74	M	0,2112	2,59
73	Controle	67	F	0,2204	2,50
74	Controle	66	F	0,2110	3,91
75	CCL	69	F	0,2096	1,24
76	Controle	76	F	0,2175	1,59
77	Controle	63	F	0,2067	3,85
78	Controle	76	F	0,2208	0,83
79	DA	70	M	0,1844	1,44
80	CCL	88	M	0,2099	1,90
82	DA	81	F	0,2059	2,97
83	Controle	79	M	0,1989	1,06
84	CCL	77	M	0,2070	0,68
85	CCL	80	M	0,2108	2,74
86	Controle	73	F	0,2002	1,96
87	DA	72	M	0,2070	1,09
88	Controle	71	F	0,2046	2,78
89	DA	76	F	0,1984	3,06
90	Controle	66	F	0,2179	2,84
91	DA	71	M	0,2118	0,40

* = valor da anisotropia do DPH foi resultado da média de triplicata; CV = coeficiente de variação da média das triplicatas; F= sexo feminino e M= sexo masculino.

7.1.3 Resultados individuais da medida da atividade da PLA₂

Tabela 8. Resultados individuais da medida da atividade da PLA₂. A atividade da PLA₂ apresentada está em pMol.mg/mL.

Paciente	Diagnóstico	Idade (anos)	Sexo	iPLA ₂	cPLA ₂	sPLA ₂	PLA ₂ Total
3	CCL	65	F	1,83	5,84	5,87	13,54
4	CCL	74	M	2,14	6,70	8,54	17,38
5	Controle	71	F	2,22	2,65	6,14	11,01
6	Controle	72	F	2,08	7,05	8,14	17,27
7	Controle	76	F	1,95	6,11	7,71	15,77
9	CCL	73	F	2,34	8,36	8,85	19,55
10	Controle	72	F	1,48	6,95	7,64	16,06
11	CCL	68	F	2,58	7,99	11,53	22,10
12	CCL	71	M	2,73	2,73	8,05	13,51
13	DA	79	M	0,86	3,38	3,01	7,25
15	DA	82	F	1,09	5,95	7,14	14,18
16	DA	85	F	0,33	5,16	5,95	11,44
17	CCL	70	M	2,41	5,05	11,27	18,73
19	DA	73	M	0,80	6,12	10,81	17,73
20	CCL	69	F	2,04	2,70	8,18	12,92
21	CCL	70	F	1,94	2,30	5,89	10,13
22	CCL	70	F	1,93	2,81	8,77	13,51
23	CCL	74	F	3,07	2,93	9,43	15,46
25	Controle	82	F	1,94	3,60	11,43	16,97
28	DA	75	M	1,64	2,61	5,99	10,24
29	CCL	64	F	3,02	4,52	11,99	19,53
30	DA	44	F	1,83	10,89	1,83	10,89
31	CCL	69	M	2,65	2,97	8,42	14,04
32	DA	66	F	2,60	3,42	4,69	10,98
35	CCL	70	F	1,04	6,88	22,07	29,99
36	DA	78	F	2,31	5,44	8,46	16,21
37	CCL	68	F	1,13	2,76	14,73	18,62
38	DA	80	F	2,35	5,40	7,00	14,75

Paciente	Diagnóstico	Idade (anos)	Sexo	iPLA ₂	cPLA ₂	sPLA ₂	PLA ₂ Total
39	CCL	71	F	1,29	5,41	20,67	27,37
40	DA	74	F	2,61	6,53	8,62	17,76
41	DA	76	F	1,40	4,12	18,93	24,45
42	CCL	63	F	1,54	4,28	16,27	22,09
43	CCL	69	F	1,45	6,48	16,51	24,44
44	Controle	84	M	1,49	8,02	1,49	8,02
45	DA	80	F	0,44	4,76	18,30	23,50
46	Controle	58	F	1,43	9,14	20,55	31,12
47	Controle	68	F	2,41	2,77	7,26	12,44
48	DA	80	F	0,21	8,82	33,17	42,20
49	Controle	72	F	1,78	8,08	26,49	36,35
50	Controle	65	F	1,54	8,37	22,58	32,49
51	Controle	69	M	2,65	6,74	13,91	23,30
52	Controle	66	F	2,57	7,96	7,96	18,49
53	Controle	67	M	3,44	3,03	6,05	12,52
54	Controle	66	M	1,03	4,36	20,34	25,73
55	CCL	74	M	2,53	13,22	13,22	28,97
59	DA	70	M	1,40	4,00	14,00	19,40
63	Controle	73	F	0,68	6,20	24,73	31,61
64	Controle	70	F	1,42	5,82	23,14	30,38
65	DA	70	M	1,49	1,26	4,22	6,97
66	DA	90	M	0,68	3,18	3,18	7,04
67	Controle	65	F	2,11	8,05	16,50	26,66
68	Controle	67	F	2,11	5,51	12,93	20,55
69	DA	77	DA	2,50	7,29	17,94	27,73
70	Controle	64	M	3,16	3,48	17,59	24,23
71	Controle	68	F	1,74	12,91	22,22	36,87
72	Controle	74	M	0,76	18,81	25,74	49,95
73	Controle	67	F	0,36	12,77	15,77	23,31
74	Controle	66	F	0,54	19,08	18,49	27,19
75	CCL	69	F	0,58	12,46	20,57	33,61
76	Controle	76	F	0,98	4,05	13,45	18,48
77	Controle	63	F	1,17	7,59	21,07	29,83

Paciente	Diagnóstico	Idade (anos)	Sexo	iPLA ₂	cPLA ₂	sPLA ₂	PLA ₂ Total
78	Controle	76	F	1,30	9,44	21,45	32,19
79	DA	70	M	0,35	2,96	5,87	9,18
80	CCL	88	M	0,40	13,81	20,83	35,04
82	DA	81	F	0,80	12,35	17,25	30,40
83	Controle	79	M	1,10	13,47	24,49	39,06
84	CCL	77	M	0,71	14,86	30,03	45,60
85	CCL	80	M	0,51	6,79	11,44	18,74
86	Controle	73	F	1,10	7,33	19,33	27,76
87	DA	72	M	1,27	6,44	7,42	15,13
88	Controle	71	F	1,01	1,59	32,62	35,22
89	DA	76	F	0,95	11,03	19,64	31,62
90	Controle	66	F	1,32	5,06	12,46	18,84
91	DA	71	M	1,04	8,30	21,47	30,81

CCL= comprometimento cognitivo leve; DA= doença de Alzheimer; F= sexo feminino e M= sexo masculino

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andreasen N, Blennow K. β – amyloid (A β) protein in cerebrospinal fluid as a biomarker for Alzheimer's disease. *Peptides*. 2002; 23:1205 – 1214.

Army Individual Test Battery. *Manual of Directions and Scoring*. Washington: War Department, Adjunt General's Office Trail.1944.

Avdulov NA, Chochina SV, Igbavboa U, O'Hare EO, Schroeder F, Cleary JP Wood WG. Amyloid β -peptides increase annular and bulk fluidity and induce lipid peroxidation in brain synaptic plasma membranes. *Journal of Neurochemistry*. 1997; 68(5): 2086 – 2091.

Barradas MA, Mikhailidis DP. The use of platelets as models for neurons: possible applications to the investigation of eating disorders. *Biomed & Pharmacother*. 1993; 47: 11 – 18.

Bazan NG, Colangelo V, Lukiw WJ. Prostaglandins and other lipid mediators in Alzheimer's disease. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*. 2002; 68-69: 197 – 210.

Bazan NG, Zorumski CF, Clark GD. The activation of phospholipase A₂ and release of arachidonic acid and other lipid mediators at the synapse: The role of platelet activating factor. *J Lipid Mediators*. 1993; 6: 421 – 427.

Blessed G, Tomlinson BE, Roth M. The Association between Quantitative Measures of Dementia and of Senile Change in the Cerebral Grey Matter of Elderly Subjects. *Br J Psychiatry*. 1968; 114: 797 – 811.

Bondy SC, Mckee M, Davoodbhoy YM. Prevention of chemically induced changes in synaptosomal membrane order by ganglioside GM1 and alpha-tocopherol, *Biochim Biophys Acta*. 1990; 1026: 213-219.

Borroni B, Colciaghi F, Corsini P, Akkawi N, Rozzini L, Del Zotto E, Talarico G, Cattabeni F, Lenzi GL, Di Luca M, Padovani A. Early stages of probable Alzheimer disease are associated with changes in platelets amyloid precursor protein forms. *Neurol Sci*. 2002; 23: 207 – 210.

Bottino CMC, Almeida OP, Tamai S, Forlenza OV, Scalco MZ, Carvalho IAM. CAMDEX - *Entrevista Estruturada para Diagnóstico de Transtornos Mentais*

em Idosos. Edição brasileira (tradução e adaptação para o português). Cambridge: Cambridge University Press; 1999.

Brucki SMD. Curso clínico da Doença de Alzheimer. In: Forlenza OV, Caramelli P, editores. *Neuropsiquiatria Geriátrica*. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 119 – 128.

Burns A, Zaudig M. Mild cognitive impairment in older people. *The Lancet*. 2002; 360: 1963 – 1965.

Bush AI, Tanzi RE. Alzheimer disease-related abnormalities of amyloid β precursor protein isoforms in the platelet [editorial]. *Arch Neurol*. 1998; 55: 1179 – 1180.

Buxbaum JD, Liu KN, Lio Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castern BJ, Cerretti DP, Black RA. Evidence that tumor necrosis factor α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid precursor protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273 (43): 27765 – 27767.

Capell A, Beher D, Prokop S, Steiner H, Kaether C, Shearman MS, Haass C. γ -secretase complex assembly within the early secretory pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280 (8): 6471 – 6478.

Caramelli P, Nitrini R. Conduta diagnóstica em demência. In: Forlenza OV, Almeida OP, editores. *Depressão e Demência no Idoso*. São Paulo: Lemos; 1997. 107 – 119.

Caramelli P. Neuropatologia da Doença de Alzheimer. In: Forlenza OV, Caramelli P, editores. *Neuropsiquiatria Geriátrica*. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 107 – 118.

Cattebeni F, Colciaghi F, Di Luca M. Platelets provide tissue to unravel pathogenic mechanisms of Alzheimer disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2004; 28: 763 – 770.

Cho HW, Kim JH, Choi S, Kim HJ. Phospholipase A_2 is involved in muscarinic receptor-mediated sAPP α release independently of cyclooxygenase or lipoxygenase activity in SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters*. 2006; 397: 214 – 218.

- Daly IV J, Lahiri DK, Justus DE, Kotwal GJ. Detection of the membrane-retained carboxy-terminal tail containing polypeptides of the amyloid precursor protein in tissue from Alzheimer's disease brain. *Life Science*. 1998; 63 (23): 2121 – 2131.
- Davies TA, Long HJ, Sgro K, Rathbun WH, Mcmenamin ME, Seetoo K, Tibbles H, Billingslea AM, Fine RE, Fishman JB, Levesque CA, Smith SJ, Wells JM, Simons ER. Activated Alzheimer disease platelets retain more beta amyloid precursor protein. *Neurobiology of aging*. 1997; 18 (2): 147 – 153.
- De Strooper B, Woodgett, J. Mental plaque removal. *Nature*. 2003; 423: 392 – 393.
- Di Luca M, Colciaghi F, Pastorino L, Borroni B, Padovani A, Cattabeni F. Platelets as a peripheral district were to study pathogenetic mechanisms of Alzheimer disease: the case of amyloid precursor protein. *European Journal of Pharmacology*. 2000; 405: 277 – 283.
- Di Luca M, Grossi E, Borroni B, Zimmermann M, Marcello E, Colciaghi F, Gardoni F, Intraligi M, Padovani A, Buscema M. Artificial neural networks allow the use of simultaneous measurements of Alzheimer Disease markers for early detection of disease. *Journal of Translational Medicine*. 2005; 3:30.
- Di Luca M, Pastorino L, Bianchetti A, Perez J, Viagnolo LA, Lenzi GL, Trabucchi M, Cattabeni F, Padovani A. Differential level of platelet amyloid β precursor protein isoforms – an early marker for Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 1998; 55: 1195 – 1200.
- Di Luca M, Pastorino L, Cattabeni F, Zanardi R, Scarone S, Racagni G, Smeraldi E, Perez J. Abnormal pattern of platelet APP isoforms in Alzheimer disease and Down Syndrome. *Arch Neurol*. 1996; 53: 1162 – 1166.
- Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders. 4th ed. Washington: American Psychiatric Association (APA); 1994.
- Diaz-Arrastia R. New biochemical markers in Alzheimer Disease [editorial]. *Arch Neurol*. 2001; 58: 354 – 356.
- Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesld B, Steiner H, Haass C. Reconstitution of gamma-secretase activity [abstract]. *Nat Cell Biol*. 2003; 5 (5): 486 – 488.

Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer β -amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *The Journal of Cell Biology*. 2003; 160 (1): 113 – 123.

Emmerling MR, Moore CJ, Doyle D, Carroll RT, Davis RE. Phospholipase A₂ activation influences the processing and secretion of the amyloid precursor protein. *Biochemical and biophysical Research Communications*. 1993; 197: 292 – 297.

Erzigkeit, H. The Development of the SKT Project. In: I. Hindmarch, H. Hippus And G. K. Wilcock, editors. *Dementia: Molecules, Methods and Measures*. Chichester, England: Wiley; 1991. p. 101 – 108.

Farooqui AA, Hirashima Y, Horrocks LA, Brain phospholipases and their role in signal transduction. In: Bazan NG, Murphy MG, Tofano G, editores. *Neurobiology of Essential Fatty Acids*. New York: Plenum Press; 1992. 11 – 26.

Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2000; 106: 1 – 29.

Farooqui AA, Horrocks LA. Involvement of glutamate receptors, lipases and phospholipases in long term potentiation and neurodegeneration. *J Neurosci Res*. 1994; 38: 6 – 11.

Farooqui AA, Litsky ML, Farooqui T, Horrocks LA. Inhibitors of intracellular phospholipase A₂ activity: Their neurochemical effects and therapeutical importance for neurological disorders. *Brain Res Bull*. 1999; 49: 139 – 153.

Fenton Ws, Hibbeln J, Knable M. Essential fatty acids, lipid membrane abnormalities, and the diagnosis and treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2000; 47: 8 – 21.

Fernandes MAS, Proença MT, Nogueira AJA, Oliveira LMV, Santiago B, Santana I, Oliveira CR. Effects of apolipoprotein E genotype on blood lipid composition and membrane platelet fluidity in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999; 1454: 89 – 96.

Flaks MK, Yassuda MS, Regina ACB, Cid AG, Camargo CHP, Gattaz WF, Forlenza OV. The Short Test (SKT) - A Transcultural Test for Early Detection and Discrimination of Dementia: A Preliminary Study in Brazil. *Int Psychogeriatr*. 2006; 18:121 – 133.

Flesch I, Schmidt B, Ferber E. Acyl chain specificity and kinetic properties of phospholipase A1 and A2 of bone marrow-derived macrophages. *Z Naturforsch (C)*. 1985; 40(5-6): 356-63.

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*. 1975; 12 (3): 189 – 198.

Folstein MF, Folstein SE, Mchugh PR. Mini-Mental State: A Practical Method for Grading the Cognitive State of Patients for the Clinician. *J Psychiatr Res*. 1975; 12:189 – 198.

Francis P, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999; 66: 137 – 147.

Fujita S, Ikegaya Y, Nishiyama N, Matsuki N. Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 inhibitors impairs spatial memory of mice. *Jpn J Pharmacol*. 2000; 83: 277 – 278.

Fuld P. Guaranteed Stimulus Processing in the Evaluation of Memory and Learning. *Cortex*. 1980; 16(2): 255 – 71.

Gattaz WF, Cairns NJ, Levy R, Forstl H, Braus DF, Maras A. Decreased phospholipase A_2 activity in the brain and in platelets of patients with Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1996; 246: 129 – 131.

Gattaz WF, Forlenza OV, Talib LL, Barbosa NR, Bottino CM. Platelet phospholipase A_2 activity in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *J Neural Transm*. 2004; 111 (5): 591 – 601.

Gattaz WF, Köllisch M, Thuren T, Virtanen JA, Kinnunen PKJ. Increased plasma phospholipase A_2 activity in schizophrenic patients: reduction after neuroleptic therapy. *Biol Psychiatry*. 1987; 22: 421 – 426.

Gattaz WF, Maras A, Cairns NJ, Levy R, Förstl H. Decreased phospholipase A_2 activity in Alzheimer brains. *Biol Psychiatry*. 1995(b); 37: 13 – 17.

Gattaz WF, Steudle A, Maras A. Increased platelet phospholipase A_2 in schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 1995(a); 16: 1 – 6.

Gelb MH, Valentin E, Ghomashchi F, Lazdunski M, Lambeau G. Cloning and recombinant expression of a structurally novel human secreted phospholipase A2. *J Biol Chem.* 2000b; 275(51): 39823 – 39826.

Haass C, Selkoe DJ. Cellular processing of β -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid β -peptide. *Cell.* 1993; 75: 1039 - 1042.

Haass C. Take five-Bace and the γ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid β -peptide generation. *The EMBO Journal.* 2004; 23 (3): 483 – 488.

Hachinski VC, Iliff LD, Zihkla E, Du Boulay GH, McAllister VL, Marshall J, Russel RW, Symon L. Cerebral Blood Flow in Dementia. *Arch Neurol.* 1975; 32: 632 – 637.

Hamilton M. A Rating Scale for Depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1960; 23: 56 – 62.

Hempel H, Teipel SJ, Fuchsberger T, Andreasen N, Wiltfang J, Otto M, Shen Y, Dodel R, Du Y, Farlow M, Möller H-J, Blennow K, Buerger K. Value of CSF beta-amyloid₁₋₄₂ and tau as predictors of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Molecular Psychiatry.* 2004; 9: 705 – 710.

Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos L, Blennow K, Minthon L. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurology.* 2006; 5(3): 228 – 234.

Helisalmi S. *Molecular genetics of Alzheimer's disease with special emphasis on presenilin, amyloid beta precursor protein and apolipoprotein E genes* [tese online]. Finland: Department of Neurology, University of Kuopio; 1998 [citado 23 de Janeiro de 1998]. Disponível em: <http://www.uku.fi/neuro/44the.htm>

Herrera E Jr, Caramelli P, Silveira ASB, Nitrini R. Epidemiologic survey of dementia in a Community-dwelling brazilian population. *Alzheimer Disease and Associated Disorders.* 2002; 16(2): 103 – 108.

Holmsen H. Signal transducing mechanisms in platelets. *Proceedings of the National Science Council.* 1991; 15 (3): 147 – 152.

Irizarry MC. Biomarkers of Alzheimer Disease in plasma. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics.* 2004; 1 (2): 226 – 234.

Jameson L, Frey T, Zeeberg B, Dalldorf F, Caplow M. Inhibition of microtubule assembly by phosphorylation of microtubule-associated proteins [abstract]. *Biochemistry*. 1980; 19 (11): 2472 – 2479.

Jardim LSA. Efeitos da atividade da fosfolipase A2 nos receptores dopaminérgicos: implicações para a esquizofrenia [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

Jenkins SM, Johnson VW. Modulation of Tau phosphorylation within its microtubule-binding domain by cellular thiols. *Journal of Neurochemistry*. 1999; 73: 1843 – 1850.

Johnston JA, Liu WW, Todd SA, Coulson DTR, Murphy S, Irvine GB, Passmore AP. Expression and activity of β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme in Alzheimer's disease. *Biochemical Society Transactions*. 2005; 33 (parte 5): 1096 – 1100.

Jorm AF, Jacomb PA. The Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly: Sociodemographics Correlates, Reliability, Validity and Some Norms. *Psychol Med*. 1989; 19: 1015 – 1022.

Kaether C, Schmitt S, Michael W, Haass C. Amyloid precursor protein and Notch intracellular domains are generated after transport of their precursors to the cell surface. *Traffic*. 2006; 7: 408 – 415.

Koo EH. The β -amyloid precursor protein (APP) and Alzheimer's disease: Does the tail wag the dog? *Traffic*. 2002; 3: 763 – 770.

Kukull WA, Hinds TR, Schellenberg GD, Belle Gv, Larson EB. Increased platelet membrane fluidity as a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurology*. 1992; 42: 607 – 614.

Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F. Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci*. 1999; 96: 3922 – 3927.

Lehrner J, Gufler R, Guttman G, Maly J, Gleib A, Auff E, Dal-Bianco P. Annual conversion to Alzheimer disease among patients with memory complaints attending an outpatient memory clinic: the influence of amnesic mild cognitive impairment and the predictive value of neuropsychological testing. *Wien Klin Wochenschr*. 2005; 117/18: 629 – 635.

Li QX, Whyte S, Tanner JE, Evin G, Beyreuther K, Masters CL. Secretion of Alzheimer's disease A β amyloid peptide by activated human platelets. *Laboratory Investigation*. 1998; 78 (4): 461 – 469.

Lindwall G, Cole RD. The purification of *Tau* protein and the occurrence of two phosphorylation states of *Tau* in brain. *The Journal of Biological Chemistry*. 1984; 259 (19): 12241 – 12245.

Loveman E, Green C, Kirby J, Takeda A, Picot J, Payne E, Clegg A. The clinical and cost-effectiveness of donepezil, rivastigmine, galantamine and memantine for Alzheimer's disease. *Health Technology Assessment*. 2006; 10 (1): 1 – 160.

Lovestone S. A patogênese molecular da Doença de Alzheimer. In: Forlenza OV, Caramelli P, editores. *Neuropsiquiatria Geriátrica*. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 467 – 477.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ . Protein measurement with the folin-phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 1951;193: 265-275.

Markesbery WR, Schmitt FA, Kryscio RJ, Davis DG, Smith CD, Wekstein DR. Neuropathologic substrate of mild cognitive impairment [abstract]. *Arch Neurol*. 2006; 63 (1): 38 – 46.

Maruyama M, Arai H, Sugita M, Tanji H, Higuchi M, Okamura N, Matsui T, Higuchi S, Matsushita S, Yoshida H, sasaki H. Cerebrospinal fluid amyloid β_{1-42} levels in the mild cognitive impairment stage of Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*. 2001; 172: 433–439.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical Diagnosis of Alzheimer Disease: Report of NINCDS-ADRDA Work Group under the Auspices of Department of Health and Human Service Task Force on Alzheimer Disease. *Neurology*. 1984; 34: 939-944.

Meltzer HY, Arora RC, Baber R, Tricou Bj. Serotonin uptake in blood platelets of psychiatric patients. [Abstract] *Arch Gen Psychiatry*. 1981; 38(12): 1322-6.

Mohs RC, Haroutunian V. Alzheimer disease: from earliest symptoms to end stage. In: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C, editores. *Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress*. American College of Neuropsychopharmacology; 2002. 1189 – 1197.

Morris JC, et al. Mild Cognitive Impairment represents early-stage Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2001; 58: 397 – 405.

Morris JC. Mild cognitive impairment is early-stage Alzheimer Disease [editorial]. *Arch Neurol.* 2006; 63 (1): 15 – 16.

Müller WE, Eckert GP, Scheuer K, Carins NJ, Maras A, Gattaz WF. Effects of β -amyloid peptides on the fluidity of membranes from frontal and parietal lobes of human brain. High potencies of A β 1-42 and A β 1-43. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest.* 1998; 5: 10 – 15.

Müller WE, Kirsch C, Eckert GP. Membrane-disordering effects of β -amyloid peptides. *Biochemical Society Transactions.* 2001; 29: 617 – 623.

Müller WE, Koch S, Scheur K, Rostock A, Bartsch R, Effects of piracetam on membrane fluidity in the aged mouse, rat, and human brain. *Biochem Pharmacol.* 1997a, 53 (2): 135 – 40.

Müller WE, Kock S, Eckert A, Hartmann H, Scheuer K. β -amyloid peptide decreases membrane fluidity. *Brain Reserch.* 1995; 674: 133 – 136.

Oliveira R, Schmidt S L. *Teste Comportamental de Memória de Rivermead.* Rio de Janeiro: Cognição; 1999.

Padovani A, Borroni B, Colciaghi F, Pastorino L, Archetti S, Cottini E, Caimi L, Cattabeni F, Di Luca M. Platelet amyloid precursor protein forms in AD: a peripheral tool and a pharmacological target. *Mechanisms of Ageing and Development.* 2001 (b); 122: 1997 – 2004.

Padovani A, Borroni B, Colciaghi F, Pettenati C, Cottini E, Agosti C, Lenzi GL, Caltagirone C, Trabucchi M, Cattabeni F, Di Luca M. Abnormalities in the pattern of platelet amyloid precursor protein forms in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2002; 59: 71 – 75.

Padovani A, Pastorino L, Borroni B, Colciaghi F, Rozzini L, Monastero R, Perez J, Pettenati C, Mussi M, Parrinello G, Cottini E, Lenzi GL, Trabucchi M, Cattabeni F, Di Luca M. Amyloid precursor protein in platelets. A peripheral marker for the diagnosis of sporadic AD. *Neurology.* 2001 (a); 57: 2243 – 2248.

Palmert MR, Podlisny MB, Witker DS, Oltersdorf, Younkin LH, Selkoe DJ, Younkin SG. The β -amyloid protein precursor of Alzheimer disease has soluble derivatives found in human brain and cerebrospinal fluid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86: 6338 – 6342.

Pandey GN, Pandey SC, Ren X, Dwivedi Y, Janicak PG. Serotonin receptor in platelets of bipolar and schizoaffective patient effects of lithium treatment. [Abstract] *Psychopharmacology*. 2003; 170(2): 115-23.

Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol*. 1999; 56: 303 – 308.

Peterson GL. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem*. 1979; 100(2): 201-20.

Pettegrew, JW e Zubenko GS. Platelet membrane fluidity [letter]. *Neurology*. 1993; 43: 234 – 236.

Pickard RT, Striffler BA, Kramer RM, Sharp JD. Molecular cloning of two new human paralogs of 85-kDa cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem*. 1999; 274(13): 8823 – 8831.

Piomelli D. Arachidonic acid in cell signaling. *Current Opinion in Cell Biology*. 1993; 5: 274 – 280.

Pólgar J, Kramer RM, Um SL, Jakubowski JA, Clemetson KJ. Human group II 14 kDa phospholipase A₂ activates human platelets. *Biochemical Journal*. 1997; 327: 259 – 265.

Racchi M, Govoni S. The pharmacology of amyloid precursor protein processing. *Experimental Gerontology*. 2003; 38: 145 – 157.

Raffai RF, Weisgraber KH. Cholesterol: from heart attacks to Alzheimer's disease. *Journal of Lipid Research*. 2003; 44: 1423 – 1430.

Rapoport SI. In vivo fatty acid incorporation into brain phospholipids in relation to plasma availability, signal transduction and membrane remodeling. *J Mol Neurosci*. 2001; 16: 243 – 261.

Rosenberg RN, Baskin F, Fosmire JA, Risser R, Adams P, Svetlik D, Honig LS, Cullun MC, Weiner MF. Altered amyloid protein processing in platelets of patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 1997; 54: 139 – 144.

Ross MB, Moszczynska A, Erlich J, Kish SJ. Phospholipid-metabolizing enzymes in Alzheimer's disease: increased lysophospholipid acyltransferase activity and decreased phospholipase A₂ activity. *Journal of Neurochemistry*. 1998; 70: 786 – 793.

Ross MB, Turenne S, Moszczynska A, Warsh JJ, Kish SJ. Differential alteration of phospholipase A₂ activities in brain of patients with schizophrenia. *Brain Res.* 1999; 821: 698 – 709.

Roth M, Hopkins B. Psychological Test Performance in Patients Over 60. I. Senile Psychosis and Affective Disorders of Old Age. *J Ment Sci.* 1953; 99: 439 – 450.

Roth M, Tym E, Mountjoy CQ, Huppert FA, Hendrie H, Verma S, Goddard R. CAMDEX: A Standardized Instrument for the Diagnosis of Mental Disorders in the Elderly with Special Reference to Early Detection of Dementia. *Br J Psychiatry.* 1986; 149: 698 – 709.

Royall DR. Mild Cognitive Impairment and functional status [editorial]. *Journal of American Geriatrics Society.* 2006; 54: 163 – 165.

Sanchez MP, Alvarez-Tallada V, Avila J. The microtubule-associated protein tau in neurodegenerative diseases. Tauopathies [abstract]. *Rev Neurol.* 2001; 33 (2): 169 – 177.

Schaeffer EL, Gattaz WF. Inhibition of calcium-independent phospholipase A₂ activity in rat hippocampus impairs acquisition of short- and long-term memory. *Psychopharmacology (Berl).* 2005; 181 (2): 392 – 400.

Schaeffer, EL. A inibição da atividade da fosfolipase A₂ no hipocampo de ratos prejudica a formação da memória de curta e de longa duração: implicações para a Doença de Alzheimer [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2004.

Selkoe DJ. Alzheimer Disease: Mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann Intern Med.* 2004; 140: 627 – 638.

Selkoe DJ. Defining molecular targets to prevent Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2005; 62: 192 – 195.

Sharp JD, White DL. Cytosolic PLA₂: mRNA levels and potential for transcriptional regulation. *J Lipid Mediat.* 1993; 8(3): 183 – 189.

Simonato M. A pathogenetic hypothesis of temporal lobe epilepsy. *Pharmacol Res.* 1993; 27: 217 – 225.

Skovronsky DM, Lee VMY, Praticò D. Amyloid precursor protein and amyloid β peptide in human platelet. *The Journal of Biology Chemistry.* 2001; 276: 17036 – 17043.

Snitko Y, Yoon ET, Cho W. High specificity of human secretory class II phospholipase A2 for phosphatidic acid. *Biochemical Journal*. 1997; 321: 737 – 741

Song C, Chang XJ, Bean KM, Proia MS, Knopf JL, Kriz RW. Molecular characterization of cytosolic phospholipase A2-beta. *J Biol Chem*. 1999; 274(24): 17063 – 17067.

Standridge JB. Pharmacotherapeutic approaches to the treatment of Alzheimer's disease. *Clinical Therapeutics*. 2004; 26 (5): 615 – 630.

Stern Y, Gurland B, Tatemichi TK, Tang MX, Wilder D, Mayeux R. Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease [abstract]. *JAMA*. 1994; 271 (13); 1004 – 1010.

Sun GY, Xu J, Jensen MD, Simonyi A. Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *Journal of Lipid Research*. 2004; 45: 205 – 213.

Sunderland T, Hill JI, Mellow AM, Lawlor BA, Gundersheimer J, Newhouse PA, Grafman JH. Clock Drawing in Alzheimer's Disease. A Novel Measure of Disease Severity. *J Am Geriatr Soc*. 1989; 37: 725 – 729.

Suzuki N, Ishizaki J, Yokota Y, Higashino K, Ono T, Ikeda M, Fujii N, Kawamoto K, Hanasaki K. Structures, enzymatic properties, and expression of novel human and mouse secretory phospholipase A(2)s. *J Biol Chem*. 2000; 275(8): 5785 – 5793.

Talbot K, Young RA, Jolly-Tornetta C, Lee VMY, Trojanowski JQ, Wolf BA. A frontal variant of Alzheimer's disease exhibits decreased calcium-independent phospholipase A2 activity in the prefrontal cortex.

Tang K, Hynan LS, Baskin F, Rosenberg RN. Platelet amyloid precursor protein processing: A bio-marker for Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*. 2006; 240 (1-2): 53 – 58.

Tavares H, Yacubian J, Talib LL, Barbosa NB, Gattaz WF. Increased phospholipase A₂ activity in schizophrenia with absent response to niacin. *Schizophrenia Res*. 2003; 61: 1 – 6.

Underwood KW, Song C, Kriz RW, Chang XJ, Knopf JL, Lin LL. A novel calcium-independent phospholipase A2, cPLA2-gamma, that is renylated and contains homology to cPLA2. *J Biol Chem*. 1998; 273(34): 21926 – 21932.

Vallada HP. Aspectos genéticos da Doença de Alzheimer. In: Forlenza OV, Caramelli P, editores. *Neuropsiquiatria Geriátrica*. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 459 – 465.

Visser PJ, Brodaty H. In: Ames et al. For debate: Is mild cognitive impairment a clinically useful concept? *International Psychogeriatrics*. 2006; 18(3): 393 – 414.

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

Wechsler DI. *Examiner's Manual: Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised*. New York: Psychological Corporation; 1981.

Wilson B, Cockburn J, Baddeley AD. Rivermead Behavioural Memory Test. Suffolk: Thames Valley; 1985.

Wolfe MS, Haass C. The role of presenilins in γ -secretase activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276 (8): 5413 – 5416.

Wood WG, Eckert GP, Igbavboa U, Müller WE. Amyloid beta-protein interactions with membranes and cholesterol: causes or casualties of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003; 1610(2): 281-290.

Yankner B, Duffy L, Kirschner D. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*. 1990; 250: 279 – 282.

Zubenko GS, Cohen BM, Reynolds CF, Boller F, Malinakova I, Keefe N. Platelet membrane fluidity in Alzheimer's disease and major depression. *Am J Psychiatry*. 1987(a); 7: 860 – 868.

Zubenko GS, Huff J, Becker J, Beyer J, Teply I. Cognitive function and platelet membrane fluidity in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 1988; 24: 925 – 936.

Zubenko GS, Kopp U, Seto T, Firestone LL. Platelet membrane fluidity individuals at risk for Alzheimer's disease: a comparison of results from fluorescence spectroscopy and electron spin resonance spectroscopy. *Psychopharmacology*. 1999 (b); 145: 175 – 180.

Zubenko GS, Malinakova I, Chojnacki B. Proliferation of internal membranes in platelets from patients with Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1987(c); 46 (4): 407 – 418.

Zubenko GS, Winwood E, Jacobs B, Teply I, Siffer S, Hughes HB, Huff, FJ, Sunderland T, Martinez J. Prospective study of risk factors for Alzheimer's disease: results at 7.5 years. *Am J Psychiatry*. 1999 (a); 156 (1): 50 – 57.

Zubenko GS, Wusylko M, Cohen BM, Boller F, Teply I. Family study of platelet membrane fluidity in Alzheimer disease. *Science*. 1987(b); 238: 539 – 542.

APÊNDICE

**PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA
ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA**

DIRETORIA CLÍNICA
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

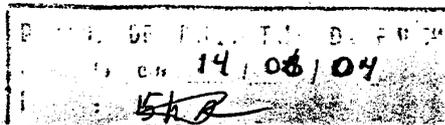
Ao
Departamento de Psiquiatria

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 07.06.04 tomou ciência que o Protocolo de Pesquisa nº 1053/02 - intitulado "Metabolismo de fosfolípidos em doenças neuropsiquiátricas", aprovado por esta Comissão em 19.12.02, contempla o subprojeto intitulado "Alterações bioquímicas periféricas em pacientes com a Doença de Alzheimer: atividade da enzima fosfolipase A₂ fluidez de membrana e variação nos níveis da proteína precursora do amilóide (APP) em plaquetas", que será tese de doutorado da SRA. ISIS AMARAL ZAINAGHI, tendo como orientador o PROF. DR. WAGNER FARID GATTAZ.

CAPPesq, 07 de Junho de 2004.


PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")





HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 - SÃO PAULO - BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 19.12.02, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 1053/02, intitulado: "Metabolismo de fosfolípides em doenças neuropsiquiátricas", apresentado pelo Departamento de Psiquiatria ..

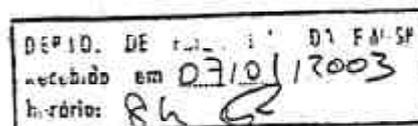
Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. Wagner F. Gattaz

Pesquisador(a) Executante:

CAPPesq, 19 de Dezembro de 2002.


PROF. DR. JORGE KALIL FILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Coleta de Sangue

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

- 1. NOME DO PACIENTE**
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)
- 2. RESPONSÁVEL LEGAL**
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA – Metabolismo de fosfolípidos em doenças neuropsiquiátricas.

PESQUISADOR: Wagner F. Gattaz.

CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular/Psiquiatra INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 25.956

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto e Departamento de Psiquiatria – Laboratório de Neurociências.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: Quatro anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa - Investigações internacionais realizadas na última década têm relatado alterações biológicas em pacientes com distúrbios neuropsiquiátricos. Dentre estas foram detectadas alterações em genes e alterações bioquímicas possivelmente relacionadas com o risco para a doença. O presente estudo tem como objetivo investigar tais alterações em indivíduos portadores de doenças neuropsiquiátricas. Como grupo comparativo faremos as mesmas avaliações em indivíduos saudáveis. Esse estudo será realizado no Laboratório de Neurociências (LIM-27) no Depto de Psiquiatria da FMUSP.

2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais - Se você decidir participar, deverá ser preenchida uma ficha de histórico e avaliação clínica e será feita uma coleta de 10-40ml (equivalente a 3 colheres de sopa) de sangue por punção periférica da veia do antebraço. As amostras serão utilizadas para as determinações bioquímicas e genéticas. Todo o material será codificado de modo que a identidade dos participantes não seja revelada.

3. desconfortos e riscos esperados - Os desconfortos e riscos esperados são mínimos e são decorrentes apenas do processo da coleta de sangue. Você poderá apresentar dor, desconforto ou hematoma quando o sangue for retirado.

4. benefícios que poderão ser obtidos - Não há benefício direto para o participante; trata-se de estudo experimental testando a existência de variantes genéticas e bioquímicas associadas a diversas doenças neuropsiquiátricas. É possível, mas não garantido, que os pacientes com algumas destas doenças possam beneficiar-se dos resultados deste estudo no futuro, bem como seus familiares. O nosso estudo visa um maior esclarecimento dos mecanismos biológicos responsáveis pelo aparecimento das doenças. De posse destes conhecimentos, espera-se conseguir no futuro melhores estratégias para o tratamento e prevenção das referidas doenças.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas. - Você pode perguntar sobre qualquer dúvida que tenha agora ou a qualquer momento durante o estudo e poderá ter acesso às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa.

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência - Você pode recusar-se a participar e pode retirar o consentimento e descontinuar sua participação a qualquer momento, sem que haja qualquer punição ou perda de benefício aos quais tinha direito. O médico responsável pelo seu tratamento não pertence à equipe que executa esta pesquisa. Portanto ele pode, sempre que julgar necessário, e a qualquer momento, retirá-lo do estudo sem que isto venha a prejudicar o seu tratamento e a assistência que você vem recebendo.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade - Os registros que identificarem você pelo seu nome serão mantidos confidenciais e nenhum documento que o identifique sairá do hospital. Se os resultados deste estudo forem publicados, sua identidade permanecerá absolutamente confidencial.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa - Como esclarecido acima, os riscos relacionados a esta pesquisa são mínimos, unicamente envolvendo a punção venosa para a coleta de sangue. Todavia garantimos a disponibilidade de assistência no HCFMUSP para cobrir qualquer dano a saúde, por menor que seja, diretamente decorrente desta pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa – Vide item 4.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dr. Wagner F Gattaz – Instituto de Psiquiatria, HCFMUSP – 3062.9029. email: gattaz@usp.br. BIP – 6847.5000 (código GA123).

Dr. Orestes Forlenza - Instituto de Psiquiatria, HCFMUSP – 3069.7267. email: forlenza@usp.br

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, e consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 200

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)