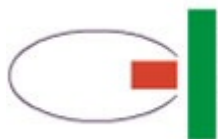


Universidade da Beira Interior



Centro Hospitalar
Cova da Beira, EPE



Centro de Investigação em Ciências da Saúde
Health Sciences Research Centre

Tese de Mestrado em Bioquímica

"Estudo da associação dos níveis séricos de homocisteína, alguns factores vitamínicos, hormonais e de alguns factores genéticos com a patologia tipo Alzheimer"

Mónica Rafaela Correia Gonçalves

Covilhã, 5 de Julho de 2010

Universidade da Beira Interior, 2010



Departamento de Química

Projecto científico desenvolvido com vista à obtenção do grau de mestre em Bioquímica, sob a orientação do Prof. Dr. José Francisco Cascalheira e da Dr^a Sofia Almeida, e realizado no Centro Hospitalar Cova da Beira e no Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS) da Universidade da Beira Interior (UBI).

Mónica Rafaela Correia Gonçalves, nº M3131

Covilhã, 5 de Julho de 2010

“A mim e a todos os que sempre acreditaram em mim e que me ajudaram a ultrapassar todos os momentos de desânimo. Aos meus avós que não puderam estar presentes na concretização de mais uma etapa na minha vida.”

“Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow. The important thing is to not stop questioning. Curiosity has its own reason for existing.”
Albert Einstein

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Francisco Cascalheira pela orientação, incentivo, disponibilidade, críticas e sugestões demonstradas ao longo deste ano na orientação deste projecto.

À doutora Sofia Almeida pelo incentivo e apoio ao longo deste ano.

À Doutora Conceição Faria que, como directora do serviço de Patologia Clínica, proporcionou as condições necessárias para a elaboração deste trabalho, com apoio material na cedência de equipamentos.

À Doutora Manuela Palmeira, especialista em demências cognitivas, pela atenção, simpatia e disponibilidade sempre demonstradas ao longo deste ano em reunir os doentes necessários ao estudo.

À Professora Rita Castro e à Doutora Madalena Barroso da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa pela análise genética.

Aos meus amigos pelo apoio sempre demonstrado.

À minha família que sempre me apoiou, em especial à minha mãe que sempre lutou contra as dificuldades, apoiando-me sempre com o seu amor.

Índice de Ilustrações

Ilustração 1- (a) Um neurónio motor conduz os impulsos para longe do CNS e (b) um neurónio sensorial conduz os impulsos nervosos em direcção ao SNC (adaptado de Van der Graaff 2001).	18
Ilustração 2- Os quatro tipos de neuroglia encontrados dentro do sistema nervoso central (adaptado de Van der Graaff, 2001).....	19
Ilustração 3-Esquema representativo de uma sinapse (adaptado de Van der Graaff, 2001).....	20
Ilustração 4-A BHE mantém a homeostase no SNC. (a) Relação entre os astrócitos e um capilar cerebral. (b) Fotomicrografia demonstrando os prolongamentos vasculares dos astrócitos (adaptado de Van der Graaff, 2001).....	21
Ilustração 5-Formação do A β através do seu precursor, APP (Adaptado de Saido et al., 2006). 27	
Ilustração 6-Representação esquemática dos domínios da proteína tau e os seus sítios de ligação e os de proteína tau hiperfosforilada (adaptado de Maccioni et al, 2001).	28
Ilustração 7-- Representação esquemática do metabolismo da homocisteína (Adaptado de Trabetti, 2008).	32
Ilustração 8-Reacção enzimática de oxidação do ascorbato com formação do desoxiascorbato (adaptado de Visliser et al., 2007).....	48
Ilustração 9-Reacção de condensação do desoxiascorbato com o O-fenilenodiamina (OPDA) (adaptado de Visliser et al., 2007).....	48
Ilustração 10- Representação gráfica da curva de calibração do ascorbato.....	50
Ilustração 11-Representação gráfica da curva de calibração da S100 β	58
Ilustração 12-Representação gráfica da composição do grupo controlo e do grupo teste em função do género.....	59
Ilustração 13-Representação gráfica da correlação entre os valores de homocisteína (μ M) e os valores de cortisol (μ g/dL).	75
Ilustração 14- Representação gráfica da correlação entre os valores de homocisteína (μ M) e os valores de creatinina (mg/dL).....	75
Ilustração 15-Representação gráfica da correlação entre os valores de homocisteína (μ M) e os valores de folato (ng/mL).	76
Ilustração 16-Representação gráfica da correlação entre os valores de homocisteína (μ M) e os valores de ácido úrico (mg/dL).....	77
Ilustração 17-Representação gráfica da correlação entre os valores de homocisteína (μ M) e os valores de testosterona (ng/mL).....	77
Ilustração 18- Representação gráfica da correlação entre os valores de colesterol (ng/dL) e os valores de cortisol (μ g/dL).	78

Índice de Tabelas

Tabela 1-Factores que influenciam os níveis plasmáticos de homocisteína.....	33
Tabela 2-Idade (anos) em grupos e géneros	60
Tabela 3- IMC (Kg/m) em grupos e géneros	60
Tabela 4- Ureia (mg/dL) em grupos e géneros	61
Tabela 5- Creatinina (mg/dL) em grupos e géneros.....	62
Tabela 6- Ácido úrico (mg/dL) em grupos e géneros	62
Tabela 7- Glicose (mg/dL) em grupos e géneros	63
Tabela 8- Colesterol total (mg/dL) em grupos e géneros	63
Tabela 9- Homocisteína (μM) em grupos e géneros.....	64
Tabela 10-Estradiol (pg/mL) em grupos e géneros.....	65
Tabela 11-Cortisol (μg/mL) em grupos e géneros.....	66
Tabela 12-Testosterona (ng/mL) em grupos e géneros	67
Tabela 13-Vitamina B12 (μg/mL) em grupos e géneros.....	68
Tabela 14- Ácido fólico (ng/mL) em grupos e géneros	68
Tabela 15-Vitamina C (mg/dL) em grupos e géneros.....	69
Tabela 16- PCR (mg/dL) em grupos e géneros	70
Tabela 17-Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$) em grupos e géneros	71
Tabela 18-Neutrófilos ($10^3/\mu\text{L}$) em grupos e géneros	71
Tabela 19-Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$) em grupos e géneros.....	72
Tabela 20-Monócitos ($10^3/\mu\text{L}$) em grupos e géneros	72
Tabela 21-Eosinófilos ($10^3/\mu\text{L}$) em grupos e géneros	72
Tabela 22-frequência relativa dos genótipos para a mutação no gene MTHFR 1298A→C	73
Tabela 23-frequência relativa dos genótipos para a mutação no gene MTHFR 677C→T.....	73
Tabela 24-frequência relativa dos genótipos para a mutação no gene TCN2 776 C→G.....	74

Índice

Lista de Abreviaturas.....	11
RESUMO	12
Abstract	13
1- Introdução	14
1.1. Sistema Nervoso	15
1.2. Organização do Sistema Nervoso	15
1.3. Funções do Sistema Nervoso	15
1.4. Neurónios e neuroglia	16
1.5. Tipos de neurónios	17
1.6. Sinapse	19
1.7. Astrócitos e Barreira Hemato-Encefálica (BHE)	20
2. Patogénese da Doença de Alzheimer.....	21
2.1 Diagnóstico da DA	22
3. Factores associados à Doença de Alzheimer	22
3.2. Idade	22
3.3Sexo	23
3.4. Actividade física	23
3.5. Tabagismo	23
3.6. Drogas	24
3.7. Escolaridade	24
3.8. Índice de Massa Corporal (IMC)	25
3.9. Factores genéticos	25
3.9.1 APP e a Doença de Alzheimer	26
3.9.2 Proteína Tau e a Doença de Alzheimer	27
4. Estrogénios e a Doença de Alzheimer.....	28
5. Stress oxidativo na Doença de Alzheimer	29
6. S100 β	30

7. Homocisteína e seu metabolismo.....	31
7.1 Hiperhomocisteinémia	34
7.2 Mecanismos patogénéticos da hiperhomocisteinémia	34
7.3 Polimorfismo no gene da redutase do Metilenotetrahydrofolato (MTHFR)	35
8. Vitamina B12 e polimorfismo no gene TCN2	35
9. Cortisol	36
II. Objectivos	37
III. Materiais e Métodos	38
1. População em estudo.....	38
1.1.Grupo Controlo	38
1.2. Grupo Teste	38
3. Parâmetros clínicos analisados	40
4.1 Parâmetros Bioquímicos	40
4.1.1 Ureia	40
4.1.2 Creatinina.....	41
4.1.3 Ácido Úrico	42
4.1.4 Glucose	43
4.1.5 Colesterol Total	43
4.2 Parâmetros metabólicos	44
4.2.1 Homocisteína	44
4.3 Parâmetros vitamínicos	46
4.3.1 Vitamina B12	46
4.3.2 Ácido fólico ou Folato	47
4.3.3 Vitamina C ou Ácido Ascórbico	47
4.3 Parâmetros endócrinos	51
4.3.1 Cortisol.....	51
4.3.2 Estradiol	52
4.3.3 Testosterona	54

4.4 Parâmetros inflamatórios:	55
4.4.1 Proteína C-reativa	55
4.5 Parâmetros Imunológicos	56
4.5.1 Leucócitos e Linfócitos	56
4.6 S100 β	56
4.7 Análise genética do polimorfismo no gene da MTHFR e da TCN2	58
5. Análise Estatística	58
IV Apresentação dos resultados e discussão	59
4.1. Caracterização das amostras	59
4.2. Sexo	59
4.3. Idade	59
4.4. Índice de massa corporal	60
5. Parâmetros bioquímicos	61
5.1. Ureia	61
5.2. Creatinina	62
5.3. Ácido úrico	62
5.4. Glicose	63
5.5. Colesterol total	63
6. Parâmetros metabólicos	64
6.1. Homocisteína	64
7.0. Parâmetros endócrinos	65
7.1. Estradiol	65
7.2. Cortisol	66
7.3. Testosterona	67
8. Parâmetros vitamínicos	67
8.1. Vitamina B12	68
8.2. Ácido fólico	68
8.3. Vitamina C	69

9. Parâmetros inflamatórios.....	70
9.1. Proteína C-reactiva (PCR)	70
10. Parâmetros imunológicos.....	71
10.1. Leucócitos	71
10.2. Neutrófilos	71
10.3. Linfócitos	72
10.4. Monócitos	72
10.5. Eosinófilos	72
11. Parâmetros genéticos.....	73
11.1. Polimorfismo no gene MTHFR 1298 A→C	73
11.2 Polimorfismo no gene MTHFR 677 C→T	73
11.3. Polimorfismo no gene TCN2 776 C>G	74
12. S100B.....	74
13. Correlação da homocisteína com os diversos parâmetros estudados.....	74
V. Conclusões e perspectivas futuras.....	79
VI. Bibliografia.....	80
ANEXO 1- Formulários do inquérito e da requisição	84
ANEXO 2 - Câmara de Segurança Biológica, segundo Manual de Segurança Biológica em Laboratório da Organização Mundial de saúde (OMS)	85

Lista de Abreviaturas

DA- Doença de Alzheimer
SNC- Sistema nervoso central
SNP- Sistema nervoso periférico
SNA- Sistema nervoso autônomo
BHE- Barreira hemato-encefálica
DV- Doença vascular
 β A-beta-amilóide
IMC- Índice de massa corporal
APP- proteína precursora amilóide
NMDA- N-metil-D- aspartato
GSH- Glutathione
LCR- Líquido cefalorraquidiano
Hcy- Homocisteína
tHcy- Homocisteína plasmática total
PARP- Poli-ADP-ribose polimerase
SAM- S-adenosilmetionina
MTHFR- 5, 10-metilenetetrahydrofolato redutase
MTR- metionina sintase
CBS- cistationina-sintase
ACTH- hormona adrenocorticotrópica
DTA- demência tipo Alzheimer

RESUMO

A doença de Alzheimer é uma disfunção neurodegenerativa multifactorial que é caracterizada pelo declínio progressivo das funções cognitivas e a prevalência da doença tem aumentado como consequência do aumento da esperança média de vida na sociedade moderna. No presente estudo avaliaram-se os níveis séricos de homocisteína, algumas vitaminas e hormonas, e de alguns parâmetros bioquímicos, bem como a prevalência de algumas mutações em 17 doentes de Alzheimer e 25 controlos do Centro Hospitalar Cova da Beira. A relação entre alguns dos parâmetros analisados foi também investigada.

Este estudo evidenciou níveis mais elevados de homocisteína, colesterol e estradiol (apenas nas mulheres) em doentes com patologia tipo Alzheimer relativamente aos controlos.

Observou-se uma correlação positiva entre a homocisteína: e o cortisol ($s=0,406$; $0,010$); a creatinina ($s=0,359$; $P=0,023$), ácido úrico ($s=0,461$; $P=0,003$) e testosterona ($s=0,324$; $P=0,041$).

Na análise genética observou-se uma correlação positiva ($P<0,05$) na mutação do TCN2 num só alelo (genótipo CG), podendo estar associada negativamente à DA, podendo constituir um factor protector de DA.

Palavras-chave:

Doença de Alzheimer, Homocisteína, ácido úrico, ácido fólico, MTHFR, vitaminas B12, vitamina C

Abstract

Alzheimer's disease is a multifactorial neurodegenerative dysfunction which is characterized by a progressive decline of cognitive functions and its prevalence has been increasing as a consequence of the increase in life expectancy in the modern society. In the present study it was evaluated the serum levels of homocysteine, some vitamins and hormones, and some biochemical parameters, as well as the prevalence of certain mutations in 17 Alzheimer's patients and 25 controls from the Centro Hospitalar Cova da Beira.

The relationship between some of the parameters was also investigated. This study showed higher levels of homocysteine, cholesterol and estradiol (women only) in patients with Alzheimer disease relative to controls. We observed a positive correlation between homocysteine: and cortisol ($s = 0.406$, 0.010), creatinine ($s = 0.359$, $P = 0.023$), uric acid ($s = 0.461$, $P = 0.003$) and testosterone ($s = 0.324$; $P = 0.041$). In genetic analysis it was observed a positive correlation ($P < 0.05$) in TCN2 mutation in one allele (genotype GC) and may be negatively associated with AD, may be a protective factor for AD.

Key-words:

Alzheimer disease, Homocystein, uric acid, folate, MTHFR, vitamin B12, vitamin B6

1- Introdução

Com o desenvolvimento da ciência, a esperança média de vida nos países desenvolvidos tem vindo a aumentar, estando segundo a Organização Mundial de Saúde em cerca de 80 anos. Muitas doenças, associadas ao envelhecimento, como as neurodegenerativas progressivas, possuem uma expressão cada vez maior na sociedade actual. Destas destaca-se a Doença de Alzheimer (DA) com uma incidência de 60-80% dos casos (Saido *et al.*, 2006).

O sintoma mais característico da DA é a perda de memória, embora outras funções cognitivas sejam também afectadas. As alterações neuropatológicas desta doença passam pela perda de neurónios e sinapses, pela acumulação de agregados de proteínas intracelularmente (emaranhados neurofibrilares compostos pela proteína tau hiperfosforilada) e extracelularmente (placas senis, constituídas por depósitos de péptido β -amilóide – A β), por processos inflamatórios e pela libertação de citocinas pro-inflamatórias (Heneka *et al.*, 2007).

No entanto, a DA é uma doença heterogénea e os mecanismos que conduzem ao seu aparecimento não estão completamente esclarecidos, principalmente na DA tardia esporádica que inclui 95% dos indivíduos com esta doença.

A DA precoce hereditária, mais rara, é causada por mutações bem caracterizadas nos genes *APP* (precursor do péptido amilóide) e *PSEN1/2* (presenilinas, proteínas que contêm o centro catalítico de uma das enzimas responsáveis pela produção do péptido amilóide). Alguns estudos identificaram vários factores ambientais e genéticos (como o alelo *APOE ϵ 4*) associados a um maior risco de desenvolver DA esporádica, mas que por si só não são suficientes para explicar o aparecimento da doença. Desta forma, torna-se imperativo compreender a complexa interacção existente entre tais factores. A distinção entre o envelhecimento normal e a DA é um passo muito importante no sentido de poder combater eficazmente esta doença (Chen *et al.*, 2009).

1.1. Sistema Nervoso

O sistema nervoso central e o sistema nervoso periférico são componentes estruturais do sistema nervoso, enquanto o sistema nervoso autónomo é uma componente funcional.

O sistema nervoso, em conjunto com o sistema endócrino, regula as funções dos outros sistemas do corpo. O cérebro, no entanto, faz muito mais do que isso, e o seu potencial é, talvez muito subestimado (Van der Graaff, 2001).

1.2. Organização do Sistema Nervoso

O sistema nervoso é dividido em sistema nervoso central (SNC), que inclui o cérebro e a medula espinhal, e o sistema nervoso periférico (SNP), que inclui os nervos craneanos procedentes do cérebro e os nervos espinhais procedentes da medula espinhal.

O sistema nervoso autónomo (SNA) é uma subdivisão funcional do sistema nervoso. Os centros de controlo do SNA estão localizados dentro do cérebro e são considerados parte do SNC, as partes periféricas da SNA são subdivididos em divisão simpático e parassimpático (Van der Graaff, 2001).

1.3. Funções do Sistema Nervoso

O sistema nervoso é especializado em perceber e responder a acontecimentos nos nossos ambientes interno e externo. A percepção do meio ambiente é possível através de neurónios (células nervosas), que são altamente especializados, no que diz respeito à excitabilidade e condutividade.

O sistema nervoso funciona por todo o corpo em conjunto com o sistema endócrino para coordenar as actividades dos outros sistemas do corpo. Além de integrar as actividades do corpo, o sistema nervoso tem a capacidade de armazenar experiências (memória) e estabelecer padrões de resposta com base nas experiências prévias (aprendizagem).

As funções do sistema nervoso incluem:

1. Orientação do corpo ao meio ambiente;
2. Actividades de coordenação e controle do corpo;

3. Assimilação de experiências necessárias para a memória, a aprendizagem, e inteligência;
4. Programação do comportamento instintivo (aparentemente mais importante em outros vertebrados do que nos seres humanos) (Van der Graaff ,2001).

Estas quatro funções dependerão da capacidade do sistema nervoso para monitorizar as mudanças, ou estímulos, tanto dentro como fora do corpo; para interpretar as mudanças num processo chamado de integração e dar respostas com efeito de activar músculos ou glândulas.

Assim, em termos gerais, no sistema nervoso sensorial, as funções integradora e as funções motoras trabalham em conjunto para manter a constância interno, ou homeostase, do corpo (Van der Graaff ,2001).

1.4. Neurónios e neuroglia

O **Neurónio** é a unidade-base do sistema nervoso. Os neurónios diferem segundo as suas funções e localização: contudo, podemos afirmar que o neurónio típico apresenta três componentes: o **corpo celular**, as **dendrites** e o **axónio** (ver fig. 1a).

O **corpo celular** rodeado por uma fina membrana, inclui o núcleo celular, que é a central de energia da célula.

As ramificações finas – as dendrites - prolongam-se para o exterior recebendo as mensagens dos neurónios vizinhos, conduzindo-as para o corpo celular. O número de dendrites, que pode atingir as centenas, varia segundo o tipo de neurónio.

O axónio é a fibra principal de saída - a sua extensão pode variar entre escassos milímetros e um metro - que se prolonga a partir do corpo celular e que termina em ramificações chamadas terminais axónicos ou telodendrites. Nas extremidades destas situam-se os botões ou bolbos. Alguns axónios estão cobertos por uma camada de substância branca de matéria gorda, a bainha de mielina, que permite uma mais rápida transmissão da mensagem (Van der Graaff ,2001).

Para o neurónio manter a sua actividade e assegurar as suas funções tem de ser alimentado com oxigénio e glucose. São as células gliais ou células da glia que alimentam, isolam e controlam o crescimento dos neurónios. A interrupção da alimentação do neurónio provoca a sua morte.

Todos os neurónios estão presentes no momento do nascimento. O desenvolvimento físico provoca o crescimento dos neurónios que aumentam de tamanho, desenvolvendo-se o número de axónios e dendrites, assim como a quantidade de conexões que se estabelecem. Contudo, diferentemente das outras células do corpo, os neurónios não se dividem nem se reproduzem, sendo portanto insubstituíveis (Van der Graaff ,2001).

1.5. Tipos de neurónios

Do ponto de vista funcional podemos distinguir três tipos de neurónios:

Neurónios aferentes ou sensoriais – recolhem a informação do meio exterior ou interior e conduzem-na ao sistema nervoso central, isto é, transportam a mensagem da periferia à espinal medula e ao cérebro;

Neurónios eferentes ou motores – transmitem a informação do sistema nervoso central para os órgãos efectores (músculos ou glândulas):

Neurónios de conexão – interpretam as informações e elaboram as respostas ((Van der Graaff ,2001).

Subjacente a estes comportamentos está a função fundamental do neurónio, que é transmitir a mensagem, a informação, o impulso nervoso:

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">• recebe os sinais dos neurónios vizinhos• integra estes sinais• gera um impulso nervoso• conduz o impulso nervoso• transmite-o a outro neurónio | ENTRADA

SAÍDA |
|--|--|

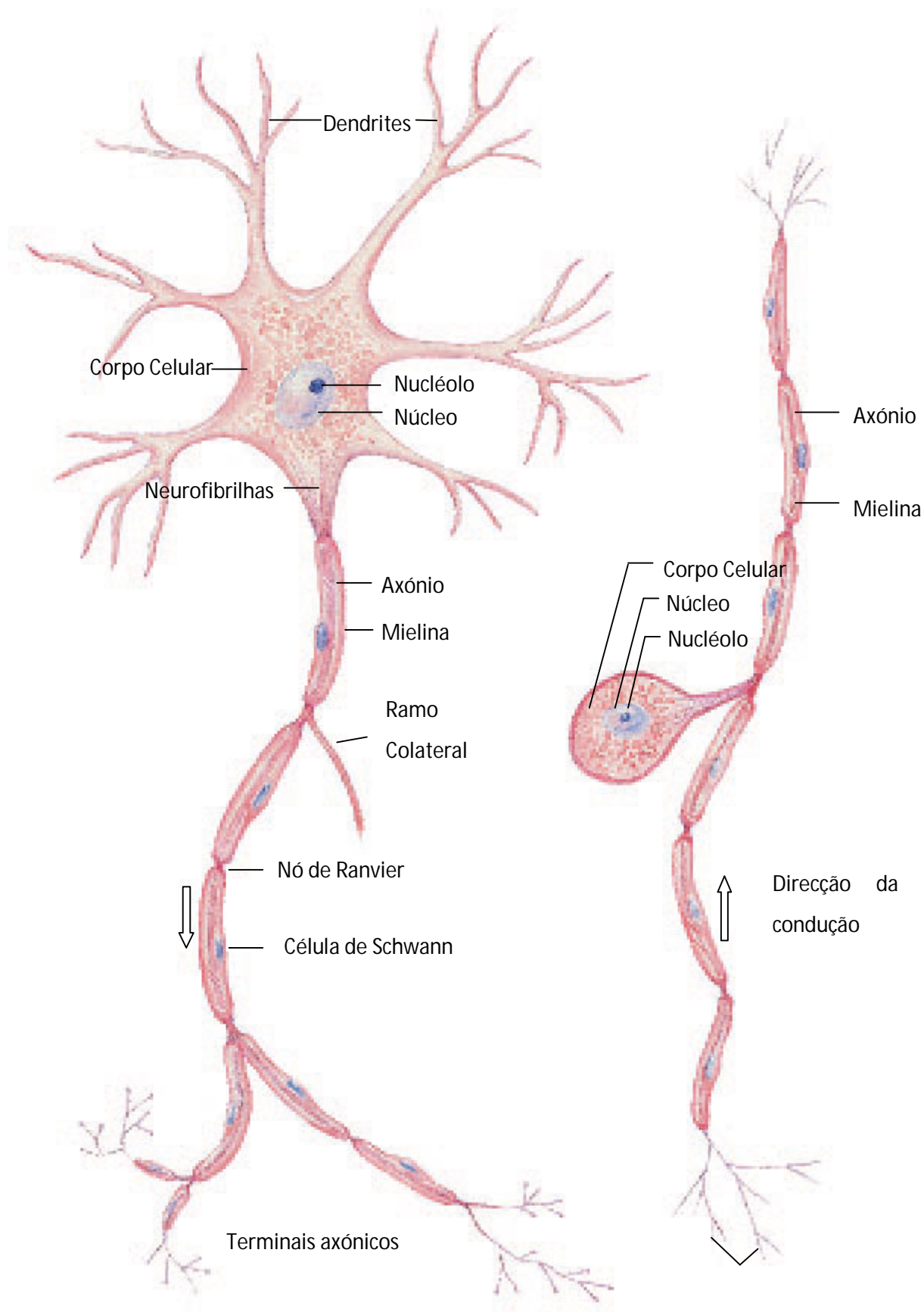


Ilustração 1- (a) Um neurónio motor conduz os impulsos para longe do CNS e (b) um neurónio sensorial conduz os impulsos nervosos em direcção ao SNC (adaptado de Van der Graaff 2001).

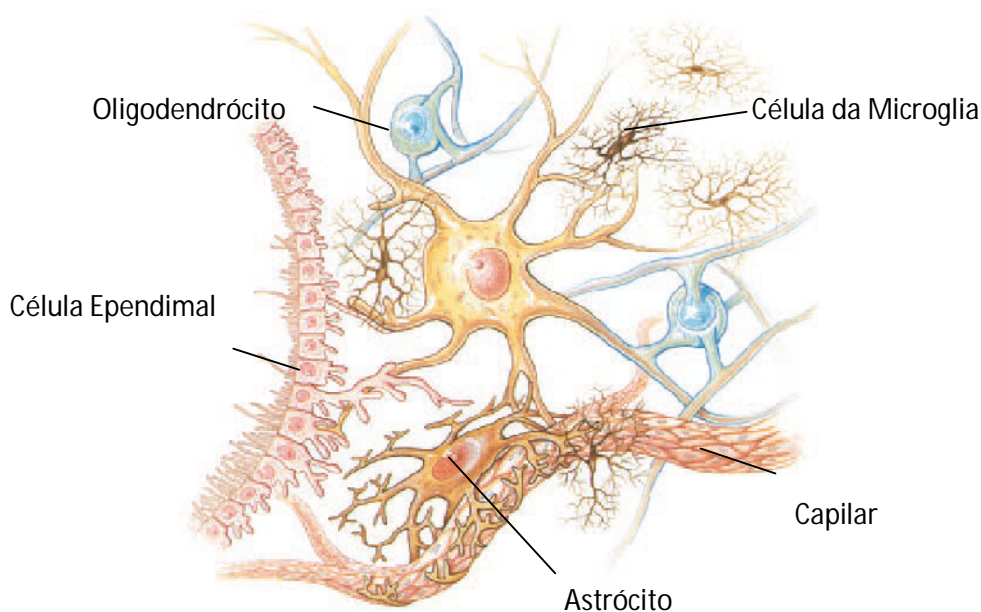


Ilustração 2- Os quatro tipos de neuroglia encontrados dentro do sistema nervoso central (adaptado de Van der Graaff, 2001).

1.6. Sinapse

Os neurónios são células especializadas na recepção e transmissão de sinais às células adjacentes.

Cabe às dendrites captar o estímulo, gerar o impulso nervoso e conduzi-lo ao corpo celular do neurónio (ver fig.1b). O impulso é transmitido ao axónio e conduzido às ramificações terminais. Estas aproximam-se das dendrites do neurónio vizinho, não mantendo, contudo entre si contacto físico. O ponto de contacto especializado através do qual o sinal é transmitido designa-se por sinapse.

Na sinapse – ponto de comunicação entre neurónios – estão envolvidos os seguintes elementos: a terminação axonal do neurónio emissor (pré-sináptico) e uma dendrite do neurónio receptor (pós-sináptico), bem como um espaço entre os neurónios - o espaço ou fenda sináptica. Quando o impulso atinge os terminais axonais do neurónio pré-sináptico (1) - induz a libertação de neurotransmissores (2) que se difundem no espaço sináptico (3) e são captados pelos receptores do neurónio pós-sináptico (4) (ver fig. 3) (Van der Graaff , 2001).

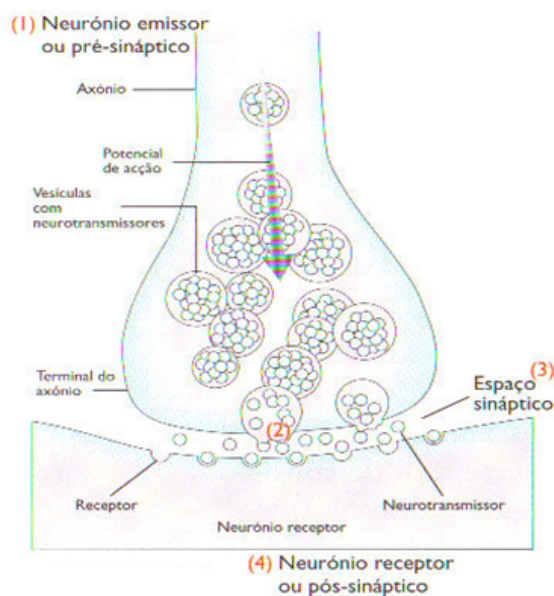


Ilustração 3-Esquema representativo de uma sinapse (adaptado de Van der Graaff, 2001).

1.7. Astrócitos e Barreira Hemato-Encefálica (BHE)

Os astrócitos são o tipo de neuroglia mais abundante no SNC e em alguns locais do cérebro constituem 90% do tecido nervoso. Os capilares no cérebro, ao contrário da maioria dos outros órgãos não têm poros entre as células endoteliais adjacentes. As moléculas com esse tipo de capilares, devem portanto, movimentar-se através das células endoteliais por transporte activo, endocitose e exocitose. Os astrócitos no cérebro têm numerosas extensões chamados prolongamentos vasculares que envolvem a maior parte da superfície exterior dos capilares do cérebro. As moléculas no sangue antes de entrarem no SNC têm de passar através das células endoteliais e dos astrócitos. Assim, os astrócitos contribuem para a BHE, que é muito selectiva, ou seja, determina que substâncias podem mover-se do plasma sanguíneo para o fluído extracelular do cérebro. Certas substâncias tais como água, oxigénio, dióxido de carbono, glucose e compostos lipídicos solúveis (por exemplo, álcool) passam facilmente através da BHE. Certos iões inorgânicos (Ca^+ e K^+) passam mais devagar através da BHE e, por isso as suas concentrações diferem do plasma sanguíneo. Outras substâncias tais como proteínas, lípidos, creatina, ureia, inulina, certas toxinas e a maioria dos antibióticos são restritas na passagem (Van der Graaff, 2001).

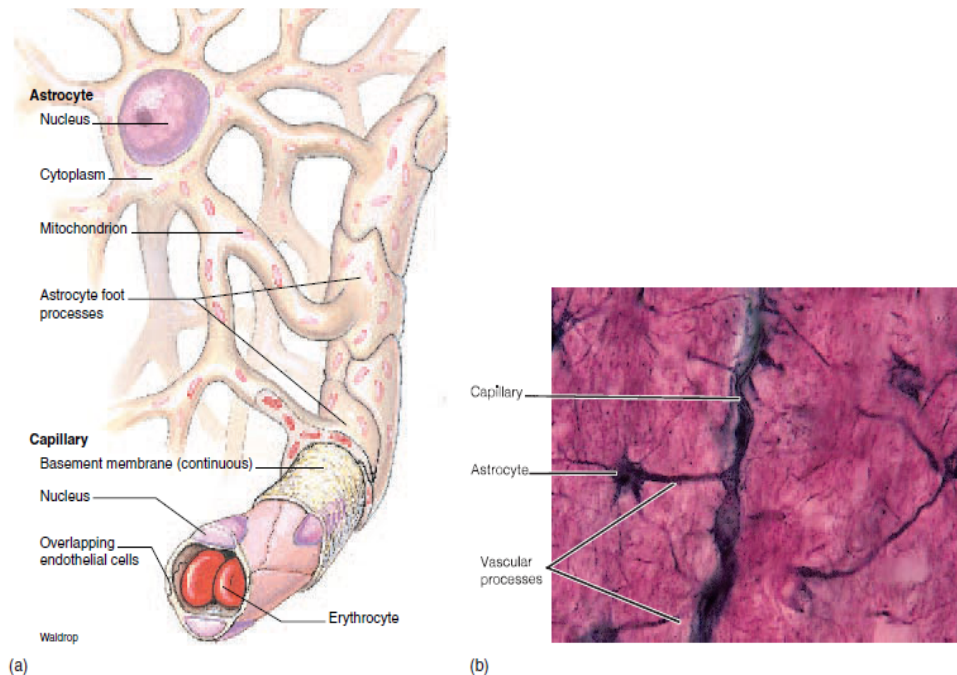


Ilustração 4-A BHE mantém a homeostase no SNC. (a) Relação entre os astrócitos e um capilar cerebral. (b) Fotomicrografia demonstrando os prolongamentos vasculares dos astrócitos (adaptado de Van der Graaff, 2001).

Embora a BHE seja um importante sistema de proteção, é essencial que o cérebro seja capaz de monitorizar e responder a flutuações nos níveis de glicose no sangue, pH, salinidade, osmolaridade e pressão. Por essa razão a BHE é ausente em certas regiões limitadas do cérebro, incluindo porções do hipotálamo (Van der Graaff, 2001).

2. Patogénese da Doença de Alzheimer

A patogénese da DA inclui a formação e a deposição de β amilóide ($A\beta$), emaranhados neurofibrilares (formados pela proteína tau hiperfosforilada) e inflamação (Wong et al., 2007; Heneka *et al.*, 2007).). Considera-se que as fibrilas $A\beta$ desempenham um papel importante na patogénese da DA através da activação da microglia e estimulando a libertação de mediadores inflamatórios, que levam a uma disfunção neuronal e consequentemente a morte celular (Walsh *et al.*, 2002). Contudo, dados clínicos recentes e estudos realizados em animais revelaram que os astrócitos e a activação da microglia podem ocorrer precocemente na DA, ocorrendo assim antes da formação da $A\beta$ (Chen *et al.*, 2009).

2.1 Diagnóstico da DA

Os critérios mais aceites para o diagnóstico da DA (principalmente para fins de investigação) são descritos pelo “Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders” (DSM-IV-TR) e, pelo grupo de trabalho do “National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Alzheimer Disease and Related Disorders” (NINCDS-ADRDA). O estado neuropsicológico do paciente é avaliado com alguns testes como o “Mini-Mental State Examination” – MMSE, o mais utilizado na avaliação cognitiva ou o “Clinical Dementia Rating Scale” – CDR (Schmitt *et al*, 2006). Contudo, o diagnóstico definitivo da DA só pode ser confirmado *post-mortem* com exames histopatológicos para identificar as alterações patológicas características no cérebro. A compreensão da fisiopatologia da DA está a melhorar e, actualmente é possível reconhecer os marcadores da doença na estrutura cerebral com Imagens por Ressonância Magnética (MRI), estudar as alterações moleculares na neuroimagem com a tomografia por emissão de positrões (PET) e medir as alterações dos biomarcadores no líquido cefalorraquidiano. Estes recursos foram propostos para serem incluídos nos critérios do NINCDS-ADRDA (Dubois *et al*, 2007).

3. Factores associados à Doença de Alzheimer

Os factores associados à DA incluem: factores genéticos, idade, sexo, inflamação, factores ambientais e estilo de vida. Os factores protectores incluem elevado nível educacional, consumo moderado de álcool, uso de terapias hormonais de substituição nas mulheres, uso de medicamentos anti-inflamatórios e dieta (Chen *et al*, 2009).

3.2. Idade

Com o avanço da idade, as células vão-se degenerando progressivamente, provocando o envelhecimento do cérebro (degeneração cerebral). Os efeitos do envelhecimento e da idade parental no nascimento têm sido associados ao risco de DA. Nos Estados Unidos e na Europa vários estudos realizados demonstraram que o risco de demência e AD aumenta com a idade (Liu *et al*, 2003). Esta associação foi observada em todos os subtipos de demência num estudo espanhol. Assim, de um modo geral, o efeito do envelhecimento é um factor de risco relativamente consistente para a DA em vários grupos étnicos (Chen *et al*, 2009).

3.3 Sexo

O sexo é um importante factor de risco para a DA em pessoas idosas. Num estudo holandês monitorizado, demonstrou-se que a incidência da doença de Alzheimer em mulheres é superior que nos homens após os 85 anos. A mesma equipa também verificou que o risco de DA decresce nos homens, mas não nas mulheres após os 90 anos de idade. Outro estudo realizado, que incluiu apenas as populações da China mostrou uma maior prevalência de DA, mas não Doença Vascular (DV), entre as mulheres, em comparação com homens com idade ≥ 60 anos (Liu *et al.*, 2003). Os resultados acima podem ser explicadas por um efeito protector dos estrogénios na pré menopausa das mulheres, e a morte prematura dos homens devido a doenças cardiovasculares. Contudo, a associação do sexo com a DA demonstrou não ser positiva num estudo realizado com as populações espanholas e italianas. Assim, vários factores podem interferir nessa associação nomeadamente hormonas esteróides sexuais, polimorfismos genéticos, estilos de vida, etc. (Chen *et al.*, 2009).

3.4. Actividade física

A associação entre a actividade física e o risco de DA tem sido intensamente investigado. Alguns estudos realizados sugerem que a actividade física está associada positivamente com a função cognitiva das pessoas idosas, assim, observou-se uma redução de 30-50% do declínio cognitivo com a actividade física regular (Chen *et al.*, 2009).

3.5. Tabagismo

O efeito do tabagismo no risco de demência é controverso. Um estudo recente demonstrou que o tabagismo está associado significativamente com um aumento do risco de DA mas não de DV e de declínio cognitivo (Peters *et al.*, 2008). Na DA, é observada uma deficiência no sistema colinérgico, caracterizada pelos baixos níveis de receptores de acetilcolina e da nicotina. Tanto a nicotina como a acetilcolina ligam-se ao mesmo receptor, em sítios localizados na porção extracelular do receptor entre as subunidades α/γ e α/δ . Quando ocorre a ligação, ocorre uma mudança conformacional entre todas as subunidades, formando um canal para a passagem dos cations. Com a abertura do canal, ocorre o efluxo dos iões potássio para o meio extracelular e ao

mesmo tempo ocorre o influxo dos iões de sódio e de cálcio para o interior da célula, ocorrendo a despolarização da membrana celular iniciando um potencial de acção. Desta forma, a nicotina aumenta a libertação da acetilcolina, eleva o número de receptores nicotínicos, melhorando assim o processamento de informação (Letenneur et al, 2004).

3.6. Drogas

Várias drogas têm sido associadas o risco de DA e de demência. Algumas têm sido associadas a efeitos benéficos na DA e na demência. Assim, as estatinas (inibidor da HMG-CoA redutase), bloqueiam a conversão da HMG-CoA a mevalonato, que é o precursor do colesterol, sendo utilizadas para baixar os níveis de colesterol, especialmente o colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL) em pacientes com doença cardiovascular (Zandi *et al.*, 2005). Além disso, as estatinas alteram a fluidez arterial já que limitam a vasoconstrição induzida pelo neurotransmissor acetilcolina e induzem relaxamento vascular mediado pelo óxido nítrico (Reiss *et al.*, 2004). As estatinas parecem reduzir o risco de demência efectivamente através de um mecanismo anti-inflamatório pela diminuição dos níveis de colesterol e de isoprenilação. Outra classe de drogas, as anti-hipertensivas (por exemplo: inibidores da enzima conversora da angiotensina, bloqueadores dos receptores de angiotensina II, diuréticos e bloqueadores dos canais de cálcio) pode diminuir o risco de DA. Contudo, estes estudos são inconclusivos (Chen *et al.*, 2009).

3.7. Escolaridade

A escolaridade é um dos factores considerado como causa para a heterogeneidade da DA. É possível que os indivíduos com menor nível de escolaridade tendam a ter menor função cognitiva em comparação com os indivíduos da mesma idade e, que possuem maiores níveis de escolaridade. Por isso, o aparecimento de DA entre os primeiros provavelmente será mais cedo que nos segundos (Chen *et al.*, 2009)

3.8. Índice de Massa Corporal (IMC)

O critério para o estabelecimento de um quadro de obesidade baseia-se no valor do Índice de Massa Corporal (IMC) e é obtido pela divisão do peso (Kg) pelo quadrado da altura (m).

O excesso de peso e a obesidade são factores de risco da DA, hiper-insulinémia e diabetes (Luchsinger *et al.*, 2007). Estudos recentes demonstraram que há um aumento de risco de DA entre os indivíduos obesos (IMC > 30) comparados com os de peso normal (IMC 20-25) aos 50 anos de idade. Contudo há uma associação inversa entre o IMC e o risco de DA em idades ≥ 65 anos (Fitzpatrick *et al.*, 2009). Outro estudo constatou que a perda de peso constante anual de 1kg/m^2 , nos idosos foi relacionada com um aumento do risco de DA em 35%, em comparação com indivíduos sem variação do IMC (Buchman *et al.*, 2005).

3.9. Factores genéticos

A DA é uma doença multifactorial, sem um modo simples de herança. Em termos de idade de início da DA, pode ser classificada em tardia (geralmente esporádica) e de precoce que é, na maioria dos casos, familiar e autossómica dominante. Esta última forma da doença é rara e é causada por mutações em três genes identificados: o gene para a proteína precursora da β -amilóide (APP) e os genes para a Presenilina-1 e Presenilina-2 (PSEN1 e PSEN2). As Presenilinas formam o centro catalítico do complexo γ - secretase. As mutações em qualquer um dos três genes aumentam a frequência de formação das espécies $A\beta_{1-42}$, que têm uma maior tendência em se agregarem (Bertram *et al.*, 2008).

Vários estudos têm sido realizados utilizando genes candidato para analisar a associação entre as variantes genética e o risco de DA. Entre estes, o gene APOE é de grande importância na maioria das pessoas com DA, que na maior parte são casos esporádicos. A associação entre o genótipo da APOE e o risco de DA foi descrito por Corder *et al* em 1993. Um estudo sueco descreveu que 60-80 % dos casos de DA são atribuídos a factores genéticos.

O gene APOE tem 3 alelos, *APOE* $\epsilon 2$, *APOE* $\epsilon 3$ e *APOE* $\epsilon 4$. A proteína codificadora do ApoE, é uma proteína transportadora de colesterol que se liga ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR) e à proteína relacionada (LRP). O $\epsilon 3$ é o alelo mais comum e o tipo $\epsilon 4$ tem uma incidência de 15% nos alelos de APOE na população

em geral. A população com DA apresenta uma frequência de 45% de APOE $\epsilon 4$ e os homozigóticos possuem 8-10 vezes um risco maior de desenvolver demência, sendo este efeito dependente do género e da idade. A APOE $\epsilon 2$ tem um efeito contrário e parece ser protectora (Gandy *et al*, 2005).

3.9.1 APP e a Doença de Alzheimer

A deposição de A β no cérebro tem sido um importante factor na DA e tem tido uma importância científica relevante desde a sua descoberta em 1984 por Glenner. As placas contendo formas agregadas de fragmentos A β podem ser encontradas no córtex normal de idosos. Contudo, a observação de que uma porção significativa da população idosa pode ter placas mesmo na ausência de manifestações de qualquer forma de demência podem argumentar a favor da ideia que a deposição amilóide é apenas um entre vários factores importantes que causam a doença, embora possa certamente contribuir para os mecanismos subjacentes à fisiopatologia da DA (Maccioni *et al*, 2001).

A proteína precursora amilóide (APP) pertence a uma família transmembranar de glicoproteínas de tipo 1 que é expressa em vários tipos de células.

O gene da APP encontra-se no cromossoma 21, uma descoberta de principal interesse, uma vez, que os doentes com síndrome de Down desenvolvem depósitos de A β e degeneração neuronal (Maccioni *et al*, 2001).

A porção N-terminal da APP é projectada para o domínio extracelular ou pode ser encontrada no lúmen de vesículas intracelulares, tais como as do retículo endoplasmático, complexo de Golgi, e nos endossomas intracelulares. Por outro lado, a região C-terminal da APP encontra-se no domínio citoplasmático (Maccioni *et al*, 2001). A APP é sensível à proteólise por um conjunto de proteases denominadas de α , β ou γ -secretases. As secretases são responsáveis pela produção do péptido A β (1-40) ou uma variante, o A β (1-42), com uma capacidade suficientemente elevada em agregar-se.

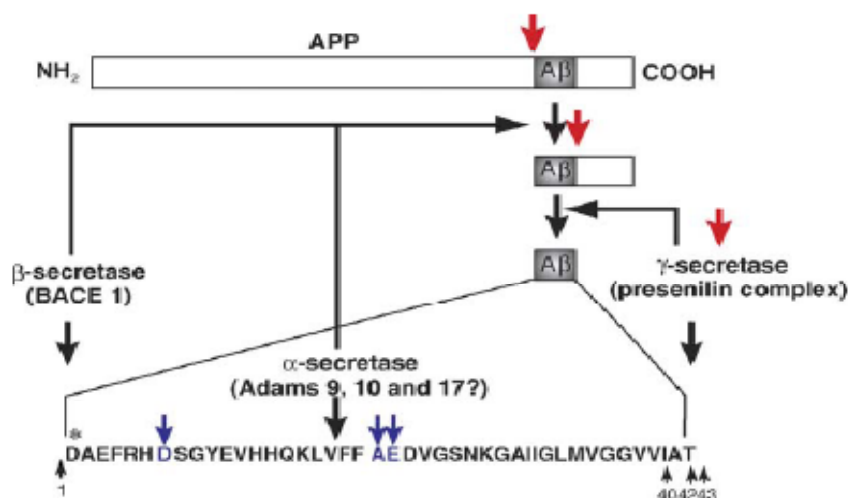


Ilustração 5-Formação do Aβ através do seu precursor, APP (Adaptado de Saido et al., 2006).

A APP é clivada pela β ou α- secretase, formando um fragmento C-terminal (C99 ou C83), que será clivado pela γ-secretase formando assim Aβ. A maior parte das espécies formadas são Aβ₄₀ e Aβ₄₂. A Aβ₄₂ sendo mais hidrofóbica e mais apta a agregar, sendo assim considerada primariamente patogénica, consistente com o fenótipo da maior causa de mutações na AD familiar (Saido *et al.*, 2006).

3.9.2 Proteína Tau e a Doença de Alzheimer

A proteína tau é uma proteína multifuncional associada a microtúbulos que desempenha um importante papel na formação dos microtúbulos, na sua estabilização contra a dinâmica da instabilidade e, para unir estes polímeros com outros filamentos do citoesqueleto. Num cérebro normal, existe um equilíbrio entre as fosforilações e desfosforilações da proteína tau que modulam a estabilidade do citoesqueleto e a morfologia axonal.

Os emaranhados neurofibrilares, compostos por matrizes de filamentos helicoidais emparelhados (PHFs), que se encontram principalmente no hipocampo e amígdala na DA. OS PHFs são estruturas anómalas formadas pela auto-agregação da proteína tau hiperfosforilada, que forma uma rede filamentosa compacta.

A primeira alteração encontrada no cérebro de doentes com DA consiste na hiperfosforilação da proteína tau, pela acção de diferentes sistemas de cinases de proteínas e fosfatases que parecem conduzir a alterações estruturais e conformacionais

na proteína, afectando a sua ligação à tubulina e a sua capacidade de formação de microtúbulos (Maccioni *et al*, 2001).

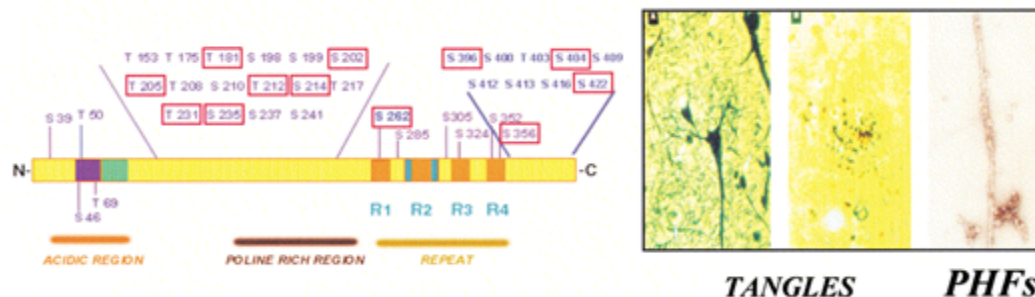


Ilustração 6-Representação esquemática dos domínios da proteína tau e os seus sítios de ligação e os de proteína tau hiperfosforilada (adaptado de Maccioni et al, 2001).

4. Estrogénios e a Doença de Alzheimer

Clinicamente, a AD é caracterizada por um início insidioso, com alterações em áreas cognitivas no cérebro, conduzindo especialmente à progressiva perda de memória. Embora a gravidade da demência seja similar em ambos os sexos, as mulheres com DA apresentam uma maior dificuldade em tarefas de memória semântica.

Na menopausa os níveis de estrogénios são baixos, a terapia de substituição em pacientes na pós-menopausa pode restaurar a sua capacidade de memória e até mesmo atrasar a expressão de outras perturbações da doença de Alzheimer. Nos homens, a testosterona decresce gradualmente e os neurónios têm a capacidade de converter esta hormona em estradiol, o que pode explicar uma menor incidência de distúrbios cognitivos em idosos do sexo masculino. Os estrogénios têm uma variedade de efeitos no SNC e influencia as alterações fenotípicas na DA. Estas hormonas exibem uma capacidade de activação nos neurónios maduros. Também participam no processo de morfogénese sináptica, nos efeitos dos receptores de N-metil-aspartato (NMDA) para o glutamato modulam a APOE cujas quatro variantes (ApoE4) constituem um factor de risco de DA. Além disso, as vias colinérgicas ascendentes e o hipocampo, seriamente afectados nesta demência, possuem receptores nucleares para os estrogénios, os quais exercem uma acção modulatória sobre a transmissão colinérgica. Os estrogénios também possuem efeitos antioxidantes, que podem estar relacionados com a sua estrutura fenólica, independentemente dos seus efeitos mediados por receptores. Tem sido demonstrado que estas hormonas são capazes de interagir e aumentar a actividade antioxidante da glutathione (GSH) e diminuir a formação de radicais livres a nível

mitocondrial para prevenir o dano oxidativo pela A β e outros agentes oxidativos (Maccioni 2001).

5. Stress oxidativo na Doença de Alzheimer

O stress oxidativo, é causado pela produção excessiva de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e espécies reactivas de Azoto (RNS), que consiste nos radicais livres de oxigénio e moléculas relacionadas como os radicais livres superóxido (O $_2^{\cdot-}$), singlete de oxigénio (O*), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogénio (H $_2$ O $_2$) e peroxinitrito. Este fenómeno contribui para a destruição dos neurónios e das células vasculares. O cérebro tem uma taxa de consumo de oxigénio muito elevada, conteúdos lipídicos consideráveis e poucas enzimas antioxidantes quando comparado com outros tecidos, tornando assim o SNC muito vulnerável aos danos dos radicais livres. É possível que o acúmulo dos danos oxidativos contribua para a progressão das doenças neurodegenerativas (Praticò, 2008). As consequências da produção de ROS, incluem destruição da membrana lipídica, clivagem no DNA e inibição de um complexo de enzimas na cadeia transportadora de electrões na mitocôndria, bloqueando a respiração mitocondrial. Estes danos normalmente conduzem à apoptose (Chong *et al*, 2005).

Na DA, o stress oxidativo parece desempenhar um papel fundamental na sua patofisiologia. O cérebro de doentes com DA mostra evidências de danos das ROS, e vários produtos do stress oxidativo, tais como 4-hidroxinonenal e produtos finais resultantes de glicação, tendo sido encontrados perto dos depósitos de A β e dos emaranhados neurofibrilares (Sultana *et al*, 2009).

Também, a hemeoxigenase, outro indicador de resposta ao stress oxidativo, colocaliza com a forma alterada da tau. Por outro lado, o stress oxidativo parece aumentar a formação e agregação de A β , e a formação de emaranhados neurofibrilares pode ser influenciada pelas modificações oxidativas na proteína tau (Markesbery, 1997, Mattson, 2004). É plausível que possa haver outras fontes de stress oxidativo no cérebro de doentes com DA, por exemplo, a acumulação de metais susceptíveis a reacções redox, tais como o ferro (Fe) e o cobre (Cu) (Praticò, 2008).

6. S100 β

A S100 β é uma proteína de baixa massa molecular ligada à molécula de Ca²⁺, sendo composta por duas sub-unidades isoméricas e expressa predominantemente pelos astrócitos e pelas células de Schwann. Os seus níveis normalmente são baixos ou não detectáveis no soro, contudo, têm sido encontrados níveis elevados em doenças neuropatológicas.

Embora se reconheça que a S100B tem origem no SNC, encontra-se elevada no Líquido cefalorraquidiano (LCR) e no soro após lesão, mas não permanece claro se este aumento se deve a sinais de disfunção da BHE ou a danos neuronais/parênquima.

Vários estudos sugerem que uma variedade de moléculas biologicamente activas produzidas pelos astrócitos activados podem ter um papel ambivalente em várias patologias do cérebro, incluindo DA.

A s100B (a forma $\beta\beta$) dependente de Ca²⁺ desempenha um papel importante na regulação de uma variedade de efeitos intracelulares neurotróficos a níveis fisiológicos. No cérebro, a S100B encontra-se predominantemente na sua isoforma da família S100, onde é expressa pelos astrócitos e pensa-se que medeia a activação da glia. Contudo, a S100B pode ser prejudicial, uma vez que: 1) em concentrações micromolares pode provocar danos neuronais através da sobre-expressão da sintase do óxido nítrico induzíveis (iNOS) e consequentemente a libertação de óxido nítrico; 2) é regulada numa variedade de doenças neurodegenerativas, incluindo a DA; 3) está associada a placas β -amilóide neuríticas num modelo transgénico de DA; 4) estimula a activação da glia através de um ciclo de citocinas; 5) activa o factor nuclear κ B (NF- κ B), a chave da transcrição de um factor mediador da resposta inflamatória (Mori *et al.*, 2010).

Extracelularmente, a S100B modula a actividade neuronal e a plasticidade sináptica e, no espaço intracelular, actua como um potente inibidor da fosforilação em diferentes substratos como proteína cinase C e Tau. Após a ligação em sítios específicos da membrana, as proteínas S100B podem modificar a actividade da ciclase do adenilato, provavelmente através de proteínas G (Nogueira *et al.*, 2009).

Não há nenhum mecanismo específico de activação para proteínas S100B, uma vez que foram encontrados várias condições que podem provocar a sua libertação ou expressão, entre estas, destacam-se: o interferão gama; o factor de crescimento de fibroblastos-2; interleucinas, glutamato; corticoesterona e pregnisona. Basicamente estes mecanismos parecem envolver um contacto específico célula a célula, que

estimula a síntese de S100B. De entre os factores que promovem a libertação da S100B da glia, há também a activação dos astrócitos ou das células de Schwann pelo receptor 5-HT1A.

Uma vez no espaço extracelular, a S100B exerce os seus efeitos. Dependendo da sua concentração, pode actuar como quimioatractante para os leucócitos, um modulador da proliferação celular e extensão da neurite, bem como a regulação da activação dos macrófagos. As investigações têm revelado que elevados níveis de S100B no soro ou no líquido cefalorraquidiano (LCR) são um sinal de dano cerebral ou de um processo patológico, sendo assim um biomarcador utilizado no diagnóstico clínico (Nogueira *et al*, 2009).

7. Homocisteína e seu metabolismo

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido não essencial com grupo SH que é formado pela desmetilação da metionina (Trabetti E. 2008). O catabolismo da Hcy depende do folato, vitamina B12 e vitamina B6 (Obeid et al. 2006). A homocisteína é pró-aterogénica e pró-trombótica. Dessa forma, aumenta o risco de acidente vascular cerebral, podendo ter um efeito neurotóxico directo. A exposição de neurónios do hipocampo de ratos à Hcy evidenciou a activação da enzima poli ADP-ribose polimerase (PARP) e ao esgotamento de NAD, que precede a disfunção mitocondrial e o stress oxidativo, activação das caspases e apoptose neuronal.

A metionina é um aminoácido essencial e, é activado para formar S-adenosilmetionina (SAM), dador universal de grupos metilo. A S-adenosilhomocisteína é formada quando o SAM doa o grupo metilo. A S-adenosilhomocisteína é hidrolisada formando homocisteína e adenosina. Como mostra a fig. 7 a homocisteína pode ser remetilada a metionina pela metionina sintase (MTR), a qual requer 5 5- metiltetraidrofolato (CH₃-THF) como dador de grupo metil e metilcobalamina (uma forma biológica activa da vitamina B12) como cofactor para a actividade enzimática. O CH₃-THF é formado em consequência da redução do 5, 10-metilenetetraidrofolato, uma reacção que é catalisada pela enzima reductase do metilenetetraidrofolato (MTHFR) (Trabetti E. 2008). O ciclo preserva a metionina que na sua forma activada (SAM) é o principal dador de grupo metilo em várias reacções, por exemplo, a metilação do DNA, hormonas, lípidos e neurotransmissores (Rezvani et al. 2002; Mudd et al., 2001).

No fígado, onde o metabolismo da metionina é muito activo, outra enzima, a betaina-homocisteína-metiltransferase (BHMT), participa na síntese da metionina com a betaina ou com a trimetilglicina como dador de grupo metilo.

Se um excesso de metionina na dieta ocorre, a MTR é inibida e a via da transsulfuração fica activada, reagindo a homocisteína com a serina formando cistationina. A cistationina β - sintetase (CBS) catalisa o passo inicial necessitando de 5'-fosfato piridoxal (a forma activa da vitamina B6), para a sua actividade. A cistationina é subsequentemente hidrolisada por outra enzima requerendo vitamina B6, a γ -cistationase, para formar cisteína e α -cetobutirato. O excesso de cisteína é oxidado em taurina ou sulfatos orgânicos ou, é excretada na urina (De Vecchi et al. 1999).

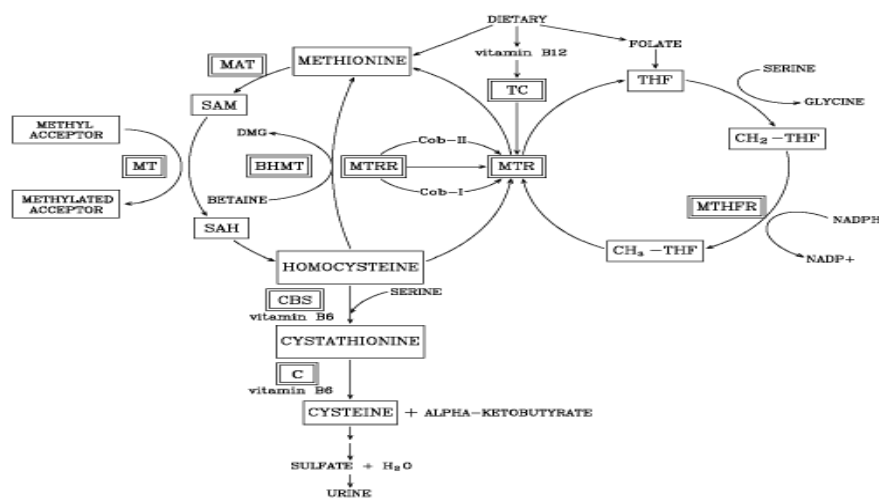


Ilustração 7-- Representação esquemática do metabolismo da homocisteína (Adaptado de Trabetti, 2008).

Em condições fisiológicas, existe um equilíbrio entre a formação e a degradação da homocisteína e cerca de 50% é remetilada em metionina. O excesso de homocisteína é exportado através da circulação, causando níveis elevados no plasma e na urina.

A homocisteína plasmática pode encontrar-se na forma livre (cerca de 20-30%), mas a maior parte (70-80%) encontra-se associada a proteínas plasmáticas, principalmente a albumina. A homocisteína plasmática livre pode ainda apresentar-se na forma oxidada, formando dois tipos de dissulfetos: dímeros de homocisteína ou dímeros de homocisteína-cisteína. Da fracção de homocisteína livre, 2 a 5% correspondem à sua forma reduzida. A homocisteína plasmática total (tHcy) é a soma de todas as formas livres e ligadas a proteínas.

Os níveis plasmáticos de tHcy podem variar numa vasta gama, enquanto os níveis intracelulares estão confinados a uma estreita gama (Moat et al. 2004). As

concentrações plasmáticas dependem dos vários hábitos alimentares dentro das populações e entre grupos pertencentes à mesma população.

Os valores de referência para homocisteína plasmática são de 6-12 mmol/L em mulheres e 8-14 mmol/L nos homens. Considera-se a existência de uma hiperhomocisteinémia moderada para valores entre 16 e 30 mmol/L, intermédia para valores entre 30 e 100 mmol/L e severa para valores de homocisteína plasmática superiores a 100 mmol/L (Cardoso, I., 2009).

Tabela 1-Factores que influenciam os níveis plasmáticos de homocisteína

Idade/sexo/estilo de vida
Aumento da idade
Género masculino
Pós menopausa
Falta de exercício
Tabagismo
Dieta
Deficiência de folato
Deficiência de Vitamina B12
Deficiência de Vitamina B6
Consumo de álcool
Consumo de café
Doença
Disfunção renal
Doença inflamatória no intestino
Hipotiroidismo
Hipertensão
Diabetes
Psoríase
Cancro
Transplantação renal
Drogas
Drogas antagonistas do folato (metotrexato, anticonvulsante, carbamazepina, fentoína)
Drogas antagonistas da Vitamina B12 e da Vitamina B6 (nitratos, teofilina,)

7.1 Hiperhomocisteinémia

A hiperhomocisteinémia é uma disfunção multifactorial, sendo que os seus níveis podem aumentar devido ao tabagismo, consumo de café e falta de exercício físico. Contudo, com o aumento da idade nos homens, tem-se verificado um aumento da concentração de homocisteína. Nas mulheres, o aumento da homocisteína é observado após a menopausa. A hiperhomocisteinémia moderada é comum em alcoólicos crónicos, contudo, a sua redução tem sido associada ao consumo moderado de álcool, provavelmente mediado pelo folato (Ubbink et al. 1998).

7.2 Mecanismos patogénéticos da hiperhomocisteinémia

A hiperhomocisteinémia está implicada numa vasta gama de desordens: dano vascular, comprometimento cognitivo, complicações na gravidez, complicações neurológicas e psiquiátricas e, doenças neoplásicas. Promove o dano oxidativo e a disfunção a nível do endotélio inibindo a sintase do óxido nítrico e subsequentemente decrescendo a biodisponibilidade do óxido nítrico. Em condições normais, o ácido nítrico destoxifica a homocisteína, formando S-nitroso-homocisteína, um vasodilatador. O excesso de homocisteína não é totalmente neutralizado pelo óxido nítrico mas é auto-oxidado em homocistina, produzindo radicais livres tóxicos para as células endoteliais. Normalmente a glutathione neutraliza os radicais livres, mas o excesso de homocisteína diminui a actividade da peroxidase da glutathione.

As causas mais comuns de hiperhomocisteinémia na população em geral estão relacionadas com defeitos genéticos na codificação de enzimas que estão envolvidas no metabolismo da homocisteína, podendo diminuir a sua actividade e, consequentemente provocar um aumento da concentração de homocisteína plasmática total (tHcy). A hiperhomocisteinémia genética é frequentemente resultado das deficiências heterozigóticas da cistationina- β -sintetase (CBS) e redutase do metilenotetrahidrofolato (MTHFR) (Obeid et al., 2006).

7.3 Polimorfismo no gene da redutase do Metilenotetrahidrofolato (MTHFR)

As alterações nos genes que codificam as enzimas envolvidas na regulação da homocisteína podem influenciar as suas concentrações. Os principais são os que codificam a metilenetetrahidrofolato redutase (MTHFR), cistationina-sintase (CBS) e metionina sintase (MTR) directamente envolvidos no metabolismo da homocisteína.

A MTHFR é uma enzima importante no metabolismo da homocisteína. Uma deficiência nesta enzima compromete a síntese normal de ADN e ARN, conduzindo à disfunção do SNC. Se for uma deficiência severa (20% de actividade normal) provoca desordem vascular e mental.

A mutação responsável pela geração da MTHFR alterada, é a substituição da C (citosina) pela T (timina) no nucleótido 677 (677C→T), a qual converte um resíduo de alanina num resíduo de valina, comprometendo o local de ligação com o ácido fólico que, uma vez não activo, dificulta a metabolização da homocisteína.

O polimorfismo MTHFR 677C→T é muito comum e aproximadamente 40% da população são homozigóticos para o alelo C677/C677, 45% são heterozigóticos C677/T677 e 15% são homozigóticos para o alelo mutado T677/T677.

Recentemente foi descoberto um segundo polimorfismo no gene da MTHFR, relacionado apenas com a diminuição da actividade da enzima. Este polimorfismo corresponde à transição da adenina (A) pela citosina (C) no nucleótido 1298 (1298A→C). Indivíduos homozigóticos para o alelo 1298C/1298C, têm uma actividade enzimática reduzida, porém em menor escala que os indivíduos com genótipo 677TT (Castro *et al.*, 2003).

8. Vitamina B12 e polimorfismo no gene TCN2

A vitamina B12 ou cobalamina é um nutriente essencial para os seres humanos, porque dois de seus derivados, a metilcobalamina e a adenosilcobalamina, actuam como coenzimas em reacções metabólicas importantes.

A metilcobalamina é um transportador citosólico de metilo na remetilação da homocisteína em metionina dependente do folato, reacção catalisada pela sintase da metionina. Na mitocondria, a adenosilcobalamina é necessária para a isomerização do

metilmalonil-CoA em succinil-CoA, reacção catalisada pela mutase do metilmalonil-CoA. Assim, a acumulação de homocisteína e o ácido metilmalónico são muitas vezes utilizados como biomarcadores na avaliação dos níveis de vitamina B12. Cerca de 30% da vitamina B12 em circulação está ligada à transcobalamina II e é referida como holotranscobalamina (holo-TC), representando a fracção biologicamente activa que é distribuída por todos os tecidos do corpo.

A proteína transcobalamina II (TC) é codificada pelo gene TCN2 codificado no cromossoma 22q12-13. O gene TCN2 é composto por nove exões separado por intrões e confere uma heterogeneidade considerável, tendo sido descritos mais de dez polimorfismos num único nucleótido (SNP). Um dos polimorfismos, o 776C>G, originando a substituição P259R, uma mutação “missense”, foi descrito como comum e pode potencialmente interferir com a disponibilidade intracelular de vitamina B12.

Diversos estudos têm sido realizados para avaliar possíveis associações entre o SNP no gene TCN2 e níveis plasmáticos de vitamina B12, folato, ácido metilmalónico ou homocisteína. Embora exista controvérsia, os factos mais consistentes indicam que os níveis de holo-TC são menores no plasma de indivíduos homozigóticos para o alelo 776G, que nos indivíduos com genótipo nativo (776CC) (Castro *et al.*, 2010)

9. Cortisol

O cortisol é a principal hormona glicocorticóide segregada pelo córtex supra-renal. As suas funções fisiológicas incluem a regulação do metabolismo dos hidratos de carbono e a distribuição de electrólitos e água. O cortisol tem também um efeito imunossupressor e anti-inflamatório. Em indivíduos normais, os níveis de cortisol são regulados através de um ciclo de *feedback* negativo em que o córtex supra-renal reage a níveis elevados de ACTH (hormona adrenocorticotrópica) aumentando a secreção de cortisol, enquanto a hipófise reage a níveis elevados de cortisol diminuindo a produção de ACTH. Os níveis de cortisol plasmático atingem valores mais elevados de manhã e as concentrações diminuem para cerca de metade ao fim do dia. A gravidez e o tratamento com estrogénios elevam acentuadamente os níveis de cortisol. O stress que é um factor de risco para a DA, induz a libertação deste glucocorticóide que vai afectar o cérebro a nível do hipocampo, que é a área que está associada à memória e aprendizagem, além disso, o stress leva ao aumento da excitotoxicidade causada pela activação dos receptores NMDA (Whitley *et al.*, 1994).

II. Objectivos

Após pesquisa bibliográfica constatou-se que a demência cognitiva tipo Alzheimer estaria associada à alteração de alguns parâmetros séricos, nomeadamente, homocisteína, ácido úrico, colesterol, proteínas inflamatórias de fase aguda (PCR), hormonas esteróides e algumas vitaminas. Assim, tendo em conta a influência de factores endócrinos, nutricionais e imunológicos na patogénese da Doença de Alzheimer, anteriormente expostos, o presente estudo tem como objectivo:

- Analisar os níveis séricos de cortisol, de homocisteína e alguns parâmetros imunológicos, num grupo de doentes com demência cognitiva tipo Alzheimer, comparativamente com um grupo controlo, realizados numa população da Cova da Beira;
- Analisar os níveis de alguns antioxidantes (vitaminas B12, Vitamina C) em doentes com demência cognitiva tipo Alzheimer e num grupo controlo;
- Analisar os polimorfismos no gene do MTHFR e do gene TCN2 em doentes com demência cognitiva tipo Alzheimer e num grupo controlo;
- Estudar as possíveis correlações entre os parâmetros bioquímicos, endócrinos e imunológicos analisados.

Tendo sido realizado o presente estudo, quase na sua totalidade no CHCB, houve um grande interesse em contactar com as diferentes secções do Laboratório de Patologia Clínica, nomeadamente, a Bioquímica, Imunologia, Hematologia e Microbiologia.

III. Materiais e Métodos

1. População em estudo

Os participantes deste estudo foram seleccionados de entre indivíduos utentes do Centro Hospitalar Cova da Beira através da realização de um inquérito (anexo 1). Assim, de modo a eliminar condições conhecidas que interferem com as concentrações no soro de homocisteína, cortisol, estrogénios e vitaminas, ambos, os pacientes e os controlos foram excluídos deste estudo se sofressem de hipertensão, doença cardiovascular, doença renal ou hepática, diabetes, hipo ou hipertiroidismo ou hipercolesterolemia, se eram fumadores, alcoólicos ou se tinham sido submetidos recentemente a cirurgia, ou se tinham tomado corticóides ou suplementos vitamínicos nos últimos dois meses. Os indivíduos que sofriam de malnutrição ou com sérias dificuldades em se alimentar foram excluídos deste estudo. Este inquérito teve como objectivo minimizar a interferência destes factores no estudo e é com base nele que se formou o grupo controlo (indivíduos sem demência cognitiva tipo Alzheimer) e o grupo teste (indivíduos com demência cognitiva tipo Alzheimer). Todas as mulheres estavam em fase pós-menopausa e não faziam terapia de substituição hormonal. As mulheres são consideradas em fase pós-menopausa quando têm pelo menos doze meses consecutivos de amenorreia.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e, os indivíduos voluntários deram o seu consentimento informado.

1.1. Grupo Controlo

O grupo controlo é constituído por 25 voluntários idosos saudáveis (18 do sexo feminino e 7 do sexo masculino), sem sintomas de perda de memória e sem sofrerem de doenças neurológicas. Alguns foram os familiares acompanhantes dos pacientes durante a consulta clínica no Departamento de Neurologia do Centro Hospitalar Cova da Beira. Os controlos foram incluídos no estudo após terem respondido ao inquérito (Anexo 1) e após terem sido submetidos a exames físicos e bioquímicos de rotina.

1.2. Grupo Teste

O grupo teste é constituído por 17 pacientes (8 do sexo feminino e 9 do sexo masculino), que foram seleccionados pelo Departamento de Neurologia do Centro Hospitalar Cova da Beira. O dano cognitivo foi avaliado através de vários testes,

incluindo o “Mini-Mental State Examination”. O diagnóstico foi baseado em exame neurológico e neurofisiológico e complementado com informação em neuro-imagens (TAC ao cérebro). O diagnóstico de demência tipo Alzheimer (DTA) foi realizado de acordo com o “National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke—Alzheimer's Disease and Related Disorders Association” para provável Doença de Alzheimer. Os pacientes com Doença cerebrovascular concomitante foram excluídos deste estudo.

1. Equipamentos

Equipamentos no C.H.C.B.

- Centrífuga Refrigerada, Jouan CR 412, IZASA

Analísadores automáticos:

- *Abbot AxSYM™ System* ,
- COBAS 6000, Roche
- Beckman Coulter LH 750 IZASA
- IMMULITE ®

Na U.B.I.

- Balança analítica Sartorius ® $\pm 0,01$ mg
- Banho termostaticado com sistema de agitação: Grant® OLS 200
- Espectrofotómetro: Ultrospec®3000 Pharmacia Biotech
- Potenciómetro medidor de pH: Metrohm®744 pH Meter
- Câmara de Fluxo Laminar (Câmara de Segurança Biológica Classe II tipo A1)

2. Colheita e conservação das amostras

As amostras de sangue do grupo controlo e do grupo teste foram colhidas entre as 8 horas e as 9:30 horas no Centro de Colheitas do C.H.C.B, num tubo seco sem anticoagulante para a obtenção do soro e num tubo com EDTA para a realização de hemograma.

- 1- Os tubos sem anticoagulante são centrifugados numa centrífuga a 4000rpm durante 15 minutos à temperatura de 10°C;



O soro obtido é separado em 3 alíquotas para a determinação dos parâmetros pretendidos:

- Uma alíquota é guardada a -80°C para a determinação da s100 β através de um kit comercial na UBI.
- Outra alíquota de 100 μ L é desproteïnizada e congelada a -80°C para a determinação da vitamina C pelo método enzimático na UBI;
- Outra alíquota com o restante volume de soro é utilizada para a determinação dos restantes parâmetros bioquímicos no C.H.C.B.

DESPROTEINIZAÇÃO:

As amostras de soro de 100 μ L são tratadas com igual volume de TCA 10% (m/v), agitadas no vortéx durante 30 segundos e posteriormente centrifugadas numa centrífuga a 1500g, durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante é transferido para tubos eppendorf de 1,5 mL e congelado a -80°C.

- 2- Os tubos com EDTA são para a realização de hemograma e, após isso é retirada uma alíquota 1,5 mL (mínimo 1mL) para a genotipagem do MTHFR e do TCN2. Devem ser guardadas no frigorífico durante algumas semanas mas não mais do que um mês.

3. Parâmetros clínicos analisados

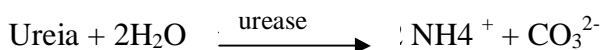
Os valores de todos os parâmetros analisados foram validados pelos respectivos controlos previamente introduzidos nos auto-analisadores.

4.1 Parâmetros Bioquímicos

4.1.1 Ureia

Os níveis séricos de ureia foram analisados recorrendo ao auto-analizador COBAS C, HITACHI 501 através de um método cinético com urease e glutamato desidrogenase. Este método baseia-se na hidrólise da ureia pela urease que dá origem a amónia e carbonato. Na segunda reacção, o 2-oxoglutarato reage com a amónia na presença de desidrogenase do glutamato (GLDH) e da coenzima NADH, dando origem a L-Glutamato. Nesta reacção, duas moles de NADH são oxidadas a NAD^+ por cada mole de ureia hidrolisada. A taxa de diminuição na concentração de NADH é directamente proporcional à concentração de ureia na amostra que é determinada medindo a absorvência a 340 nm.

Cinética da reacção:



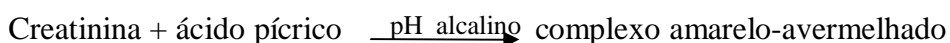
Reagentes:

- Cassete: COBAS[®], HITACHI, Ureia;
- Calibrador f.a.s.;
- Controlos de Qualidade: Precinorm[®] U e Precipath[®] U
- Reagente: Soluções de trabalho:
 - R1: NaCl a 0,9%
 - R2: Tampão TRIS, 2-oxoglutarato, NADH, ADP, urease (feijão frade), GLDL (fígado de bovino), conservante, estabilizadores não reactivos.

4.1.2 Creatinina

Os níveis séricos de creatinina foram analisados recorrendo ao auto-analizador COBAS C, HITACHI 501 através da reacção cinética de Jaffé tamponada sem desproteinização. É um método compensado para soro, plasma e urina humanos. Este método baseia-se no facto da creatinina, numa solução salina reagir com o picrato para formar um complexo amarelo-avermelhado. A taxa de formação do corante (intensidade da cor) é directamente proporcional à concentração de creatinina na amostra, determinada medindo o aumento da absorvência a 512 nm. As amostras de soro e plasma contêm proteínas que reagem não especificamente no método de Jaffé. Para compensação dos resultados de soro e plasma, os valores são corrigidos automaticamente em -18 µmol/L (-0,2 mg/dL).

Cinética da reacção:



Reagentes:

- Cassete: COBAS[®], HITACHI, Creatinine Jaffé Gen.2;
- Calibrador f.a.s.;
- Controlos de Qualidade: Precinorm[®] U e Precipath[®] U
- Reagente: Soluções de trabalho:
 - R1: tampão alcalino (frasco B) e os seus componentes activos são o hidróxido de potássio e fosfato, pH ≥ 13,5;

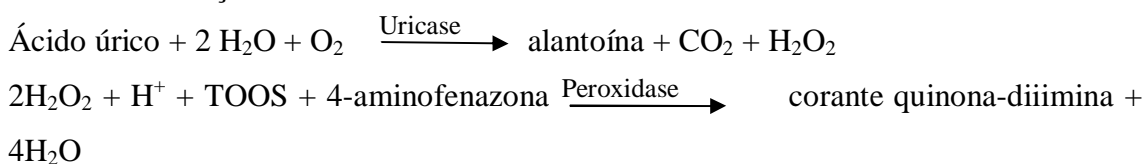
- R2/R3: ácido pícrico (frasco C). Os componentes activos são: ácido pícrico a pH =6,5. Este reagente contém um tampão não reactivo.

4.1.3 Ácido Úrico

O ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas no organismo humano. É um ácido fraco e na sua forma ionizada, o urato monossódico é a forma encontrada no plasma humano, no líquido plasmático extracelular no líquido sinovial.

Os níveis séricos de ácido úrico foram analisados recorrendo ao auto-analizador COBAS C, HITACHI 501 através de um ensaio colorimétrico enzimático. A base deste método é o facto de a uricase degradar o ácido úrico em alantoína e peróxido de hidrogénio. Na presença de peroxidase, a 4-aminofenazona é oxidada pelo peróxido de hidrogénio formando um corante diimino-quinona. A intensidade da cor da diimino-quinona formada é directamente proporcional à concentração de ácido úrico, que se determina medindo o aumento da absorvência a 552 nm.

Cinética da reacção:



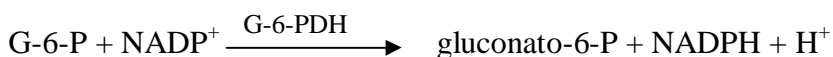
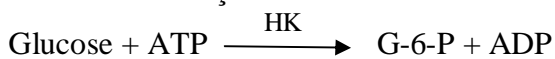
Reagentes:

- Cassete: COBAS[®], HITACHI, Ácido úrico ver.2;
 - Calibrador f.a.s.;
 - Controlos de Qualidade: Precinorm[®] U e Precipath[®] U
 - Reagente: Soluções de trabalho;
- R1: tampão fosfato; TOOS (N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilanalina); álcool gordo de poliglicoléter: 4,8%; ascorbato oxidase (EC 1.10.3.3 aboborinha), estabilizantes;
 - R2: tampão fosfato, hexacianoferrato de potássio (II), 4-aminofenazona a pH=7,8, uricase (EC 1.7.3.3.; Arthrobacter proptophormiae); peroxidase (POD) (EC 1.11.1.7; rábano); estabilizantes.

4.1.4 Glucose

Os níveis séricos de glucose foram analisados recorrendo ao auto-analizador COBAS C, HITACHI 501 através de um método enzimático de referência com hexoquinase. Este método baseia-se no facto da hexocinase (HK) catalizar a fosforilação da glucose pelo ATP dando origem a glucose-6-fosfato e ADP. Para prosseguir a reacção, uma segunda enzima, a desidrogenase da glucose-6-fosfato (G-6-PDH), é utilizada para catalisar a oxidação da glucose-6-fosfato pelo NADP^+ originando o NADPH. A concentração de NADPH formada é directamente proporcional à concentração de glucose que é determinada medindo o aumento da absorvência a 340 nm.

Cinética da reacção:



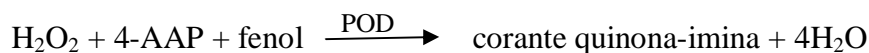
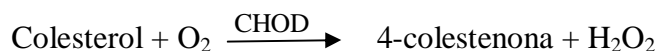
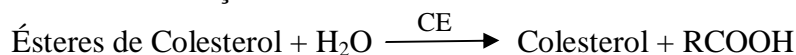
Reagentes:

- Cassete: COBAS[®], HITACHI, Glucose hexoquinase;
 - Calibrador f.a.s.;
 - Controlos de Qualidade: Precinorm[®] U e Precipath[®] U
 - Reagente: Soluções de trabalho;
-
- R1: tampão MÊS; Mg^{2+} ; ATP; NADP^+ ; conservante;
 - R2: tampão HEPES; Mg^{2+} HK (levedura); G-6-PDH (*E.coli*); conservante.

4.1.5 Colesterol Total

Os níveis séricos de colesterol total foram analisados recorrendo ao auto-analizador COBAS C, HITACHI 501 através de um método colorimétrico enzimático. A base deste método consiste no facto dos ésteres de colesterol serem clivados através da acção da esterase de colesterol (CE) e produzem colesterol livre e ácidos gordos. A oxidase do colesterol (CHOD) catalisa a sua oxidação para 4- colestenona e peróxido de hidrogénio. Na presença da peroxidase (POD), o peróxido de hidrogénio formado promove a ligação oxidativa do fenol e da 4-aminoantipirina, formando um corante vermelho de quinona-imina. A intensidade da cor do corante formado é directamente proporcional à concentração de colesterol, determinada medindo o aumento da absorvência a 512 nm.

Cinética da reacção:



Reagentes:

- Cassete: COBAS[®], HITACHI, Cholesterol Gen. 2;
- Calibrador f.a.s.;
- Controlos de Qualidade: Precinorm[®] U e Precipath[®] U; Precinorm[®] L e Precipath[®] L
- Reagente: Soluções de trabalho;
 - R1: tampão PIPES; Mg²⁺; colato de sódio; 4-aminofenazona; fenol; álcool gordo de poliglicoléter: 3%; esterase do colesterol (Pseudomonas spec); oxidase docolesterol (E.coli); peroxidase (rábano); estabilizantes; conservante.

4.2 Parâmetros metabólicos

4.2.1 Homocisteína

A determinação dos níveis séricos de L-homocisteína total foi efectuada recorrendo ao auto-analisador *Abbott AxSYM™ System*, através de um imunoensaio de fluorescência polarizada (FPIA). A base deste método consiste no facto da homocisteína ligada (forma oxidada) ser reduzida a homocisteína livre que é enzimaticamente convertida a S-adenosil-L-homocisteína (SAH) da seguinte forma:

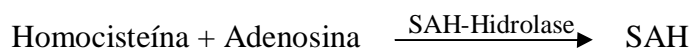
1-Redução: a homocisteína (Hcy-SS-Hcy), a mistura dissulfídrica da homocisteína (R1-SS-Hcy) e a homocisteína ligada às proteínas (Proteína-SS-Hcy), na amostra, são reduzidas à forma livre de homocisteína através do uso de Ditioneitol (DTT);

Hcy-SS-Hcy



Proteína-SS-Hcy

2-Conversão enzimática: a homocisteína livre é convertida em SAH pela utilização de hidrolase da SAH e excesso de adenosina.



Sob condições fisiológicas, a hidrolase da SAH converte a SAH em homocisteína. O excesso de adenosina na solução de pré-tratamento conduz a conversão de homocisteína a SAH pela SAH hidrolase bovina.

Procedimento:

A amostra e Reagentes *AxSYM*™ Homocisteína são pipetados na sequência seguinte:

Centro de pipetagem

- A amostra e todos os reagentes *AxSYM*™ Homocisteína necessários para um teste são pipetados pela sonda de amostra para várias cavidades da cuvete de reacção (Reaction Vessel- RV).
- A amostra, a solução de pré-tratamento, a solução 4 (diluyente) e a SAH hidrolase são pipetadas para uma cavidade da cuvete da RV

A RV é imediatamente transferida para o centro de processamento. As pipetagens adicionais são efectuadas no centro de processamento pela sonda de processamento.

Centro de processamento

- Uma alíquota da mistura de pré-diluição, anticorpos e solução 4 (diluyente) são transferidos para a cuvete de reacção.
- O marcador, a solução 4 e uma segunda alíquota da mistura de pré-diluição são transferidos para a cuvete.
- A SAH e o marcador de fluoresceína competem pelos locais de ligação na molécula do anticorpo monoclonal.
- A intensidade da luz fluorescente polarizada é medida pelo conjunto óptico FPIA.

4.3 Parâmetros vitamínicos

4.3.1 Vitamina B12

O doseamento por fixação para a determinação quantitativa *in vitro* da vitamina B12 em soro e plasma humanos, foi efectuado utilizando o auto-analisador Elecsys 2010, HITACHI, através do imunoensaio de electroquimioluminescência (ECLIA).

Este método baseia-se no princípio de competição utilizando um factor intrínseco específico da vitamina B12. A vitamina B12 na amostra compete com a vitamina B12 adicionada e marcada com biotina para os locais de ligação no complexo de factor intrínseco marcado com ruténio.

- 1ª Incubação: através da incubação da amostra (15µL) com as soluções de pré-tratamento 1 e 2 da vitamina B12, a vitamina B12 fixada é libertada;
- 2ª Incubação: através da incubação da amostra pré-tratada com factor intrínseco marcado com ruténio, forma-se um complexo de vitamina B12 e proteína de ligação, cuja quantidade depende da concentração do analito na amostra;
- 3ª Incubação: após incorporação das micropartículas revestidas de streptavidina e de vitamina B12 marcada com biotina, os pontos de fixação ainda vazios de factor intrínseco marcado com ruténio são ocupados, formando-se um complexo de factor intrínseco marcado com ruténio-vitamina B12 com biotina. O complexo formado liga-se à fase sólida pela interacção da biotina e da streptavidina.
- A mistura da reacção é aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eléctrodo. Os elementos não ligados são então removidos com ProCell. A aplicação de uma corrente eléctrica ao eléctrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador.
- Os resultados são determinados com base numa curva de calibração, que é construída especificamente pelo analisador por uma calibração de 2 pontos e uma curva principal incluída no código de barras do reagente.

4.3.2 Ácido fólico ou Folato

O doseamento por fixação para a determinação quantitativa do ácido fólico em soro e plasma humanos, foi efectuado utilizando o auto-analisador Elecsys 2010, HITACHI, através de imunoensaio.

- 1ª Incubação: através da incubação da amostra (25µL) com os reagentes 1 e 2 de pré-tratamento do folato, o folato fixado é libertado das proteínas de fixação do folato
- 2ª Incubação: através da incubação da amostra pré-tratada com a proteína de fixação do folato marcada com ruténio, forma-se um complexo de folato, cuja quantidade depende da concentração do analito na amostra;
- 3ª Incubação: após incorporação das micropartículas revestidas de estreptavidina e de folato marcado com biotina, os locais não ocupados da proteína de fixação marcada com ruténio, são ocupados formando-se ruténio-folato biotinizado. O complexo formado liga-se à proteína de fixação de fase sólida pela interacção da biotina e da streptavidina.
- A mistura da reacção é aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eléctrodo. Os elementos não ligados são então removidos com ProCell. A aplicação de uma corrente eléctrica ao eléctrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador.
- Os resultados são determinados com base numa curva de calibração, que é construída especificamente pelo analisador por uma calibração de 2 pontos e uma curva principal incluída no código de barras do reagente.

4.3.3 Vitamina C ou Ácido Ascórbico

Os valores de ácido ascórbico séricos foram determinados recorrendo a um método colorimétrico enzimático de ponto final. Este parâmetro foi analisado no laboratório de investigação no CICS da UBI.

O ácido ascórbico circulante na amostra de soro desproteínizado é selectivamente e completamente oxidado a ácido desoxiascórbico pela enzima oxidase do ascorbato (EC.1.10.3.3). Este composto reage com *o*-fenilenediamina (OPDA) para formar um

derivado quinoxalino, um cromóforo cuja absorvência é medida num comprimento de onda de 340nm.

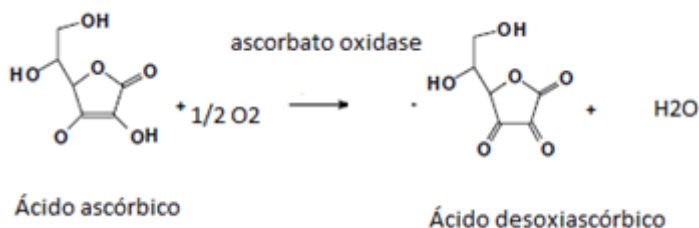


Ilustração 8-Reacção enzimática de oxidação do ascorbato com formação do desoxiascrobato (adaptado de Vislisl et al., 2007).

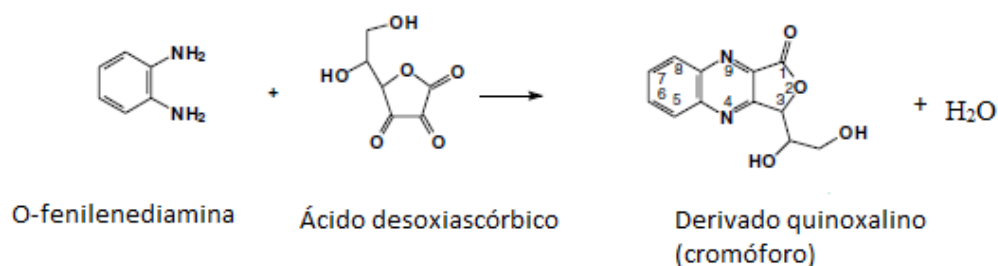


Ilustração 9-Reacção de condensação do desoxiascrobato com o O-fenilenodiamina (OPDA) (adaptado de Vislisl et al., 2007).

Reagentes:

Ácido ascórbico A5960, OPDA P1526, Oxidase do ascorbato A0157, DTT, Hidróxido de sódio foram todos obtidos pela *Sigma Chemical*®. O ácido clorídrico da *Riedel-Halein* ® .

Desproteínização com TCA:

As amostras de soro foram tratadas com igual volume de **solução de desproteínização 10% (m/v) de ácido tricloroacético (TCA)**. Após 15 minutos de centrifugação a 1500 g na Centrífuga Refrigerada *Jouan CR 412*®, o sobrenadante foi transferido para *eppendorf* ®e congelados a -80°C.

Uma **solução diluente de TCA (1:2)** foi elaborada a partir da solução de desproteínização 10% TCA e água ultra pura millipore, em igual proporção. Esta

solução foi utilizada para preparar as soluções padrão de ascorbato para a curva de calibração do método espectrofotométrico.

Método enzimático

Foi preparada uma **solução mãe de ácido ascórbico 2,84 mmol/L** e os respectivos padrões de ascorbato elaborados a partir desta, em duplicado, com as seguintes concentrações 5.0, 3.0, 2.0, 0.5, 0.2, 0.1 mg/dL. Utilizou-se como solvente a **solução diluente TCA (1:2)**.

Preparou-se uma **solução tampão fosfato (0,1 mol/L)** dissolvendo 13,94 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. pesadas na balança analítica *Sartorius®*, em 800 mL de água ultra-pura *millipore*. O pH da solução foi aferido com o potenciômetro *Metrohm ® 744 pH Meter* e ajustado a 6,5 com a solução de NaOH (5M) e solução de HCl (5M). Finalmente a solução foi diluída para 1.0L e armazenada a 4°C.

Uma **solução enzimática de oxidase do ascorbato (8U/mL) em tampão fosfato** foi preparada dissolvendo a respectiva massa de enzima liofilizada no volume adequado de tampão fosfato.

Análise espectrofotométrica

Em duplicado adicionaram-se 25 µL de cada amostra de soro desproteínizado ou de cada solução padrão de ascorbato, 100 µL de solução cromogénica e 5 µL de solução enzimática em tubos *eppendorf®* de 1,5 mL. Após homogeneização no vórtex com os tubos *eppendorf®* fechados, estes são então abertos e colocados num banho *Shaker Bath SBS 30-stuart Scientific®* com agitação ligada e cobertos com folha de alumínio. O período de incubação de cada *eppendorf®* foi de 5 minutos. Após esse tempo, o *eppendorf* foi retirado do banho, foi fechado e colocado num banho de água corrente até atingir a temperatura ambiente. Foi novamente ao vórtex e a leitura foi efectuada num espectrofotómetro *Ultrospec® 300 Pharmacia Biotech*, com comprimento de onda a 340 nm numa célula de quartzo de 100 µL.

Curva de calibração para o Ascorbato

Para o método de desproteínização do TCA no soro, foi elaborada uma recta de calibração para o ascorbato. Obteve-se a seguinte curva ilustrada no gráfico1.

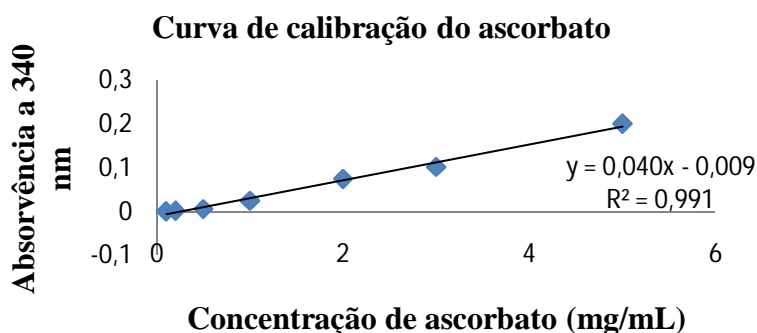


Ilustração 10- Representação gráfica da curva de calibração do ascorbato

A equação utilizada para o cálculo da concentração de vitamina C incorpora o respectivo factor de diluição utilizado no método. Assim, de acordo com a lei de Lambert-Beer tem-se a seguinte equação:

$$\text{Método TCA (50 } \mu\text{L de padrão) : [Ascorbato]} = 2 \times \frac{(\text{Abs} + 0,009)}{0,040}$$

Onde Abs = Absorvência

Para as leituras espectrofotométricas destinadas à construção da recta de calibração do ascorbato, foi necessário preparar em duplicado os seguintes ensaios:

P: 25 μL de solução padrão de ascorbato + 100 μL de solução cromogénia + 5 μL de solução de enzima.

Z: 25 μL de solução diluente + 100 μL de solução cromogénia + 5 μL de tampão fosfato (serviu para acertar o espectrofotómetro a zero).

Para as leituras espectrofotométricas das amostras, realizou-se novos ensaios:

Branco (B): 25 μL de amostra de soro + 100 μL de solução cromogénia + 5 μL de tampão fosfato

Zero (Z): 25 µL de solução diluente +100 µL de solução cromogénia + 5 µL de tampão fosfato (serviu para acertar o espectrofotómetro a zero).

Ensaio (E): 25 µL de amostra de soro +100 µL de solução cromogénia + 5 µL de solução de enzima.

No final foi descontado o valor de absorvência do branco às respectivas leituras das amostras de soro (E).

Assim,

Absorvência final: Abs. de E - Abs. de B

4.3 Parâmetros endócrinos

4.3.1 Cortisol

A determinação dos níveis séricos de Cortisol foi efectuada recorrendo ao auto-analisador *AxSYM™ System*, através da técnica de imunoensaio de fluorescência polarizada (FPIA). Os seus resultados são utilizados no diagnóstico e tratamento da disfunção da glândula supra-renal.

Procedimento:

A amostra e Reagentes *AxSYM™* Cortisol são pipetados na sequência seguinte:

Centro de pipetagem

- A amostra e todos os reagentes *AxSYM™* cortisol necessários para um teste são pipetados pela sonda de amostra para várias cavidades da cuvete de reacção (Reaction Vessel- RV).
- A amostra, o antisoro cortisol (anticorpos), a solução de pré-tratamento e a solução 4 (diluente) são pipetadas para uma cavidade da RV, constituindo a mistura de pré-diluição.
- São adicionadas à cuvete da RV mais solução de pré-tratamento e solução 4 (diluente).

- A RV é imediatamente transferida para o centro de processamento. Pipetagens adicionais são efectuadas no centro de processamento pela sonda de processamento.

Centro de processamento

- Uma alíquota da mistura de pré-diluição e solução 4 (diluyente) são transferidas para a cuvete da RV e é medida a intensidade do branco da amostra.
- Uma segunda alíquota da mistura de pré-diluição é transferida para a cuvete juntamente com o marcador de fluoresceína cortisol.
- O cortisol da amostra e o marcador de fluoresceína cortisol competem pelos locais de união da molécula de anticorpo.
- A intensidade da luz polarizada é medida pelo conjunto óptico do equipamento.

Reagentes:

- **Marcador de fluoresceína cortisol** em tampão surfactante e estabilizadores; Conservante: azida sódica.
- **Antisoro Cortisol** (rato, monoclonal e cabra, policlonal) em tampão com estabilizadores de proteínas. Conservante: azida sódica.
- **Solução de pré-tratamento-** Surfactante em tampão Tris; Conservante: azida sódica.
- **Solução de limpeza da sonda do AxSYM™-** 2% de hidróxido de tetraetilamónio (TEAH)
- **Solução diluyente-** 0,1 M de tampão fosfato; Conservantes: azida sódica e antimicrobiano
- Controlos e calibradores para cortisol.

4.3.2 Estradiol

A determinação dos níveis séricos de Estradiol foi efectuada recorrendo ao auto-analisador *Abbott AxSYM™ System*, através de um imunoensaio enzimático de micropartículas (MEIA).

Procedimento:

A amostra e Reagentes *AxSYM™ Estradiol* são pipetados na sequência seguinte:

Centro de pipetagem

- A amostra e todos os reagentes *AxSYM*™ Estradiol necessários para um teste são pipetados pela sonda de amostra para várias cavidades da cuvete de reacção (Reaction Vessel- RV).
- As amostras, as micropartículas revestidas de anticorpos anti-estradiol, o tampão de ensaio de estradiol e o diluente (solução 4) são combinados numa cavidade da RV. Esta é a mistura da reacção.
- O conjugado estrogénio: fosfatase alcalina é adicionada a uma segunda cavidade RV.

A RV é mediamente transferida para o centro de processamento. Pipetagens adicionais são efectuadas no centro de processamento pela sonda de processamento.

Centro de processamento:

- A mistura de reacção é incubada. O estradiol na amostra liga-se aos anticorpos anti-estradiol nas micropartículas formando um complexo antigénio-anticorpo.
- Após a incubação, uma alíquota da mistura de reacção é transferida para a célula matriz. As micropartículas ligam-se irreversivelmente à matriz de fibra de vidro.
- A célula matriz é lavada de forma a remover materiais não ligados.
- O conjugado estrogénio: fosfatase alcalina é então dispensada na célula matriz e incubado. A porção esteróide do conjugado liga-se aos locais disponíveis das micropartículas revestidas de anticorpos anti-estradiol
- A célula matriz é lavada de forma a remover materiais não ligados.
- O substrato, 4-metilumbeliferil-fosfato, é adicionado à célula matriz e o produto fluorescente é medido pelo sistema óptico do equipamento.

Reagentes:

- Conjugado estrogénio: fosfatase alcalina em tampão TRIS e estabilizadores de proteínas (bovinas) 0,5 µg/ml; Conservante: azida sódica.
- Micropartículas revestidas de anticorpos anti-estradiol (coelho, policlonal) em tampão TRIS e estabilizador de proteínas (bovinas); Conservante: azida sódica.
- Tampão de ensaio de estradiol: Tampão citrato de glicina contendo agente libertador e surfactantes; Conservante: agentes microbianos.

- Diluente de amostra contendo tampão TRIS com estabilizador de proteínas (bovinas); Conservante: azida sódica.
- Controlos e calibradores para estradiol.

4.3.3 Testosterona

OS níveis séricos de testosterona foram determinados recorrendo ao teste quantitativo automatizado nos aparelhos Vidas, através do método imunoenzimático por competição com detecção final por fluorescência (ELFA).

Procedimento:

- O cone de utilização única serve tanto de fase sólida como de suporte de pipetagem. Os outros reagentes da reacção imunológica estão prontos a ser utilizados e pré-repartidos na barrete.
- Todas as etapas do teste são realizadas automaticamente pelo aparelho. São constituídas por uma sucessão de ciclos de aspiração e dispensação do meio reaccional.
- A amostra é colhida e transferida para o poço que contém o conjugado que é um derivado de testosterona marcado com fosfatase alcalina. É efectuada uma competição entre, a testosterona presente na amostra e o derivado de testosterona do conjugado em relação aos locais de anticorpo específico anti-testosterona fixado no cone. As etapas de lavagem eliminam os componentes não fixados.
- Durante a etapa final de revelação, o substrato (4-metil-umbeliferil fosfato) é aspirado e dispensado pelo cone; a enzima do conjugado catalisa a reacção de hidrólise deste substrato num produto (4-metil-umbeliferona) cuja fluorescência emitida é medida a 450nm. O valor do sinal de fluorescência é inversamente proporcional à concentração do antigénio presente na amostra.
- Terminado o teste, os resultados são calculados automaticamente pelo VIDAS em relação à curva de calibração memorizada e impressos.

Reagentes

- Conjugado: derivado de testosterona marcado com fosfatase alcalina, soro de novilho, gelatina (porcina), agentes de libertação e azida sódica;

- Tampão de lavagem: Tris-NaCl e azida sódica;
- Tampão de lavagem: dietanolamina e azida sódica;
- Calibrador Test: S1, constituído por soro humano, testosterona e conservantes;
- Controlo Test: C1, constituído por soro humano, testosterona e conservantes.

4.4 Parâmetros inflamatórios:

4.4.1 Proteína C-reactiva

O doseamento quantitativo da Proteína C-reactiva (PCR) foi realizado no analisador IMMULITE®, que utiliza uma técnica de imunoquimioluminescência em fase sólida.

As amostras de soro foram pré-diluídas de 1:101. Ou seja, 10 µL de amostra em 1000µL de diluente de amostras de PCR.

Procedimento:

- A mistura de reacção é incubada. A PCR na amostra liga-se aos anticorpos anti-PCR nas micropartículas formando um complexo antígeno-anticorpo, originando a formação de agregados insolúveis que provocam turvação.

Reagentes:

- Unidade de teste de PCR identificada com código de barras: contém uma pérola revestida com anti-ligando;
- Reagente de PCR: anticorpo monoclonal de murino anti-PCR marcado com ligando e fosfatase alcalina (intestino de bezerro) conjugado com anticorpo policlonal de coelho anti-PCR em tampão;
- Diluente de amostra para PCR: matriz de proteína/tampão livre de PCR, com conservante (azida de sódio);
- Controlos e calibradores para PCR;
- Substrato quimioluminescente;
- Solução de lavagem.

4.5 Parâmetros Imunológicos

4.5.1 Leucócitos e Linfócitos

A contagem das cinco classes leucocitárias, entre as quais se encontram os linfócitos, foi realizada no autoanalisador *Coulter*® LH 750, baseando-se na técnica de citometria de fluxo com tecnologia VCS (volume, Condutividade e Dispersão de luz laser). A tecnologia VCS é específica para determinar a fórmula leucocitária, utilizando três tecnologias diferentes, que se completam e permitem a diferenciação das células em cinco subpopulações e, a detecção de populações anormais (linfócitos atípicos, blastos, granulócitos imaturos, entre outros).

O princípio de Coulter permite fazer uma contagem diferencial das células, por detecção e medição das alterações eléctricas quando a célula passa por uma solução condutora, com sensor. O sensor consiste num tubo de cristal aberto numa extremidade e com um pequeno orifício no outro extremo. Para detectar a presença de uma célula, o tubo enche-se com a solução de elevada condutividade eléctrica utilizada na diluição da amostra (LH 700 series diluente).

Reagentes:

- LH 700 series diluente
- Lyse III DIFF- reagente hemolisante para a contagem de leucócitos e a determinação da hemoglobina
- LH 700 series pack- pack de reagentes que se utilizam para a realização da fórmula leucocitária:
 - Erytrolyse: ácido fórmico 1,2 mL/L; Agente humidificador 0,3-1,5 g/L.
- Stabilyse: Carbonato de sódio 6,0 g/L; Cloreto de sódio 14,5 g/L; Sulfato de sódio 31,3 g/L.
- Clenz- solução de limpeza.

4.6 S100 β

Para a determinação da S100 β humana através do método de Elisa, foi utilizado um kit comercial da marca Abnova.

Reagentes:

- Microplaca com 96 poços revestida com anticorpo policlonal de vaca anti- S100 β

- Anticorpo monoclonal anti- S100 β marcado com biotina Concentrado (100x)
- Conjugado de Estreptavidina
- Padrão de S100 β
- Diluente de anticorpo-biotina
- Tampão de diluição
- Solução de lavagem concentrada (10x)
- Solução de substrato de tetrametilbenzidina (TMB)
- Solução de paragem

Procedimento:

Uma vez que foram utilizadas amostras de soro humano e, que o kit também utiliza componentes de origem humana, foi necessária a utilização de uma câmara de modo a promover a esterilização e não haver contaminações (ver anexo 2)

No teste de Elisa para avaliar a S100 β humana, os padrões e amostras são incubados nos poços das microplacas pré-revestidas com o anticorpo policlonal de vaca anti- S100 β . Após 120 minutos de incubação com agitação de 300 rpm e, terem sido lavados com tampão de lavagem (3 vezes) os poços da microplaca, adiciona-se nos poços o anticorpo monoclonal anti-S100 β marcado com biotina e volta novamente a incubar durante 60 minutos com agitação. Lava-se novamente (5 vezes) e adiciona-se o conjugado de Estreptavidina. Após 30 minutos de incubação e o último passo de lavagem (5 vezes), o conjugado remanescente vai reagir com a solução de substrato (TMB-tetrametilbenzidina). Incuba novamente durante 10 minutos sem agitação

A reacção pára quando se adiciona a solução acídica de paragem e a absorvência do produto amarelo resultante é medida num leitor de microplacas com filtro de 450 ± 10 nm e com comprimento de onda de referência a 630 nm. A absorvência é proporcional à concentração de S100 β . A curva de calibração é construída através dos pontos dos valores de absorvência em função das concentrações dos padrões.

Obteve-se assim a respectiva curva de calibração como se observa na fig.

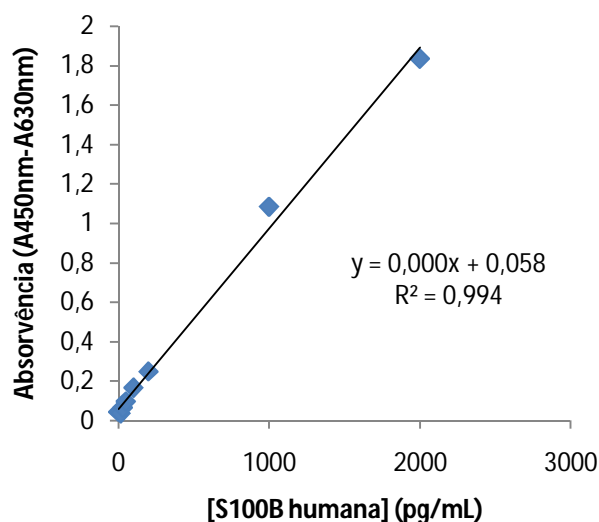


Ilustração 11-Representação gráfica da curva de calibração da S100β.

4.7 Análise genética do polimorfismo no gene da MTHFR e da TCN2

O DNA genómico foi isolado dos leucócitos do sangue periférico e as mutações no gene MTHFR 1298A→C foram analisadas por PCR-RFLP. Resumidamente, incubou-se 500 ng de DNA genómico, com um volume de reacção de 50 µL obtendo-se assim concentrações finais de 500 nM de *primers*. Utilizaram-se 200 µM de cada dNTP; 10 mM de Tris-HCl a pH 8,3; 50 mM de KCl; 2mM de MgCl₂, detergente a 0,05% e Taq polimerase do DNA 1U (*Life Technologies*). As condições do PCR foram optimizadas para o aparelho Omnigene (Hybaid) e, este inclui a desnaturação a 94°C, o anelamento a 55°C com extensão a 72°C. A variante do polimorfismo 1298A→C elimina um sítio de ligação. Após digestão enzimática de restrição, os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel.

Para o gene TCN2, isolou-se o DNA genómico dos leucócitos do sangue periférico e, para analisar o polimorfismo 776 C→G realizou-se uma hidrólise enzimática com ScrF1, após amplificação *in vitro* da região alvo no exão 6 do gene TCN2.

5. Análise Estatística

A análise estatística foi efectuada utilizando o software SPSS 13,0 e o Microsoft Office Excel 2007. Para avaliar diferenças entre grupos, foi utilizado o teste t-Student ou Mann-Whitney consoante a distribuição era paramétrica ou não paramétrica. As correlações entre parâmetros foram analisadas pelos testes de correlação de Pearson ou

de Spearman. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados foram apresentados em média \pm erro padrão da média (SEM).

IV Apresentação dos resultados e discussão

Para simplificar a interpretação, os resultados são apresentados segundo os diferentes parâmetros avaliados nas respectivas tabelas. Dentro de cada parâmetro efectuou-se uma sub-divisão consoante o género (M) e (F). Todos os resultados são acompanhados pelas respectivas média \pm erro padrão da média (SEM).

4.1. Caracterização das amostras

A amostra do presente estudo era constituída por 42 indivíduos e, formaram-se dois grupos, o de doentes de Alzheimer e o que não possuía essa patologia. Assim, o primeiro grupo designa-se por **grupo teste**, constituído por 17 pacientes (9 mulheres e 8 homens). O segundo grupo foi designado por **grupo controlo**, sendo constituído por 25 indivíduos (18 mulheres e 7 homens).

4.2. Sexo

O grupo controlo deste estudo era constituído por 25 indivíduos e, subdividiu-se em 18 mulheres e 7 homens. O grupo teste deste estudo era constituído por 17 indivíduos e, subdividiu-se em 9 mulheres e 8 homens.

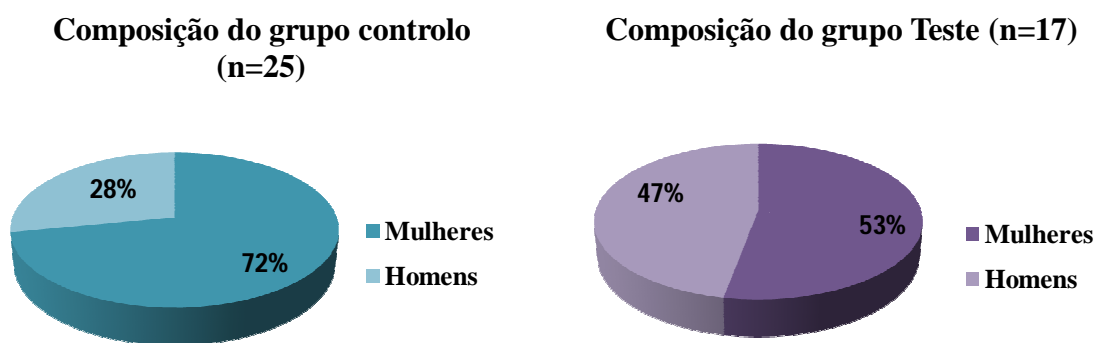


Ilustração 12-Representação gráfica da composição do grupo controlo e do grupo teste em função do género.

4.3. Idade

O parâmetro idade foi analisado uma vez que é considerado o maior factor de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer. Estudos realizados sugerem que vários parâmetros parecem alterar-se com o aumento da idade, nomeadamente, o

colesterol, ácido úrico e a concentração plasmática de homocisteína. No entanto, as hormonas esteróides (estrogénios e testosterona) diminuem com o avanço da idade. Assim, a idade foi estudada de modo a entender se as alterações subjacentes a esta também estariam associadas à progressão da doença de Alzheimer.

Tabela 2-Idade (anos) em grupos e géneros

	Idade (anos)				
	Grupo controlo		Grupo teste		P(Teste-t)*
Género	N	Média±SEM	n	Média±SEM	
Masc	7	73,00±3,6	8	76,13±2,90	0,185
Fem	18	69,83±2,03	9	74,67±2,81	0,293
Total	25	70,72±1,75	17	75,35±1,97	0,087

*Teste t-student

A análise estatística demonstrou a não existência de diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre o grupo controlo e o grupo teste em ambos os sexos, uma vez que os valores de P obtidos foram: para o género masculino $P=0,185$ e para o género feminino $P=0,293$. Também não se observou a existência de diferença estatística significativa entre os grupos teste e controlo considerando a totalidade dos indivíduos ($P=0,087$). Assim, podemos concluir que a idade não constitui um parâmetro de influência nas variáveis impostas para este estudo.

4.4. Índice de massa corporal

O Índice de Massa Corporal (IMC), dado pelo peso (Kg)/ altura² (m) é a medida mais utilizada em estudos de grupos populacionais para classificação do estado nutricional. Deste modo pretende-se avaliar ambos os grupos (teste e controlo) de modo a não existirem diferenças significativas na análise dos resultados.

Tabela 3- IMC (Kg/m) em grupos e géneros

	IMC (Kg/m)				
	Grupo controlo		Grupo teste		P(Teste-t)*
Género	n	Média±SEM	n	Média±SEM	
Masc	7	28,80±2,48	7	23,41±1,06	0,080
Fem	1	24,03±0,88	6	23,09±0,69	0,415
Total	25	25,37±1,01	13	23,26±0,63	0,086

*Teste t-student

A análise estatística demonstrou a não existência de diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre o grupo controlo e o grupo teste em ambos os sexos, uma vez que os valores de P obtidos foram: para o género masculino $P=0,087$ e para o género feminino $P=0,995$. Também não se verificou a existência de diferença estatística significativa entre os grupos teste e controlo ($P=0,086$). Assim, podemos concluir que o IMC não constitui um parâmetro de influência nas variáveis impostas para este estudo.

5. Parâmetros bioquímicos

5.1. Ureia

Tabela 4- Ureia (mg/dL) em grupos e géneros

Ureia (mg/dL)					
Género	Grupo controlo		Grupo teste		P(Teste-t)*
	n	Média±SEM	n	Média±SEM	
Masc	7	34,34±2,50	8	43,57±3,70	0,061
Fem	18	37,70±1,21	9	38,13±5,02	0,936
Total	25	36,76±1,13	17	40,69±3,15	0,255

*Teste t-student

Por comparação dos valores obtidos com os valores de referência da ureia, que são 17-50 mg/dL, verifica-se que no grupo teste masculino há uma maior aproximação do limite superior do intervalo de referência, quando comparado com o grupo controlo masculino. Assim, verifica-se que no grupo teste masculino (GTM), os valores de ureia são 43,57 e no grupo controlo masculino (GCM) são 34,34, esta diferença pode ser devida aos pacientes com doença de Alzheimer serem mais propícios a disfunção renal que os controlos, apresentando assim valores de ureia mais elevados ou uma menor eficiência renal poderá contribuir para factor de risco de DA. Através da análise estatística verificou-se que não existe diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre o grupo controlo masculino e o grupo teste masculino, no entanto parece haver tendência para que os níveis de ureia sejam mais elevados no grupo teste ($P=0,061$).

Também se verifica que os valores de ureia no grupo teste feminino (GTF) se apresentam mais elevados do que no grupo controlo feminino (GCF). Contudo, a nível da estatística não há diferença estatisticamente significativa entre eles, uma vez que $P > 0,05$. Entre os grupos controlo e o grupo teste não se verificou diferença estatisticamente significativa, uma vez que $P=0,255$. Valores de creatinina e ureia elevados, podem indicar uma disfunção renal.

5.2. Creatinina

Tabela 5- Creatinina (mg/dL) em grupos e géneros

Creatinina (mg/dL)					
Género	n	Grupo controlo		Grupo teste	
		Média±SEM	n	Média±SEM	P(Teste-t)*
Masc	7	0,96±0,47	8	0,88±0,83	0,374
Fem	18	0,79±0,28	9	0,78±0,43	0,736
Total	25	0,84±0,028	17	0,82±0,45	0,723

*Teste t-student

Por comparação dos valores obtidos com os valores de referência da creatinina, que são 0,5-1,0 mg/dL para as mulheres e para os homens de 0,9-1,4 mg/dL, observa-se que pelos valores da média de todos os grupos se encontram dentro dos valores de referência.

Pela análise estatística verificou-se que não existe diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$) entre os grupos controlo e teste em ambos os sexos. Para o grupo feminino foi de $P=0,736$ e para o grupo masculino foi de $P=0,374$. Assim, podemos concluir que a creatinina constitui um parâmetro sem influência neste estudo.

5.3. Ácido úrico

Tabela 6- Ácido úrico (mg/dL) em grupos e géneros

Ácido úrico (mg/dL)					
Género	n	Grupo controlo		Grupo teste	
		Média±SEM	n	Média±SEM	P(Teste-t)*
Masc	7	5,43±0,37	8	5,43±0,66	0,991
Fem	18	4,22±0,16	9	4,28±0,25	0,830
Total	25	4,56±0,19	17	4,82±0,35	0,513

*Teste t-student;

Por comparação dos valores obtidos com os valores de referência do ácido úrico que, para as mulheres é de 0,0-5,7 mg/dL e para os homens de 0,0-7,0 mg/dL, verifica-se que os valores da média de todos os grupos estão dentro dos valores de referência.

Através da análise estatística verificou-se que não há diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$) entre os grupos controlo e teste em ambos os sexos, considerando que os valores de P obtidos foram: para o género feminino $P=0,830$ e para o género masculino $P=0,991$.

Comparando os valores das médias obtidos entre o grupo teste (GT) e o grupo controle (GC) também não se observou diferença estatisticamente significativa.

5.4. Glicose

Tabela 7- Glicose (mg/dL) em grupos e gêneros

Glicose (mg/dL)					
Grupo controle			Grupo teste		
Gênero	n	Média±SEM	n	Média±SEM	P(Teste-t)*
Masc	7	99,41±3,41	8	96,75±4,32	0,637
Fem	18	90,90±2,04	9	88,41±2,74	0,477
Total	25	93,28±,88	17	92,33±2,63	0,771

*Teste t-student

Por comparação dos valores obtidos com os valores de referência da glicose, que são 70-100 mg/dL, observa-se que os valores da média de todos os grupos estão dentro dos valores de referência.

Através da análise estatística verificou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos, uma vez que os valores de P obtidos foram: para o grupo masculino P = 0,637 e para o grupo feminino P = 0,477. Assim, conclui-se que a glicose é um parâmetro sem influência neste estudo.

5.5. Colesterol total

Vários estudos sugerem que os níveis elevados de colesterol podem estimular a formação e deposição do péptido β A (Sjogren, 2006). Assim, tem-se verificado que a partir dos 65 anos de idade os níveis de colesterol tendem a diminuir nos homens e a aumentar nas mulheres em pós-menopausa. Assim, é de interesse averiguar os níveis de colesterol desta população a fim de averiguar uma possível ligação com a doença de Alzheimer.

Tabela 8- Colesterol total (mg/dL) em grupos e gêneros

Colesterol total (mg/mL)					
Grupo controle			Grupo teste		
Gênero	n	Média±SEM	n	Média±SEM	P(Teste-t)*
Masc	7	183,75±3,60	8	188,35±7,81	0,605
Fem	18	179,74±5,49	9	208,29±11,14	0,040
Total	25	180,86±4,05	17	198,90±7,18	0,038

*Teste t-student

Comparando os valores obtidos com os valores de referência do colesterol total que é, 100-200 mg/dL, observa-se que os valores da média do GCM-GTM encontram-se dentro dos intervalos de referência. Contudo, o GTF tem os seus valores de média fora dos valores de referência, apesar da média do GC e do GT estar dentro dos valores de referência. Assim, a nível estatístico observou-se que existe diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre os grupos controlo e teste no sexo feminino com $P = 0,040$ e nos GC e GT com $P = 0,038$. No entanto, no GCM-GTM não existe diferença estatisticamente significativa com $P = 0,605$. Estes resultados são de esperar, uma vez que estudos realizados indicam que o colesterol total se encontra mais elevado nas mulheres pós-menopausa e com idade > 65 anos, enquanto que tem tendência a diminuir nos homens com a idade (Sjogren, 2006). Também sugere que elevados níveis de colesterol constituem factor de risco de DA, especialmente nas mulheres.

6. Parâmetros metabólicos

6.1. Homocisteína

A homocisteína foi analisada, uma vez que é considerada como factor de risco para a Doença de Alzheimer, por estar relacionada com a degeneração neuronal, contribuindo para o aumento do stress oxidativo, danos no ADN, apoptose e excitotoxicidade (Obeid *et al.*, 2006).

Tabela 9- Homocisteína (μM) em grupos e géneros

		Homocisteína (μM)			
		Grupo controlo		Grupo teste	
Género	n	Média±SEM	n	Média±SEM	P(Teste-t)*
Masc	7	12,75±1,2	8	14,17±1,97	0,551
Fem	18	10,77±0,80	9	13,03±0,70	0,047
Total	25	11,327±0,68	15	13,645±1,08	0,081

*Teste t-student

Comparando os valores obtidos com os valores de referência da homocisteína que é, 5,90-16,00 mg/dL nas mulheres e 3,36-20,44 mg/dL nos homens, observa-se que os valores da média de todos os grupos encontram-se dentro dos intervalos de referência. Observa-se que os valores de média do GCM e GTM se encontram mais elevados que nos GCF e GTF.

Através da análise estatística observou-se a existência de uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre os grupo teste e controlo feminino com $P = 0,047$. Por outro lado, ao analisar a totalidade dos indivíduos parece haver tendência ($P = 0,081$) de aumento de Hcy nos doentes.

Podemos assim afirmar, que de acordo com estudos realizados sabe-se que os níveis de homocisteína são mais elevados nos homens que nas mulheres devido à sua maior massa muscular (Ueland *et al.*, 2001). Nas mulheres, o aumento dos níveis plasmáticos de homocisteína verifica-se na fase pós-menopausa (Trabetti E., 2008).

Assim, de acordo com o presente estudo, níveis mais elevados de homocisteína poderão constituir um factor de risco de DA, pelo menos nas mulheres estes resultados estão de acordo com estudos anteriores (Trabetti E., 2008).

7.0. Parâmetros endócrinos

7.1. Estradiol

Tabela 10-Estradiol (pg/mL) em grupos e géneros

		Estradiol (pg/mL)			
Género	n	Grupo controlo		Grupo teste	P(Teste-t)*
		Média±SEM	n	Média±SEM	
Masc	7	49,71±4,08	8	35,25±6,35	0,080
Fem	18	19,00±1,72	9	11,44±3,02	0,049
Total	25	27,60±3,25	17	22,64±4,42	0,374

*Teste t-student

Comparando os valores obtidos com os valores de referência do estradiol que para as mulheres em pós menopausa são 0-41 pg/mL e 0-77 pg/mL nos homens, observa-se que os valores da média de todos os grupos encontram-se dentro dos intervalos de referência e, os homens apresentam níveis mais elevados do que as mulheres.

Considerando o valor de P obtidos para o grupo masculino (P = 0,080) e para o grupo feminino (P = 0,049), verifica-se que há diferença estatisticamente significativa entre os grupos controlo e grupo teste no sexo feminino mas não no grupo masculino, embora também haja uma tendência. No entanto entre o grupo teste e o grupo controlo não há diferença estatisticamente significativa (P = 0,374), o que pode ser uma consequência dos valores das mulheres serem inferiores aos dos homens e haver bastantes mais mulheres no grupo controlo do que homens, o que tende a diminuir a diferença entre GT e GC.

Tem sido demonstrado que os estrogénios são capazes de interagir e aumentar a actividade antioxidante da glutathiona (GSH) e diminuir a formação de radicais livres a

nível mitocondrial para prevenir o dano oxidativo pela A β e outros agentes oxidativos (Maccioni R., 2001).

Os parâmetros endócrinos estradiol, cortisol e testosterona foram analisados, uma vez que vários estudos apontam para o facto dos estrogénios, nomeadamente o estradiol conferir um efeito protector nas doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (Cascalheira *et al.*, 2009).

Verifica-se que após a menopausa, os níveis de estradiol diminuem acentuadamente e, pensa-se que este facto possa estar relacionado com a propensão das mulheres a desenvolver doença de Alzheimer. Além disso os estrogénios têm um papel protector na prevenção da doença de Alzheimer, uma vez que estimulam os neurónios colinérgicos.

7.2. Cortisol

Tabela 11-Cortisol ($\mu\text{g/mL}$) em grupos e géneros

		Cortisol ($\mu\text{g/mL}$)			
		Grupo controlo		Grupo teste	
Género	n	Média \pm SEM	n	Média \pm SEM	P(Teste-t)*
Masc	7	15,76 \pm 1,36	8	16,69 \pm 1,75	0,684
Fem	17	14,98 \pm 1,02	9	19,06 \pm 0,78	0,004
Total	24	15,21 \pm 0,81	17	17,94 \pm 0,94	0,034

*Teste t-student

Comparando os valores obtidos com os valores de referência do cortisol que são 4,2-38,4 $\mu\text{g/mL}$, observa-se que os valores da média de todos os grupos encontram-se dentro dos intervalos de referência.

Considerando os valores de P obtidos para o grupo feminino (P=0,004) e para o grupo controlo (P=0,034), verifica-se que há diferença estatisticamente significativa entre os grupos teste e controlo e entre o grupo feminino, mas não no grupo masculino. Assim, de acordo com o presente estudo, os níveis mais elevados de cortisol poderão constituir um factor de risco de DA, pelo menos nas mulheres estes resultados estão de acordo com estudos anteriores (Cascalheira *et al.*, 2009).

7.3. Testosterona

Tabela 12-Testosterona (ng/mL) em grupos e géneros

	Testosterona (ng/mL)				
	Grupo controlo		Grupo teste		P(Tests-t)*
Género	n	Média±SEM	n	Média±SEM	
Masc	7	4,25±0,34	8	4,47±0,74	0,799
Fem	18	0,26±0,04	9	0,32±0,06	0,383
Total	25	1,89±0,37	17	2,55±0,61	0,227

*Teste t-student

Comparando os valores obtidos com os valores de referência da testosterona que para as mulheres são 0,1-0,9 ng/mL e 3,0-10,6 ng/mL nos homens, observa-se que os valores da média de todos os grupos encontram-se dentro dos intervalos de referência.

Considerando o valor de P obtidos para o grupo masculino ($P = 0,799$) e para o grupo feminino ($P = 0,383$), a análise estatística evidenciou que não existe diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre os grupos controlo e teste em ambos os sexos nem existe diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste ($P = 0,227$). Assim, podemos afirmar que a testosterona constitui um parâmetro que não influenciou no estudo, apesar dos valores da média do grupo teste serem superiores aos do grupo controlo, o que seria de esperar, uma vez que os dados referidos estão de acordo com a bibliografia em que existe um pequeno aumento não significativo em doentes com doença de Alzheimer (Maccioni R., 2001).

8. Parâmetros vitamínicos

A nutrição parece ser um factor que pode desempenhar um papel protector na Doença de Alzheimer (Nourhashémi *et al.*, 2000).

O metabolismo da homocisteína depende das vitaminas do complexo B, nomeadamente a cobalamina (vitamina B12), piridoxina (vitamina B6) e ácido fólico. Baixos níveis destas vitaminas assim como mutações no gene MTHFR e deficiência da função renal estão associados a um aumento de homocisteinémia, sendo um factor de risco de DA (Casalheira *et al.*, 2009).

8.1. Vitamina B12

Tabela 13- Vitamina B12 ($\mu\text{g/mL}$) em grupos e géneros

Vitamina B12 ($\mu\text{g/mL}$)					
Género	n	Grupo controlo		Grupo teste	
		Média \pm SEM	n	Média \pm SEM	P(Teste-t)*
Masc	7	427,84 \pm 50,71	8	347,60 \pm 62,77	0,339
Fem	18	504,86 \pm 43,94	7	498,85 \pm 64,69	0,940
Total	25	483,29 \pm 34,85	17	418,18 \pm 47,90	0,281

*Teste t-student

Comparando os valores obtidos com os valores de referência da vitamina B12 (197,0-866,0 pg/dL), observa-se que os valores da média de todos os grupos encontram-se dentro dos intervalos de referência.

Após a análise estatística das concentrações de Vitamina B12 obtidas verificou-se que não há diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre os grupos, uma vez que para o grupo feminino o valor de $P=0,940$ e para o masculino, o valor de $P=0,339$. Entre o grupo controlo e o grupo teste também não se verificou diferença estatisticamente significativa ($P=0,281$), podendo indicar que a vitamina B12 constitui um parâmetro que não influenciou o estudo, apesar dos valores de média do GT serem inferiores aos do GC.

Segundo a bibliografia, os Doentes de Alzheimer normalmente têm baixos níveis de concentrações plasmáticas de vitaminas, particularmente a vitamina B12. Tem sido descrito que deficiência de folato, vitamina B12 ou vitamina B6 estão associadas a um aumento da concentração plasmática de homocisteína (Nourhashémi *et al.*, 2000).

8.2. Ácido fólico

Tabela 14- Ácido fólico (ng/mL) em grupos e géneros

Ácido fólico (ng/mL)					
Género	n	Grupo controlo		Grupo teste	
		Média \pm SEM	n	Média \pm SEM	P(Teste-t)*
Masc	7	9,75 \pm 1,20	8	9,06 \pm 1,52	0,727
Fem	18	10,30 \pm 0,78	9	12,19 \pm 1,41	0,265
Total	25	10,15 \pm 0,65	17	10,72 \pm 1,07	0,655

*Teste t-student

Comparando os valores obtidos com os valores de referência do ácido fólico (3,1-17,5 ng/mL), observa-se que os valores da média de todos os grupos encontram-se dentro dos intervalos de referência.

Após a análise estatística das concentrações de ácido fólico obtidas verificou-se que não há diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre os grupos, uma vez que para o grupo feminino o valor de $P=0,265$ e para o masculino, o valor de $P=0,727$. Entre o grupo controle e o grupo teste também não se verificou diferença estatisticamente significativa com valor de $P=0,655$, apesar dos valores da média \pm SEM serem superiores no grupo teste.

A deficiência de vitamina B12, deficiência de ácido fólico, ou ambos, podem levar à redução de resíntese da metionina em S-adenosilmetionina, que por sua vez pode restringir a disponibilidade dos grupos metilo que são essenciais para a integridade da mielina e metabolismo de neurotransmissores como a acetilcolina e fosfolípidos da membrana. Esta suposta hipometilação pode perturbar alguns aspectos do metabolismo do cérebro, que pode ser responsável pelo desenvolvimento de comprometimento cognitivo, podendo conduzir à doença de Alzheimer (Nourhashémi *et al.*, 2000).

8.3. Vitamina C

Tabela 15- Vitamina C (mg/dL) em grupos e gêneros

		Vitamina C (mg/dL)			
		Grupo controle		Grupo teste	
Gênero	n	Média \pm SEM	n	Média \pm SEM	P(Teste-t)*
Masc	6	0,91 \pm 0,38	10	0,94 \pm 0,14	0,362
Fem	16	0,56 \pm 0,12	13	0,59 \pm 0,17	0,869
Total	22	0,66 \pm 0,14	23	0,64 \pm 0,14	0,588

*Teste t-student

Na tabela encontram-se discriminados os resultados obtidos para os níveis séricos de vitamina C (mg/dL), acompanhados pelos valores médios \pm SEM para cada grupo e subgrupo, assim como os valores de P resultantes da comparação das médias. No geral, os valores médios dos grupos e subgrupos encontram-se no limite inferior do intervalo de referência para este parâmetro (0,5-1,5 mg/dL).

Após a análise estatística das concentrações de vitamina C obtidas, verificou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre doentes e controlos, para todos os grupos, masculino, feminino e totais uma vez que $P > 0,05$.

9. Parâmetros inflamatórios

9.1. Proteína C-reactiva (PCR)

O parâmetro inflamatório, proteína C-reactiva, foi analisado uma vez que é referido em vários estudos que existe em concentrações muito baixas no soro de indivíduos saudáveis, mas encontra-se elevado em estados inflamatórios e nalgumas doenças.

Tabela 16- PCR (mg/dL) em grupos e géneros

PCR (mg/dL)					
Género	Grupo controlo		Grupo teste		P(Teste-t) *
	n	Média±SEM	n	Média±SEM	
Masc	7	0,25±0,03	8	0,37±0,10	0,333
Fem	18	0,23±0,03	9	0,22±0,04	0,804
Total	25	0,24±0,02	17	0,29±0,05	0,424

*Teste t-student

Comparando os valores obtidos com os valores de referência da PCR (0,00-0,75 mg/dL), observa-se que os valores da média de todos os grupos encontram-se dentro dos intervalos de referência, sendo ligeiramente mais elevado o grupo teste do que no grupo controlo, o que poderia apoiar o papel da inflamação na DA. Porém a análise estatística evidenciou que não há diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre os grupo controlo e teste em ambos os sexos, dado que os valores de P obtidos foram: para o grupo feminino $P=0,804$ e para o grupo masculino $P=0,333$. Assim, podemos concluir que a PCR não constitui um parâmetro de influência neste estudo. Vários estudos sugerem que níveis elevados de PCR aumentam o risco de desenvolver demência tipo Alzheimer durante um período de 25 anos de antecedência (Honjo *et al.*, 2009).

10. Parâmetros imunológicos

10.1. Leucócitos

Tabela 17-Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$) em grupos e géneros

Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)					
Género	Grupo controlo		Grupo teste		P(Teste-t)*
	n	Média±SEM	N	Média±SEM	
Masc	7	6,54±0,39	8	6,86±0,64	0,680
Fem	17	6,51±0,75	9	5,98±0,40	0,549
Total	24	6,52±0,54	17	6,40±0,37	0,856

*Teste t-student

Os valores de leucócitos obtidos para os dois grupos em estudo encontram-se dentro do respectivo intervalo de referência: 4,50-11,00 $10^3/\mu\text{L}$. Não se observou diferenças estatisticamente significativas no número de leucócitos, entre os doentes e os controlos ($P=0,856$).

10.2. Neutrófilos

Tabela 18-Neutrófilos ($10^3/\mu\text{L}$) em grupos e géneros

Neutrófilos ($10^3/\mu\text{L}$)					
Género	Grupo controlo		Grupo teste		P(Teste-t)*
	n	Média±SEM	N	Média±SEM	
Masc	7	3,95±0,52	8	3,76±0,60	0,812
Fem	17	3,25±0,32	9	3,42±0,31	0,720
Total	24	3,46±0,27	17	3,58±0,32	0,780

*Teste t-student

Após a análise dos resultados obtidos para os valores dos neutrófilos para os dois grupos em estudo, observou-se que estes se encontram dentro do intervalo de referência: 1,7-8,3 $10^3/\mu\text{L}$. Não se observou diferenças estatisticamente significativas ($P>0,05$) no número de neutrófilos, entre os doentes e os controlos ($P=0,780$).

10.3. Linfócitos

Tabela 19-Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$) em grupos e géneros

Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)					
Género	Grupo controlo		Grupo teste		P(Teste-t)*
	n	Média±SEM	n	Média±SEM	
Masc	7	2,17±0,30	8	2,28±0,17	0,750
Fem	17	2,11±0,10	9	1,87±0,16	0,249
Total	24	2,12±0,11	17	2,07±0,12	0,730

*Teste t-student

Após a análise dos resultados obtidos para os valores de linfócitos para os dois grupos em estudo, observou-se que estes se encontram dentro do intervalo de referência: 1,5-4,0 $10^3/\mu\text{L}$. Não se observam diferenças estatisticamente significativas entre doentes e controlos em ambos os sexos ($P>0,05$).

10.4. Monócitos

Tabela 20-Monócitos ($10^3/\mu\text{L}$) em grupos e géneros

Monócitos ($10^3/\mu\text{L}$)					
Género	Grupo controlo		Grupo teste		Valor de P ¹
	n	Média±SEM	n	Média±SEM	
Masc	7	0,60±0,08	8	0,62±0,07	0,714
Fem	17	0,49±0,48	9	0,46±0,03	0,956
Total	24	0,52±0,04	17	0,54±0,44	0,794

1-O valor de P foi obtido pelo teste de Mann-Whitney

Os valores de monócitos obtidos para os dois grupos em estudo, encontram-se dentro do intervalo de referência: 2,0-8,0 $10^3/\mu\text{L}$. Não se verificou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P=0,794$).

10.5. Eosinófilos

Tabela 21-Eosinófilos ($10^3/\mu\text{L}$) em grupos e géneros

Eosinófilos ($10^3/\mu\text{L}$)					
Gênero	Grupo controlo			Grupo teste	
	n	Média±SEM	n	Média±SEM	Valor de P ¹
Masc	7	0,25±0,06	8	0,17±0,03	0,271
Fem	17	0,17±0,03	9	0,13±0,02	0,365
Total	24	0,20±0,02	17	0,15±0,01	0,191

¹-O valor de P foi obtido pelo teste de Mann-Whitney

Da análise dos resultados, observou-se que para os dois grupos em estudo, os valores de eosinófilos encontram-se dentro do valor de referência: 2,0-4,0 $10^3/\mu\text{L}$. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($P=0,191$), contudo parece haver uma tendência para a diminuição dos níveis de eosinófilos no grupo teste comparativamente com o grupo controlo.

11. Parâmetros genéticos

Alguns estudos sugerem que heterozigotia nos polimorfismos tanto relativamente à mutação 677C>T como à 1298A>C podem causar uma diminuição da actividade enzimática da MTHFR, aumentando os níveis de tHcy e diminuição dos níveis de folato (Trabetti, 2008).

11.1. Polimorfismo no gene MTHFR 1298 A→C

Tabela 22-frequência relativa dos genótipos para a mutação no gene MTHFR 1298A→C

MTHFR1298 A→C	Grupo			P ¹
	Controlo	Teste	Total	
AA	60,0%	35,0%	48,9%	0,094
AC + CC	40,0%	65%	51,1%	

¹Valor de P obtido pelo teste de Qui-quadrado (χ^2).

Da análise dos resultados, observa-se que a frequência relativa para o genótipo AC+CC no grupo teste foi superior ao grupo controlo, contudo não há diferenças estatisticamente significativas ($P>0,05$), uma vez que $P=0,094$.

11.2 Polimorfismo no gene MTHFR 677 C→T

Tabela 23-frequência relativa dos genótipos para a mutação no gene MTHFR 677C→T

MTHFR677 C→T	Grupo			P ¹
	Controlo	Teste	Total	
CC + CT	88,0%	85,7%	87,0%	0,819
TT	12,0%	14,3%	13%	
CC	36,0%	33,3%	34,8%	0,850
CT+TT	64,0%	66,7%	65,2%	

¹Valor de P obtido pelo teste de Qui-quadrado (χ^2).

Da análise dos resultados, observa-se que a frequência relativa para o genótipo TT no grupo teste foi superior ao grupo controlo, contudo não há diferenças estatisticamente significativas ($P>0,05$), uma vez que $P=0,819$. Observa-se também uma frequência relativa maior no grupo teste para o genótipo CT+TT do que no controlo, mas não há diferenças estatisticamente significativas ($P=0,850$).

11.3. Polimorfismo no gene TCN2 776 C>G

Tabela 24-frequência relativa dos genótipos para a mutação no gene TCN2 776 C→G

TCN2 776 C>G	Indivíduo			P ¹
	Controlo	Doente	Total	
CC	17,4%	50,0%	30,8%	0,022
CG	69,6%	25,0%	51,3%	
GG	13,0%	25,0%	17,9%	

¹Valor de P obtido pelo teste de Qui-quadrado (χ^2).

Analisando os resultados obtidos, a mutação só num alelo (genótipo CG) poderá estar associada negativamente à DA, o que poderá constituir um factor protector da DA. No entanto, o mesmo não podemos concluir para a dupla mutação (genótipo GG), uma vez que a percentagem no grupo teste é superior ao grupo controlo.

12. S100B

Após realizar a experiência nada podemos concluir uma vez que os valores obtidos de concentração de s100B foram muito inferiores ao limite de detecção do método.

13. Correlação da homocisteína com os diversos parâmetros estudados

Para estudar as possíveis correlações entre as variáveis analisadas, foram realizados os testes de correlação de Pearson, e correlações de Spearman (teste não

paramétrico). Os coeficientes de correlação de Pearson e de Spearman são representados por r e s , respectivamente.

Analisando a correlação obtida entre a homocisteína e o cortisol pode observar-se que, entre estes parâmetros existe uma correlação positiva ($s=0,406$) que é estatisticamente significativa ($P=0,010$) obtida pelo teste de correlação de Spearman.

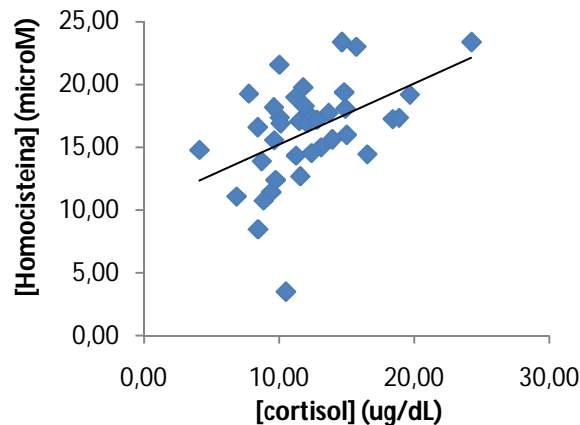


Ilustração 13-Representação gráfica da correlação entre os valores de homocisteína (μM) e os valores de cortisol ($\mu\text{g/dL}$).

Uma associação positiva entre a homocisteína e o cortisol poderá ter relevância na patologia de Alzheimer, uma vez que, como já foi descrito anteriormente por outros autores, a homocisteína e o cortisol constituem factores de risco para a doença de Alzheimer.

Analisando a correlação obtida entre a homocisteína e a creatinina, pode-se observar que entre estes parâmetros existe uma correlação positiva (0,359) que é estatisticamente significativa com $P=0,023$, obtido pelo teste de correlação de Pearson

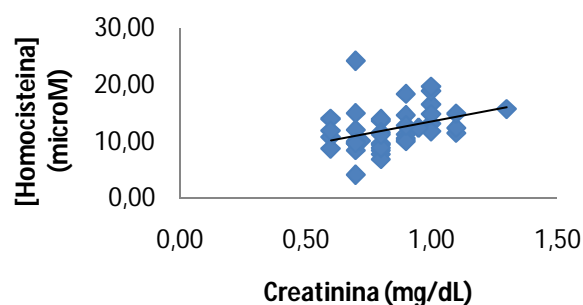


Ilustração 14- Representação gráfica da correlação entre os valores de homocisteína (μM) e os valores de creatinina (mg/dL).

Estes resultados podem justificar-se pelo facto da creatinina ser um parâmetro para avaliar a função renal. Assim, uma excreção renal diminuída de homocisteína, ou o seu metabolismo vão influenciar na Doença de Alzheimer.

Analisando a correlação obtida entre a homocisteína e o ácido fólico, pode-se observar que entre estes parâmetros existe uma correlação negativa ($s = -0,419$) que é estatisticamente significativa com $P = 0,007$, obtido pelo teste de correlação de Spearman. Observa-se uma de correlação negativa, ou seja, à medida que diminui a concentração de folato, a concentração de homocisteína aumenta.

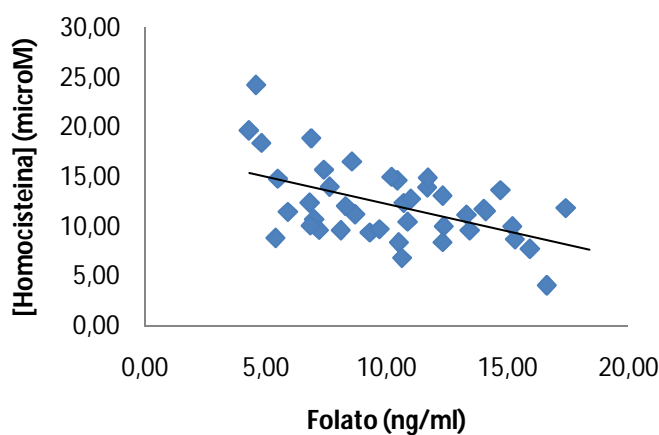


Ilustração 15-Representação gráfica da correlação entre os valores de homocisteína (μM) e os valores de folato (ng/mL).

Com base na estatística efectuada, verificou-se uma correlação significativa no GCF, apresentando um $r = -0,498$ e $P = 0,013$. Os restantes grupos não apresentam uma correlação significativa.

Analisando a correlação obtida entre a homocisteína e o ácido úrico, pode-se observar que entre estes parâmetros existe uma correlação positiva ($r = 0,461$) que é estatisticamente significativa com $P = 0,003$, obtido pelo teste de correlação de Pearson. Assim, provavelmente porque devido ao aumento de ácido úrico, reflecte também a diminuição da função renal e consequentemente há um aumento de concentração plasmática de homocisteína.

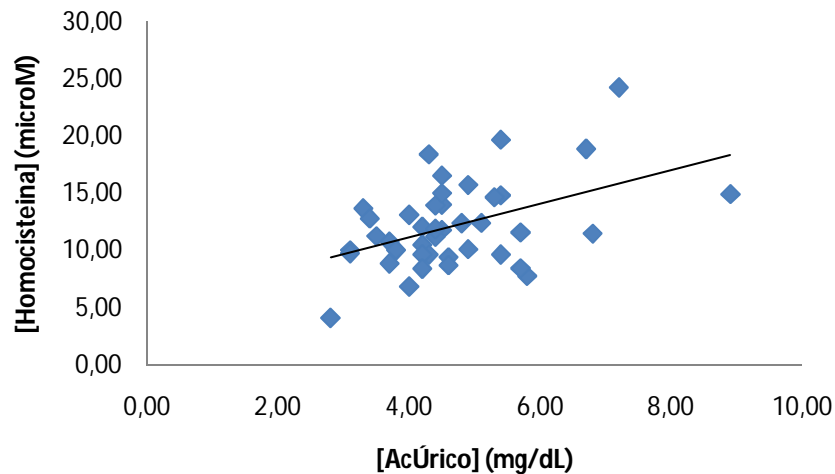


Ilustração 16-Representação gráfica da correlação entre os valores de homocisteína (μM) e os valores de ácido úrico (mg/dL).

Analisando a correlação obtida entre a homocisteína e a testosterona, pode-se observar que entre estes parâmetros existe uma correlação positiva ($r=0,324$) que é estatisticamente significativa com $P= 0,041$, obtido pelo teste de correlação de Pearson.

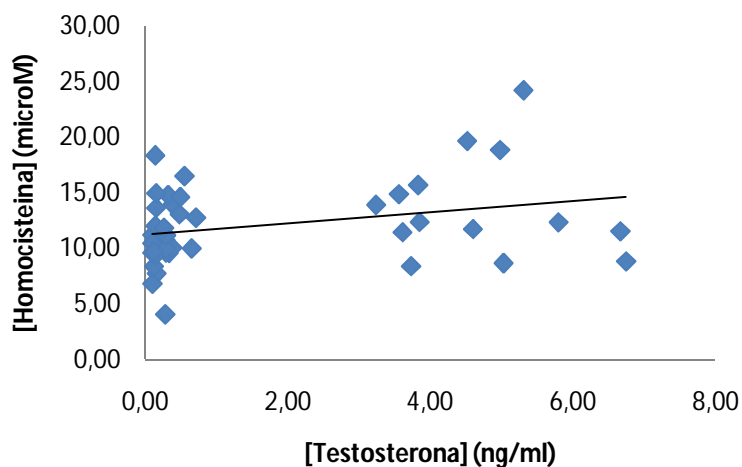


Ilustração 17-Representação gráfica da correlação entre os valores de homocisteína (μM) e os valores de testosterona (ng/mL).

Analisando a correlação obtida entre o colesterol e o cortisol observa-se que existe uma correlação positiva ($r=0,385$) que é estatisticamente significativa com $P=0,013$ obtido pelo teste de correlação de Pearson.

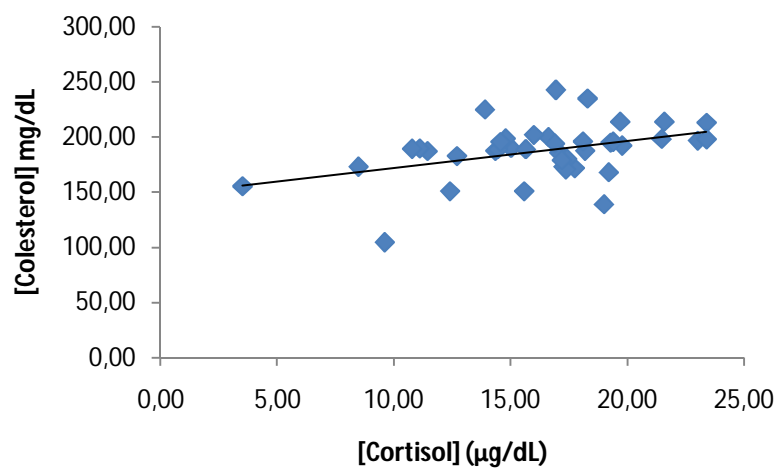


Ilustração 18- Representação gráfica da correlação entre os valores de colesterol (ng/dL) e os valores de cortisol (µg/dL).

Verificou-se uma associação positiva entre os níveis de cortisol e de colesterol, o que poderá ter relevância na patologia de Alzheimer, uma vez que estes dois parâmetros constituem factores de risco de DA.

V. Conclusões e perspectivas futuras

Após a realização do presente trabalho e análise dos resultados obtidos pode concluir-se que existe:

Uma aumento, estatisticamente significativo ($P < 0,05$) entre os níveis de homocisteína no grupo teste feminino, relativamente ao grupo controlo.

Um aumento, estatisticamente significativo ($P < 0,05$) entre os níveis de colesterol entre os grupos teste e controlo, como também no grupo teste feminino.

Uma diminuição, estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre os níveis de estradiol no grupo teste feminino em relação ao controlo.

Uma associação negativa à Doença de Alzheimer na mutação de um alelo (genótipo CG) no gene TCN2 776C→G, podendo constituir um factor protector para a doença.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que níveis elevados de homocisteína plasmática constituem um factor de risco para DA.

Ainda não são conhecidos os mecanismos exactos pelos quais a hiperhomocisteinémia favorece o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Deste modo, seria importante esclarecer e continuar a investigar os mecanismos subjacentes à homocisteína, na doença de Alzheimer e em outras demências cognitivas.

VI. Bibliografia

- ✓ Bertram L, Tanzi R., 2008. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nature Reviews Neuroscience*; 9: 768-778
- ✓ Buchman AS, Wilson RS, Bienias JL., 2005. Change in body mass index and risk of incident Alzheimer disease. *Neurology* ;65:892-7.
- ✓ Cascalheira JF, João SS, Pinhanços SS, Castr R., Palmeira M., Almeida S., Faria MC., Domingues FC. 2009. Serum homocysteine: Interplay with other circulating and genetic factors in association to Alzheimer's type dementia .*Clinical Biochemistry* 42; 783-790
- ✓ Castro R., Barroso M., Rocha M., Esse R., Ramos R., Ravasco P., Rivera I., Almeida IT., 2010. The TCN2 776CNG polymorphism correlates with vitamin B12 cellular delivery in healthy adult populations. *Clinical Biochemistry* 43: 645-649.
- ✓ Chen J-H, Lin K.P, Chen Y-C. 2009. Risk Factors for Dementia. *J Formos Med Assoc* Vol 108, N°10
- ✓ Chong Z, Li F, Maiese K., (2005). Stress in the brain: novel cellular mechanisms of injury linked to
- ✓ Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews* 49(1): 1-21.
- ✓ Dubois B, Feldman H, Jacova C, DeKosky S, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Stern Y, Visser P, Scheltens P. 2007 Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurology* 6: 734-746.

- ✓ Fitzpatrick AL, Kuller LH, Lopez OL., 2009. Midlife and late-life obesity and the risk of dementia: cardiovascular health study. *Arch Neurol*;66:336–42.
- ✓ Gandy S., 2005. The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer disease. *The Journal of Clinical Investigation*; 115:1121–1129.
- ✓ Heneka MT, O'Banion MK., 2007. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol*;184: 69–91.
- ✓ Juan D, Zhou DH, Li J., 2004. A 2-year follow-up study of cigarette smoking and risk of dementia. *Eur J Neurol*;11: 277–82.
- ✓ Liu L, Guo XE, Zhou YQ, et al. Prevalence of dementia in China. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2003;15:226–30.
- ✓ Luchsinger JA, Mayeux R. 2007. Adiposity and Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*;4:127–34.
- ✓ Markesbery W ., (1997). Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Free Radical Biology & Medicine* 23(1) 134–147.
- ✓ Mattson MP., (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430:631-639.
- ✓ Nogueira MI. Abbas ESY; Campos EL., 2009. S100b Protein Expression: Gender- and Age-Related Daily Changes. *Neurochem Res*.34: 1355–1362
- ✓ Nourhashémi F., Gillette-Guyonnet S. , Andrieu S, Ghisolfi A., 2000. Alzheimer disease: protective factors. *Am J Clin Nutr* ;71(suppl):643S–9S.
- ✓ Peters R, Poulter R, Warner J., 2008. Smoking, dementia and cognitive decline in the elderly, a systematic review. *BMC Geriatr*;8:36.

- ✓ Praticò D., (2008). Evidence of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease Brain and Antioxidant Therapy: Lights and Shadows.

- ✓ Saido CT, Iwata N., 2006. Metabolism of amyloid b peptide and pathogenesis of Alzheimer's disease Towards presymptomatic diagnosis, prevention and therapy. *Neuroscience Research* 54: 235–253.

- ✓ Sultana R, Perluigi M, Butterfield D., (2009). Oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease (AD), mild cognitive impairment and animal models of AD: role of Aβ in pathogenesis. *Acta Neuropathologica* 118:131–150.

- ✓ Trabetti, E. ,2008. Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardiovascular risk. *J Appl Genet*;49(3); 267–282.

- ✓ Vislisel JM. Schafer FQ., Buettner GR, A simple and sensitive assay for ascorbate using a plate reader. 2007., *Analytical Biochemistry* 365; 31–39

- ✓ Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV., 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature*; 416; 535–9.

- ✓ Whitley RJ, Meikle AW, Watts NB., 1994. Endocrinology. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 2nd Edition. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company,; 1825-6.

- ✓ Wong PC, Cai H, Borchelt DR., 2002. Genetically engineered mouse models of neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*; 5:633–9.

- ✓ Zandi PP, Sparks DL, Khachaturian AS., 2005. Do statins reduce risk of incident dementia and Alzheimer disease? The Cache County Study. *Arch Gen Psychiatry* ;62:217–24.

ANEXOS

ANEXO 1- Formulários do inquérito e da requisição

Estudo de doentes com Alzheimer -Homocisteína/Função Renal

Doente nº _____

- Global Deterioration Scale _____

- Tomou corticóides ☐ S ☐ N

- Idade _____

- Alcoólico ☐ S ☐ N

- Peso _____

- Doença renal ☐ S ☐ N

- Altura _____

- Diabético (tipo II) ☐ S ☐ N

- Sexo ☐ M ☐ F

- Hipotireoidismo ☐ S ☐ N

- Fumador ☐ S ☐ N

- Hipertireoidismo ☐ S ☐ N

- Hipertenso ☐ S ☐ N

- Colesterol ☐ Normal ☐ Elevado

- Depressivo ☐ S ☐ N

- Tomou recentemente ☐ S ☐ N

ANEXO 2 - Câmara de Segurança Biológica, segundo Manual de Segurança Biológica em Laboratório da Organização Mundial de saúde (OMS)

Câmara de segurança biológica – Classe II, tipo A1

Na Ilustração 7, a seguir, apresenta-se um esquema desta câmara. Uma ventoinha interna suga ar da sala (abastecimento de ar) pela abertura na frente e envia-o para a câmara através da grelha de entrada. A velocidade de entrada deste ar deve ser, no mínimo, 0,38 m/s na abertura da frente. O ar passa então por um filtro HEPA de abastecimento, antes de ser injectado para a superfície de trabalho. À medida que o fluxo de ar desce, a cerca de 6–18 cm da superfície de trabalho, divide-se em duas correntes secundárias: metade do fluxo de ar passa através da grelha da frente do exaustor e a outra metade através da grelha de trás. Quaisquer partículas de aerossol geradas na superfície de trabalho são imediatamente capturadas neste fluxo de ar descendente e enviadas para as grelhas (posterior ou anterior) do exaustor, assegurando assim o mais elevado nível de protecção do produto. O ar é então expelido através da conduta traseira no espaço entre os filtros de abastecimento e do exaustor, localizados no topo da câmara. Devido ao tamanho destes filtros, cerca de 70% do ar é reenviado através do filtro HEPA de abastecimento para a zona de trabalho; os restantes 30% passam pelo filtro do exaustor para a sala ou para o exterior.

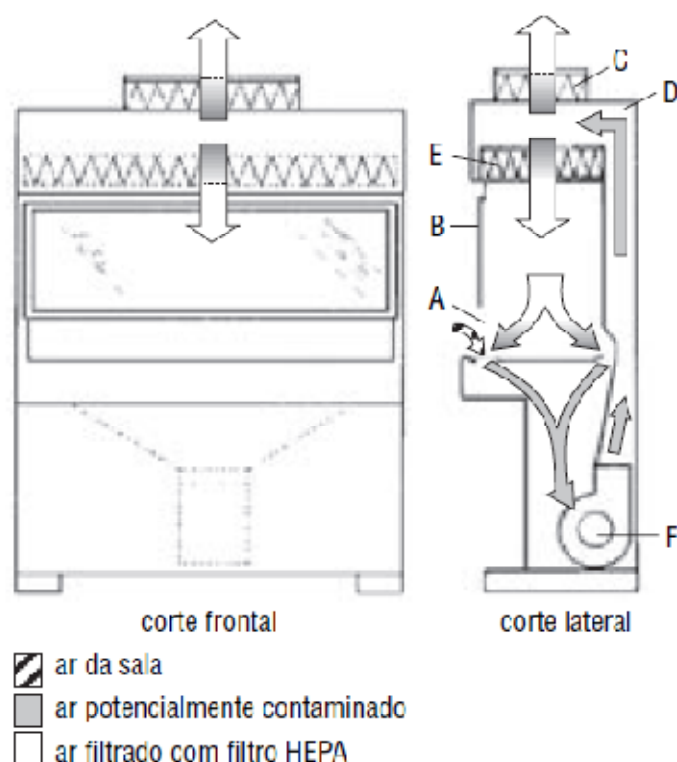


Ilustração 7. Diagrama esquemático de uma câmara de segurança biológica da Classe IIA1
A – Abertura frontal; B – Painel de observação; C – Filtro exaustor HEPA; D – Conduta traseira; E – Filtro HEPA de abastecimento; F – Ventoinha

O ar do exaustor da CSB – Classe IIA1 pode ser reenviado para a sala ou expelido para o exterior do edifício através de uma conexão a uma conduta própria ou através do exaustor do edifício.

Recircular o ar usado para a sala tem a vantagem de fazer baixar os custos de combustível, porque não se está a expelir para o exterior ar aquecido e/ou arrefecido. Uma conexão a um sistema de ventilação por condutas também permite utilizar algumas CSB em trabalho com radionuclídeos voláteis e químicos tóxicos voláteis (Quadro 8).

Quadro 8. Selecção de câmaras de segurança biológica (CSB), segundo o tipo de protecção necessária

TIPO DE PROTECÇÃO	SELECÇÃO DE CSB
Protecção do pessoal, microrganismos nos Grupos de Risco 1–3	Classe I, II, III
Protecção do pessoal, microrganismos no Grupo de Risco 4, laboratório com porta-luvas	Classe III
Protecção do pessoal, microrganismos no Grupo de Risco 4, laboratório com fatos pressurizados	Classe I, II
Protecção do produto	Classe II ou III unicamente se fluxo laminar incluído
Protecção contra radionuclídeos/químicos voláteis, quantidades mínimas	Classe IIB1, Classe IIA2 de evacuação exterior
Protecção contra radionuclídeos/químicos voláteis	Classe I, IIB2 ou III