



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR**

**“ALTERAÇÕES OXIDATIVAS EM PORTADORES DA DOENÇA DE ALZHEIMER:  
CORRELAÇÃO COM OS ESTÁGIOS DA DOENÇA E O QUADRO COGNITIVO DOS  
PACIENTES”**

**BELÉM/PA  
2012**

**SATOMI FUJIHARA**

**“ALTERAÇÕES OXIDATIVAS EM PORTADORES DA DOENÇA DE ALZHEIMER:  
CORRELAÇÃO COM OS ESTÁGIOS DA DOENÇA E O QUADRO COGNITIVO DOS  
PACIENTES”**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do título Mestre em Neurociências.

Orientadora: Dra. Patrícia Danielle Lima de Lima  
Co-orientador: Dr. Jofre Jacob da Silva Freitas

**BELÉM/PA  
2012**

**SATOMI FUJIHARA**

**“ALTERAÇÕES OXIDATIVAS EM PORTADORES DA DOENÇA DE ALZHEIMER:  
CORRELAÇÃO COM OS ESTÁGIOS DA DOENÇA E O QUADRO COGNITIVO DOS  
PACIENTES”**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Danielle Lima de Lima  
Co-Orientador: Prof. Dr. Jofre Jacob da Silva Freitas**

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Danielle Lima de Lima**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kátia Simone Kietzer**

**Prof. Dr. Robson José de Souza Domingues**

**BELÉM  
2012**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido concluir mais esta etapa de minha vida.

A professora Patrícia Lima por ter aceitado a orientação para realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador professor Jofre Freitas pelo incentivo e confiança para a realização do mestrado, além da colaboração na orientação do trabalho.

A professora Kátia Kietzer que sempre se mostrou prestativa e atenciosa, contribuindo imensamente na realização deste trabalho.

A minha mãe pelo apoio em todas as horas.

Ao meu pai (*in memoriam*) fonte de inspiração e de exemplo.

A minha irmã Mikayo pela amizade, compreensão e constante apoio nos momentos difíceis.

Aos meus sobrinhos Seiji e Enzo pelo carinho e alegria nos momentos compartilhados.

Ao professor Sandro Percário e seus orientandos pela grande contribuição para a realização deste trabalho.

A grande amiga Mariângela, pela parceria no trabalho e amizade.

A grande amiga Kátia Omura, que mesmo distante sempre me ajudou.

Aos meus colegas do mestrado em especial a Keury pela ajuda em todas as horas. As amigas Socorro, Edilene e Madacilina por terem sido companhias tão agradáveis durante este percurso.

Aos pós-graduandos da UFPA Edinaldo e Tiago, por terem sido prestativos em passar os seus conhecimentos, e a Suellen por me ajudar na elaboração da parte estatística do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular.

A professora Rita Gaspar, a bolsista Elem e aos alunos Cássio e Camila por terem contribuído com a coleta.

Ao funcionário Márcio do Laboratório de Morfofisiologia pela disponibilidade e contribuição.

Aos profissionais do Laboratório de Análises Clínicas da UEPA, em especial ao Edmilson pela colaboração na realização dos exames laboratoriais e eficiência na coleta das amostras.

Aos profissionais da UEAFTO pelo acolhimento e colaboração.

A ABRAz pelo apoio.

A FAPESPA pelo auxílio financeiro.

Aos pacientes que participaram da pesquisa, e aos seus cuidadores pela confiança, paciência e respeito. Minha eterna gratidão.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas.....	iv
Lista de Abreviaturas.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. DOENÇA DE ALZHEIMER.....	21
2.1 Histórico da Doença de Alzheimer.....	21
2.2 Mecanismo molecular da Doença de Alzheimer.....	22
2.3 Espécies Reativas e Estresse Oxidativo.....	24
2.4 Peroxidação Lipídica.....	27
2.5 Antioxidantes.....	30
2.6 Estresse oxidativo e Doença de Alzheimer.....	33
3. OBJETIVOS.....	38
3.1 Objetivo Geral.....	38
3.2 Objetivos Específicos.....	38
4. MÉTODOS.....	39
4.1 Sujeitos da Pesquisa.....	39
4.2 Critérios de inclusão.....	40
4.3 Critérios de exclusão .....	41

4.4 Protocolo de Avaliação.....	41
4.5 Avaliação da função cognitiva.....	41
4.5.1 Instrumentos para avaliação .....	42
4.6 Coleta de sangue.....	43
4.7 Avaliação da Peroxidação lipídica.....	44
4.8 Avaliação da Capacidade antioxidante total equivalente ao trolox.....	45
4.9 Análise estatística.....	47
5. RESULTADOS.....	48
5.1 Avaliação clínica e epidemiológica.....	48
5.2 Avaliação neuropsicológica.....	50
5.3 Avaliação da concentração das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	53
5.4 Avaliação da capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC).....	55
5.5 Correlação entre a concentração das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC).....	57
6. DISCUSSÃO.....	58
7. CONCLUSÃO.....	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
9. APÊNDICES.....	74
10. ANEXOS.....	82

## RESUMO

A sobrevida da população tem aumentado de forma progressiva e atribui-se à melhoria da qualidade dos serviços de saúde e das condições gerais de vida, sendo marcante sobretudo nos países industrializados. Este aumento da expectativa de vida repercute no aumento da incidência de doenças comuns em idades avançadas. O envelhecimento é considerado fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (DA). Uma das teorias para a patogênese da DA postula que a neurodegeneração é o resultado de alterações no metabolismo oxidativo com acometimento do tecido cerebral vulnerável. O fato de o envelhecimento ser um fator de risco na DA, reforça também a hipótese da participação dos radicais livres, pois os efeitos de sua ação podem se acumular durante anos. A DA é uma doença insidiosa e progressiva e caracteriza-se clinicamente por uma perda progressiva da memória e de outras funções cognitivas, além de mudanças comportamentais e sociais. O déficit de memória é o principal e usualmente o primeiro sintoma da DA, com comprometimento especialmente da retenção e recordação de novas informações. O presente trabalho visa avaliar se ocorrem alterações no metabolismo oxidativo detectáveis no sangue de pacientes com a DA, e se estas podem ser relacionadas com os diferentes estágios da doença e com o quadro cognitivo dos pacientes. Foram avaliados 30 pacientes com a doença de Alzheimer e 28 indivíduos no grupo controle atendidos na Unidade de Ensino e Assistência de Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade do Estado do Pará (UEAFTO-UEPA). O metabolismo oxidativo foi avaliado através da medida da capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox (TEAC) e da mensuração dos níveis das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico - TBARS. Também foram realizados testes neuropsicológicos em todos os sujeitos participantes do estudo. Não foram observadas correlações significativas no desempenho dos testes neuropsicológicos com os níveis de TBARS e TEAC nos pacientes com a DA. Observou-se que a capacidade antioxidante total (CAOT) estava significativamente diminuída nos pacientes com a DA em comparação com o grupo controle independentemente do estágio da doença, mostrando uma possível relação entre a CAOT e a DA. Na avaliação de TBARS houve uma tendência para maiores concentrações nos pacientes com DA do que no grupo controle, porém a diferença não foi estatisticamente significativa, apenas a fase moderada foi significativa quando comparada com o grupo controle. A avaliação da peroxidação lipídica através dos níveis de TBARS provavelmente não seria um biomarcador adequado para a doença de Alzheimer.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Peroxidação lipídica. TEAC. Doença de Alzheimer. Testes neuropsicológicos.

## ABSTRACT

The survival of the population has increased gradually and it is correlated with quality of health services and general living conditions, being particularly marked in industrialized countries. The increase in life expectancy affects the incidence of age-associated diseases. Aging is considered a risk factor for the development of neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease (AD). One theory on the pathogenesis of AD postulates that neurodegeneration is the result of oxidative stress and damage to vulnerable cerebral tissues. The fact that aging is a risk factor in AD also reinforces the hypothesis of free radicals involvement, because the effects of their actions can accumulate for years. It is an insidious, progressive disease and is characterized clinically by progressive loss of memory and other cognitive functions, as well as behavioral and social changes. The memory deficit is the main and usually the first symptom of AD, especially with deficiency of retention and recall of new information. The present study aims to evaluate if there are changes in oxidative metabolism detected in the blood of patients with AD, and if there is correlation with different stages of the disease and the patients' cognitive framework. We evaluated 30 patients with Alzheimer's disease and 28 subjects in the control group attended at Unit Education and Assistance Physical Therapy and Occupational Therapy at the University of Pará (UEAFTO-UEPA). Oxidative metabolism was assessed by measuring the total antioxidant capacity equivalent to Trolox (TEAC) and measuring the levels of substances that react with thiobarbituric acid (TBARS). Neuropsychological tests were also performed on all participants in the study. No significant correlations were observed in the performance of neuropsychological tests to the levels of TBARS and TEAC in patients with AD. It was observed that the total antioxidant capacity (TAC) was significantly decreased in AD patients compared to controls whatever stage of disease, showing a possible relationship between TAC and AD. In the evaluation of TBARS was a trend toward higher concentrations in AD patients than in control group but the difference was not statistically significant, only the moderate stage was significant when compared with the control group. Evaluation of the lipidic peroxidation through TBARS a biomarker would probably not be suitable for Alzheimer's disease.

Keywords: Oxidative stress. Lipid peroxidation. TEAC. Alzheimer's disease. Neuropsychological tests.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspectos histopatológicos detectadas no córtex cerebral de um paciente com DA ( <i>post mortem</i> ).....	22
Figura 2	Mecanismo molecular da doença: processo proteolítico da APP para formação do $\beta$ -amilóide.....	23
Figura 3	Representação esquemática da redução tetravalente do oxigênio molecular ( $O_2$ ) na mitocôndria até a formação de água ( $H_2O$ ).....	25
Figura 4	Reação de Fenton.....	26
Figura 5	Reação de Haber-Weiss.....	26
Figura 6	Reação em cadeia da peroxidação lipídica .....	28
Figura 7	Antioxidantes enzimáticos: SOD, catalase e GPx.....	30
Figura 8	Representação esquemática da formação da glutathiona reduzida e oxidada .....	32
Figura 9	Modelo proposto de uma possível relação entre ERO e a DA familiar/ esporádica .....	35
Figura 10	Estresse oxidativo e perda neuronal induzido pelo peptídeo $\beta$ -amilóide.....	37
Figura 11	Níveis de TBARS em indivíduos controle e pacientes com doença de Alzheimer leve, moderada e grave.....	53
Figura 12	Correlação entre níveis de TBARS no plasma e o tempo de duração da doença (em anos).....	54

Figura 13	Medida da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) em indivíduos controle e pacientes com doença de Alzheimer leve, moderada e grave.....	55
Figura 14	Correlação entre níveis de TEAC no plasma e o tempo de duração da doença (em anos).....	56
Figura 15	Correlação entre níveis da capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) e TBARS no plasma em pacientes com doença de Alzheimer e nos estágios leve, moderado e grave da doença.....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variáveis demográficas e clínicas de pacientes com DA e grupo controle.....	48
Tabela 2	Características clínicas e níveis de TBARS e TEAC no grupo controle e pacientes com DA.....	49
Tabela 3	Escore dos testes cognitivos de pacientes com DA e grupo controle.....	50
Tabela 4	Correlação dos testes neuropsicológicos conforme o sexo dos pacientes com DA e grupo controle.....	51
Tabela 5	Correlação dos testes neuropsicológicos com a idade e escolaridade nos pacientes com DA e grupo controle.....	52
Tabela 6	Correlação dos testes neuropsicológicos com os níveis de TBARS no grupo controle e pacientes com DA.....	54
Tabela 7	Correlação dos testes neuropsicológicos com os níveis de TEAC no grupo controle e pacientes com DA.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABN	Academia Brasileira de Neurologia
ABRAZ	Associação Brasileira de Alzheimer
ABTS**	2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio
ADRDA	Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
AGPI	Ácidos Graxos Poliinsaturados
APOE	Apolipoproteína E
BACE	Enzima de Clivagem da Proteína Precursora Amilóide no Sítio Beta
CAOT	Capacidade Antioxidante Total
CAT	Catalase
CDR	Clinical Dementia Rating
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CTE	Cadeia Transportadora de Elétrons ou "Electron Transport Chain"
Cu/Zn SOD	Cobre/Zn Superóxido Dismutase
DA	Doença de Alzheimer
DH	Doença de Huntington
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Doença de Parkinson
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – fourth edition
DTNB	5,5'-Ditiobs (2-nitro-5-ácido tiobenzóico)
EDTA	Ácido Etilenediaminotetra-acético
ERON	Espécies Reativas do Oxigênio e Nitrogênio
ESR	"Electron Spin Resonance" ou Ressonância do Spin Eletrônico
GDS	"Geriatric Depression Scale" ou Escala Geriátrica de Depressão

GPx	Glutationa Peroxidase
GR	Glutationa Redutase
GSH	Glutationa Reduzida
GSSG	Glutationa Oxidada
GT	Glutationa Transferase
HNE	Hidroxinonenal
H·	Átomo de Hidrogênio
H <sub>2</sub> O	Água
HO <sub>2</sub> ·	Radical hidroperoxila
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Iche	Inibidores da acetilcolinesterase
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monobásico de potássio
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MDA	Malondialdeído
MEEM	Mini-Exame do Estado Mental
Mn SOD	Manganês Superóxido Dismutase
MPA	Ácido Metafosfórico
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NINCDS	“National Institute of Neurological and Communication Disorders and Stroke”
NO	Óxido Nítrico
O <sub>2</sub>	Oxigênio Molecular
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio Singlet
OH·	Radical hidroxila
PBS	Solução Tampão Fosfato
PET	Tomografia por Emissão de Pósitrons

PPA	Proteína Precursora Amilóide
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
RPM	Rotações por minuto
Se	Selênio
SOD	Superóxido Dismutase
SPECT	Tomografia por Emissão de Fóton Único
TBARS	"Thiobarbituric Reactive Substances"- Substâncias Reativas do ácido Tiobarbitúrico
TC	Tomografia Computadorizada
TBCB	Teste da Bateria Cognitiva Breve
TDR	Teste do Desenho do Relógio
TEAC	"Trolox Equivalent Antioxidant Capacity"- Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
TFV	Teste da Fluência Verbal
TGO / AST	Transaminase Glutâmica Oxalacética ou Aspartato aminotransferase
TGP / ALT	Transaminase Glutâmica Pirúvica ou Alanina aminotransferase
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UEAFTO	Unidade de Ensino e Assistência de Fisioterapia e Terapia Ocupacional
UEPA	Universidade do Estado do Pará
VDRL	"Venereal Disease Research Laboratory"- Pesquisa Laboratorial de Doença Venérea

## 1. INTRODUÇÃO

A sobrevivência da população tem aumentado de forma progressiva e isto está correlacionado com melhoria da qualidade dos serviços de saúde e das condições gerais de vida, sendo marcante sobretudo nos países industrializados. No Brasil, a expectativa de vida que era de 45 anos em 1950, passou para 73,5 anos no último censo realizado pelo Instituto Brasileiro Geografia e Estatística (IBGE) no ano de 2010 (IBGE, 2011). O aumento da expectativa de vida repercute no aumento da incidência de doenças comuns em idades avançadas. O envelhecimento é considerado fator de risco para o desenvolvimento das doenças neurodegenerativas, tais como, a doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson (DP) e a esclerose lateral amiotrófica (MARCOURAKIS et al., 2008).

A doença de Alzheimer é a doença neurodegenerativa mais comum no idoso; é uma doença insidiosa e progressiva, cuja prevalência e incidência aumentam significativamente com a idade (REITZ et al., 2011). Caracteriza-se clinicamente por uma perda progressiva da memória e de outras funções cognitivas, além de mudanças comportamentais e sociais. O déficit de memória é o principal e usualmente o primeiro sintoma da DA, com comprometimento especialmente da retenção e recordação de novas informações (MCKHANN et al., 2011).

No Brasil foi encontrada uma prevalência da doença de Alzheimer em torno de 7,1% entre pessoas com mais de 60 anos, o que significa que a DA afeta entre 750 mil e um milhão de brasileiros. Aos 80 anos de idade aproximadamente 30% da população desenvolverão algum tipo de demência, com predominância da doença de Alzheimer (CASADO et al., 2008).

Até o momento, não existe ainda um marcador biológico específico para o diagnóstico da DA. O diagnóstico da DA depende de um exame clínico adequado, com a obtenção de uma história clínica detalhada, além da investigação por exames laboratoriais e de neuroimagem (CARAMELLI, 2005; MCKHANN et al., 2011).

A avaliação neuropsicológica constitui elemento importante para o diagnóstico da DA. O Mini-exame do estado mental (MEEM) criado por Folstein et al. (1975) é o teste mais utilizado para o rastreio diagnóstico da DA, e apresenta vantagem de ser rápida e de fácil aplicação (CHAVES et al., 2011). No entanto, o desempenho no teste sofre influência importante da escolaridade, justificando por este motivo o

emprego de testes adicionais, como: provas de memória (evocação tardia), medidas de fluência verbal, ou ainda testes do desenho do relógio (CARAMELLI, 2005; CHAVES et al., 2011).

Os testes laboratoriais e de neuroimagem são realizados para afastar outras etiologias que possam levar a um comprometimento do estado mental. Os exames laboratoriais visam afastar, por exemplo, alterações metabólicas (hipotireoidismo ou déficit de vitamina B12), que são designadas como desordens tratáveis. Em relação aos exames de neuroimagem, estes podem afastar causas secundárias de demência como os tumores e as lesões vasculares cerebrais. Podem ainda, fornecer informações de auxílio como, por exemplo, a atrofia na região do hipocampo observada no exame de ressonância nuclear magnética (RNM), reforçando o diagnóstico da DA (ZABAR, 2006; CARAMELLI et al., 2011).

Como a DA é progressiva, a estrutura e a química do cérebro tornam-se cada vez mais alteradas no decorrer do tempo. A evolução da DA é geralmente dividida em três estágios: inicial, intermediário e avançado, em consequência dessas alterações (CARAMELLI, 2005).

No estágio inicial ou leve os pacientes apresentam déficit de memória episódica com prejuízo de armazenar e lembrar-se de informações recentemente aprendidas, com preservação da memória para fatos mais remotos. Além deste sintoma, há prejuízo em pelo menos outro domínio cognitivo, tal como: atenção, resolução de problemas, linguagem, função visuoespacial e práxis. Alguns pacientes podem ainda apresentar sintomas de ansiedade e depressão (MCKHANN et al., 2011).

No estágio intermediário ou moderado, os comprometimentos da memória e de outros domínios cognitivos se tornam mais evidentes. O paciente apresenta dificuldades da vida diária, como controle das finanças, compras e transporte e necessita de auxílio no cuidado com a higiene pessoal e vestimenta. Problemas de linguagem com dificuldades para encontrar palavras, alterações comportamentais, agitação e sintomas psiquiátricos aparecem frequentemente, com a presença de alucinações visuais, delírios e inversão do ciclo sono-vigília (MCKHANN et al., 2011).

Em adição aos sintomas anteriores, no estágio avançado ou grave, há piora substancial da memória para eventos, dificuldade de linguagem, incapacidade de reconhecer membros da família, perda do controle dos esfíncteres e piora do quadro

motor, caracterizado por rigidez motora e dificuldade de locomoção (MCKHANN et al., 2011).

A DA é caracterizada histologicamente pela perda de células neuronais, principalmente no córtex cerebral, no hipocampo e na amígdala. Essa perda de células neuronais está associada a outras alterações morfológicas como a presença de placas senis e emaranhados neurofibrilares (GELLA & DURANY, 2009).

O fator causal para a grande maioria dos casos ainda é desconhecida (REITZ et al., 2011), ocorrendo comumente de forma esporádica. Já as formas familiares em que há padrão de herança autossômica dominante, perfazem menos de 2 % do total de casos da doença (CARAMELLI, 2005).

Existem pesquisas que tentam explicar a causa da morte dos neurônios (REDDY, 2006; BUTTERFIELD et al., 2007; BUTTERFIELD & SULTANA, 2011). A hipótese de alterações no metabolismo oxidativo envolvidas na patogênese da DA é defendida por numerosos pesquisadores, através de resultados obtidos tanto em pesquisas *in vitro* como *in vivo* (BUTTERFIELD et al., 2007; NUNOMURA et al., 2007; MANDAL et al., 2012).

A hipótese de que espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) possam estar envolvidas na DA, foi originalmente baseada no envolvimento do estresse oxidativo no envelhecimento (DEL VALLE, 2011). Postula-se que a ação dos radicais livres, gerados durante o metabolismo normal, causaria um dano cumulativo às macromoléculas (HARMAN, 2002), tais como os ácidos graxos poliinsaturados das membranas lipídicas, proteínas essenciais e DNA (CASADO et al., 2008). A ação dos radicais livres sobre estas estruturas celulares poderia culminar na perda da sua função normal e na morte celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A morte neuronal se traduz do ponto de vista macroscópico, por significativa atrofia cerebral (CARAMELLI, 2005). A região do hipocampo, do córtex entorrinal e do cíngulo posterior são precocemente acometidas na DA, observando-se uma redução do volume dessas regiões (CONVIT et al., 1997). Posteriormente, esta neurodegeneração estende-se para as regiões do neocórtex frontal, parietal e temporal (MCDONALD et al., 2009). A atrofia cerebral é comumente observada nos exames de neuroimagem estrutural, apesar de que, nas fases iniciais o exame pode ser normal (CARAMELLI, 2005).

O diagnóstico definitivo da DA só é possível mediante exame anatomopatológico do tecido cerebral (MCKHANN et al., 1984). No entanto, esse método diagnóstico é invasivo com limitações óbvias para a obtenção do tecido cerebral *in vivo*. Por outro lado, é possível fazer a confirmação diagnóstica *post mortem*, mas obviamente esta não contribui no tratamento (BERTOLUCCI & OKAMOTO, 2003).

Várias pesquisas têm focado na identificação de possíveis marcadores biológicos para o diagnóstico precoce da DA, na tentativa de fornecer estratégias terapêuticas numa fase inicial da doença (DUBOIS et al., 2007; MARCOURAKIS et al., 2008; JACK JR. et al., 2011; REITZ et al., 2011).

O grupo de trabalho do *National Institute on Aging* (NIA) e a *Alzheimer's Association*, publicaram em abril de 2011 os novos critérios para demência. Nos novos critérios foi enfatizada a aplicabilidade na prática clínica de alguns biomarcadores, como por exemplo, a análise dos métodos de imagem e do exame do líquido cefalorraquidiano utilizando-as principalmente em fases assintomáticas e iniciais na DA. Porém, a inclusão destes biomarcadores no diagnóstico foi recomendada, por enquanto, somente em pesquisa clínica (FROTA et al., 2011).

Além do líquido cefalorraquidiano (LCR), componentes do sangue, como o soro, plasma ou células circulantes, vem sendo considerado uma fonte em potencial de biomarcadores para o diagnóstico da DA (HUMPEL, 2009). Um dos principais benefícios é facilidade de sua obtenção, o que torna os biomarcadores plasmáticos ou séricos particularmente interessantes para a prática e para a pesquisa clínica (CAMELLI et al., 2011). Várias investigações apontam o sangue como fonte de marcadores de estresse oxidativo, uma vez que nele são transportados e redistribuídos antioxidantes e produtos do metabolismo oxidativo. A identificação destes produtos poderia ser utilizada como marcador diagnóstico, e com isso reduziria a necessidade de procedimentos caros, invasivos e de execução demorada (BALDEIRAS et al., 2008).

O emprego de biomarcadores, especificamente de marcadores periféricos de estresse oxidativo nas doenças neurodegenerativas, como a DA poderia ser uma ferramenta útil no auxílio para a detecção de processos fisiopatológicos de danos neuronais da doença, contribuindo para o entendimento da relação do metabolismo oxidativo na sua patogenia e no conseqüente comprometimento cognitivo.

Desta maneira, o presente trabalho visa avaliar se ocorrem alterações no metabolismo oxidativo detectáveis no sangue de pacientes com a DA, e se estas podem ser relacionadas com os diferentes estágios da doença e com o quadro cognitivo dos pacientes.

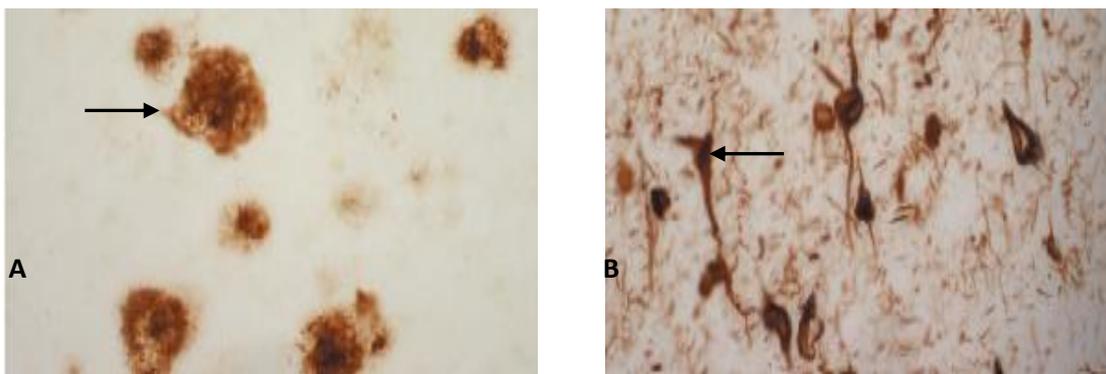
## 2. DOENÇA DE ALZHEIMER

### 2.1 Histórico da Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer foi originalmente descrita por Alois Alzheimer, em 1907. Ele publicou o artigo "*A characteristic serious disease of the cerebral cortex*", em que apresenta os achados clínicos e anatomopatológicos de um caso peculiar. Auguste D., de 51 anos, passou a apresentar sintomas delirantes em relação ao marido, alterações de linguagem e de memória, e logo em seguida instalaram-se, desorientação no tempo e espaço, com piora progressiva. A paciente faleceu quatro anos e meio após o início dos sintomas, em estágio avançado de demência, e foi submetida a exame anatomopatológico. Alzheimer observou acúmulo de placas características no espaço extracelular (placas senis) e lesões neurofilamentares no interior de neurônios, distribuídas difusamente pelo córtex cerebral (CARAMELLI, 2006).

A partir de 1912, o professor E. Kraepelin utilizou o nome do primeiro cientista a descrever as características patológicas, para dar nome a doença, chamada então de Doença de Alzheimer. O epônimo passou a ser utilizado para os casos de demência ocorrendo na faixa etária pré-senil, ou seja, antes dos 65 anos. Durante várias décadas, esse diagnóstico ficou reservado a tais casos de demência degenerativa pré-senil, em oposição aos casos bem mais frequentes de demência senil. No final dos anos 60, diferentes estudos demonstraram que a denominada Doença de Alzheimer e a Demência Senil eram, na realidade, a mesma condição clínico-patológica, embora com algumas diferenças de apresentação clínica. No final da década de 60, a Doença de Alzheimer era considerada a causa mais comum de demência em idosos (TOMLINSON et al., 1968).

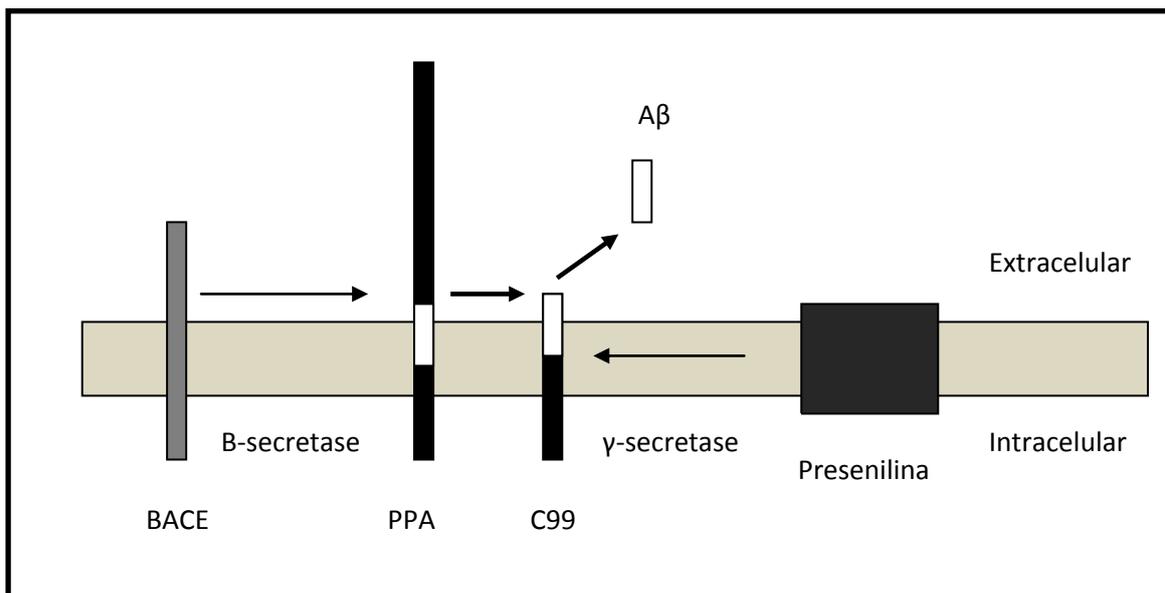
A partir da década de 1970, o termo Doença de Alzheimer passou a ser empregado para os casos de demência degenerativa, que apresentassem as lesões cerebrais características, como as placas senis e emaranhados neurofibrilares, independentemente da faixa etária de início dos sintomas (CARAMELLI, 2005; Figura 1).



**Figura 1. Aspectos histopatológicos detectadas no córtex cerebral de um paciente com DA (*post mortem*).** A. Placas senis (seta); B. Emaranhados neurofibrilares (seta).  
Fonte: La Ferla & Oddo, 2005.

## 2.2 Mecanismo molecular da Doença de Alzheimer

As placas senis são constituídas, em grande parte, pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide que são consideradas como um dos principais determinantes na patogênese da DA (SELKOE, 2002; AXELSEN et al., 2011). O peptídeo  $\beta$ -amilóide é constituído de 39 a 42 aminoácidos, resultante da clivagem anormal de uma proteína precursora amilóide (PPA) (TANZI et al., 1987; JOMOVA et al., 2010). O peptídeo  $\beta$ -amilóide especialmente o fragmento contendo 42 aminoácidos tem efeito neurotóxico (BUTTERFIELD & SULTANA, 2011) e promove uma cascata de eventos no espaço extracelular levando a formação de placas senis neuríticas (ALIEV et al., 2008; MASTERS & SELKOE, 2012). A figura 2 demonstra a formação do peptídeo  $\beta$ -amilóide.



**Figura 2. Mecanismo molecular da doença: Processamento proteolítico da PPA para formação do  $\beta$ -amilóide.** Na DA, a PPA é clivada anormalmente pelas enzimas  $\beta$ -secretase, na qual tem sido indentificada como BACE que é uma protease transmembrana (enzima de clivagem PPA no sítio  $\beta$ ) e pela enzima  $\gamma$ -secretase que tem sua ação dentro de uma região transmembrana. As ações dessas enzimas formam o peptídeo  $\beta$ -amilóide que é secretado e se deposita no espaço extracelular. A presenilina 1 e 2 parecem estar envolvidas numa etapa de clivagem posterior. Fonte: Vassar, 2000; adaptado por Greenberg, 2009.

O peptídeo  $\beta$ -amilóide induz uma resposta inflamatória crônica, envolvendo ativação de células microgliais (AGOSTINHO et al., 2010; MASTERS & SELKOE, 2012). A ativação microglial libera citocinas pró-inflamatórias potencialmente neurotóxicas (e.x., interleucina-6), espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (ERON), e enzimas proteolíticas que podem exacerbar o dano neuronal (AGOSTINHO et al., 2010).

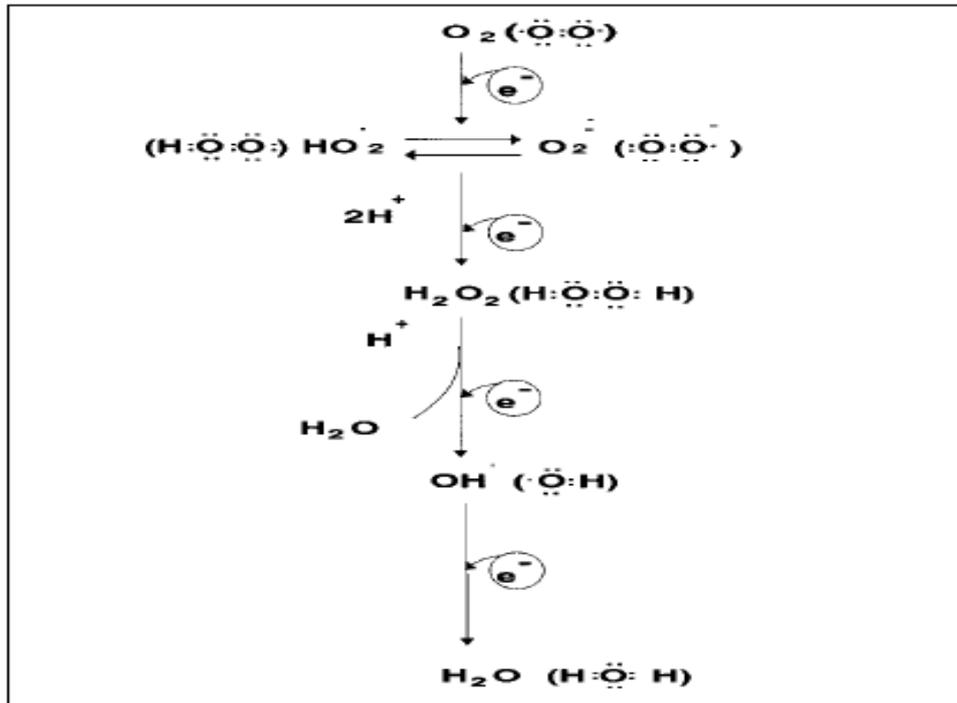
Os emaranhados neurofibrilares são reconhecidos como a maior agregação de proteínas no meio intracelular e são formadas pela proteína *tau* hiperfosforilada (ALIEV et al., 2008). A proteína *tau* está associada aos microtúbulos que participa da formação do citoesqueleto neuronal (CARAMELLI, 2005). Na DA, esta proteína é hiperfosforilada e forma filamentos helicoidais pareados. Este processo causa uma dissociação dos microtúbulos comprometendo a estrutura do citoesqueleto e leva a formação de emaranhados neurofibrilares. Os emaranhados neurofibrilares prejudicam a homeostase neuronal, por interferirem na neurotransmissão (CARAMELLI, 2005; REDDY, 2011).

Tanto o processo de metabolismo anormal da proteína precursora amilóide, e a hiperfosforilação da proteína *tau*, culminam com a disfunção sináptica e a morte neuronal (MARKESBERY & CARNEY, 1999; REDDY 2011).

### **2.3 Espécies Reativas e Estresse Oxidativo**

Radicais livres são compostos que possuem um elétron não pareado em sua última camada eletrônica e são altamente reativos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Os radicais livres mais comuns intracelulares são radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), óxido nítrico (NO), alcoxila ( $RO^{\cdot}$ ) e peroxila ( $RO_2^{\cdot}$ ). Alguns agentes reativos patogênicos, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e peronitrito ( $ONO_2$ ) não apresentam elétrons desemparelhados na sua última camada, no entanto, podem levar a produção de radicais livres através de várias reações químicas (CLARK et al., 2010). Estas moléculas similares e os radicais livres são frequentemente classificadas como espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (ERON) devido a sua capacidade para causar modificações oxidativas dentro da célula (ALIEV et al., 2008; CLARK et al., 2010).

A redução da molécula de oxigênio a água é a maior fonte de radicais potentes. O  $O_2$  sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de  $H_2O$ , demonstrado na figura 3 (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).



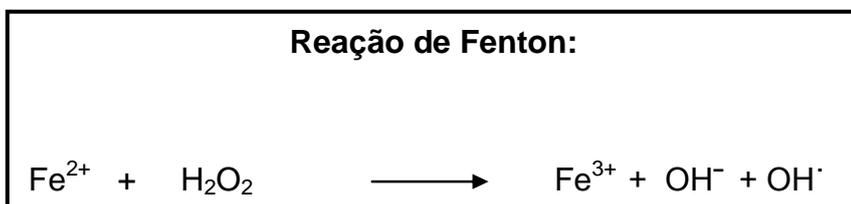
**Figura 3. Redução tetraeletrônica do oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) na mitocôndria até a formação de água (H<sub>2</sub>O). Várias espécies reativas de O<sub>2</sub> são formadas no processo.** Fonte: Ferreira & Matsubara, 1997; adaptado de Cohen, 1989.

Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), hidroperoxila (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>), hidroxila (OH<sup>•</sup>) e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Esses radicais e o oxigênio singlet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) são exemplos de espécies reativas do oxigênio (ERON). A reatividade das ERONs é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons e normalmente a redução completa do O<sub>2</sub> ocorre na mitocôndria (COHEN, 1989). A mitocôndria é a maior fonte intracelular de ERONs e é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo (SU et al., 2008; REDDY, 2011).

O radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) é considerado uma ERON “primária” e pode interagir com outras moléculas para formar ERONs “secundárias”, diretamente ou mediada por processos catalisados por enzimas ou por metais (VALKO et al., 2005).

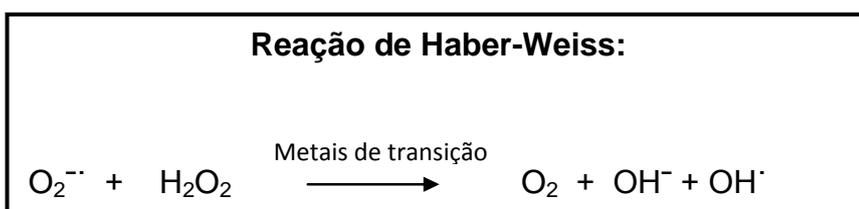
A dismutação do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) ocorre através da redução de 2 elétrons na molécula de O<sub>2</sub> e pela ação de diversas enzimas oxidases *in vivo*. Esta reação forma o radical intermediário peróxido de hidrogênio, este tem papel fundamental, pois na presença de metal de transição

gera o radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), via reação de Fenton (Figura 4; VASCONCELOS et al., 2007 ).



**Figura 4. Reação de Fenton.** Fonte: Vasconcelos et al., 2007.

O radical superóxido participa também da reação de Haber-Weiss (Figura 5) que é catalisado por metais de transição. Esta reação gera o  $\text{OH}^\cdot$  promovendo o acúmulo de ERON (VASCONCELOS et al., 2007 ).



**Figura 5. Reação de Haber-Weiss.** Fonte: Vasconcelos et al., 2007.

O radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) é considerado uma das ERON mais reativas em sistemas biológicos. A combinação extremamente rápida do  $\text{OH}^\cdot$  com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VASCONCELOS et al., 2007). O  $\text{OH}^\cdot$  reage com uma série de endobióticos, causa modificação no DNA (com modificação das bases purínicas pirimidínicas e quebra das fitas), ocasiona danos nas proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS), além de poder iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990).

As ERONs são formadas sobre condições normais, e embora sejam quimicamente instáveis e altamente reativos, são cuidadosamente mantidos a níveis relativamente baixos através de um eficiente sistema antioxidante (PRATICÒ & SUNG, 2004; VASCONCELOS et al., 2007).

O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, com dano consequente (HALLIWELL &

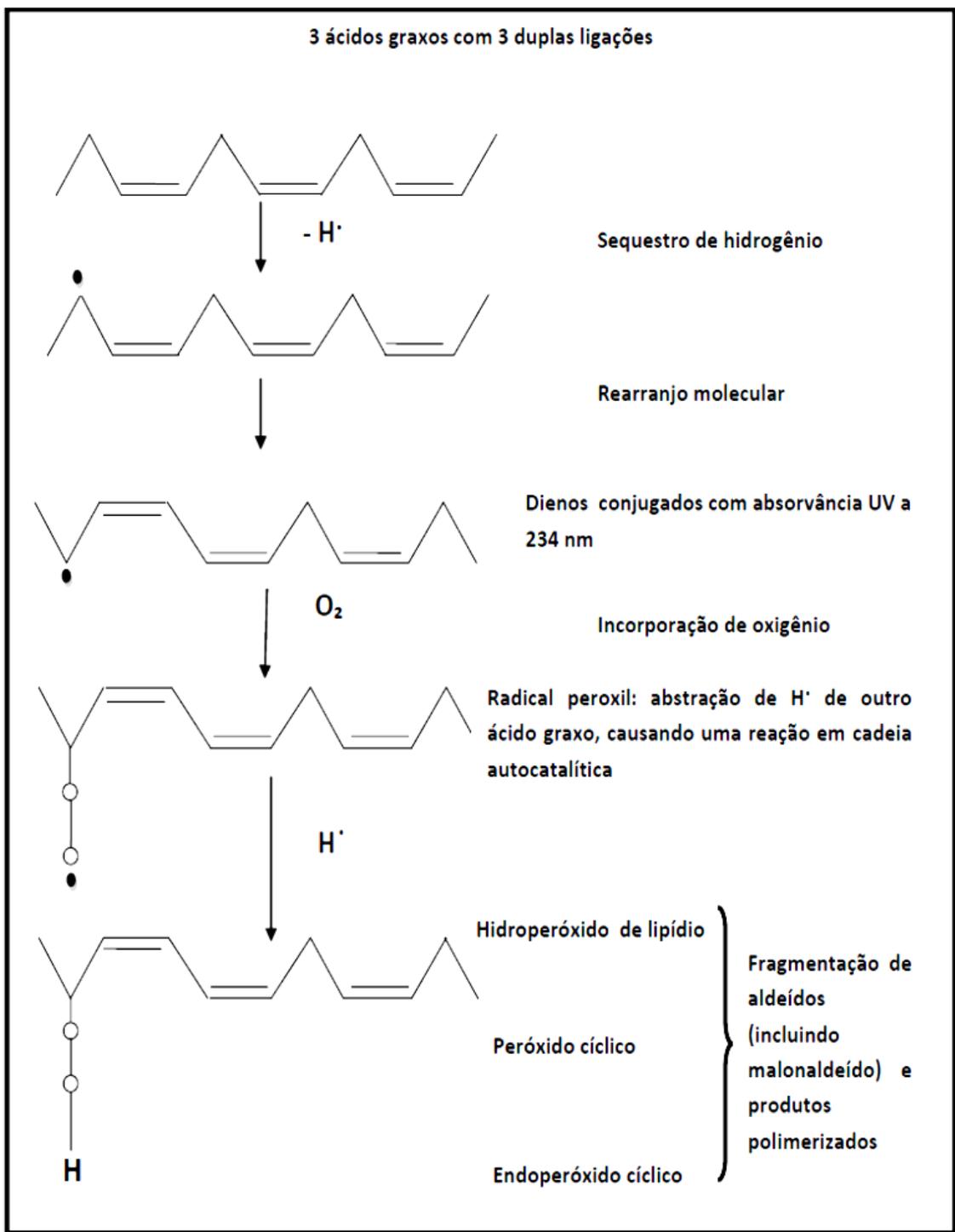
GUTTERIDGE, 2007; BUTTERFIELD & SULTANA, 2011). O dano oxidativo pode ocorrer em todas as maiores macromoléculas nas células, incluindo lipídios, proteínas e ácido nucleicos (MCGRATH et al., 2001; DEL VALLE, 2011). Quando acontece em lipídios, o processo é conhecido como peroxidação lipídica (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

## **2.4 Peroxidação Lipídica**

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERONs, porém a membrana é um dos componentes mais atingidos, o que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (AXELSEN et al., 2011). Os fosfolipídios da membrana cerebral são compostos por ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) que são especialmente vulneráveis ao ataque de radicais livres em função de suas duplas ligações facilitarem a remoção dos íons hidrogênio (MARKERSBERY, 1999).

Existem pelo menos duas vias de peroxidação lipídica, uma enzimática, que envolve a via das cicloxigenases e lipoxigenases na oxigenação dos AGPI, e outra não enzimática, da peroxidação dos AGPI, envolve a participação de espécies reativas do oxigênio, metais e outros radicais livres (AL MEHDI et al., 1993).

A peroxidação lipídica é um processo extremamente complexo que culmina com a destruição celular e inicia-se com a abstração de um átomo de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de AGPI da membrana celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). O radical formado sofre um rearranjo molecular para formar dienos conjugados, estes podem reagir espontaneamente com o oxigênio, formando radical peroxila que propagam a cadeia de peroxidação lipídica abstraindo átomos de hidrogênio para formar hidroperóxidos e novos radicais de carbono, levando à oxidação de muitas moléculas de ácidos graxos (JIALAL & GRUNDY, 1992). Desta forma, a retirada de um único hidrogênio pode iniciar uma reação em cadeia de radicais livres, que leva a conversão de vários lipídios de membrana em hidroperóxidos lipídicos (Figura 6).



**Figura 6. Peroxidação lipídica: uma reação em cadeia.** Fonte: Halliwell & Gutteridge, 2007.

A peroxidação dos AGPI dá origem a vários compostos, tais como alcanos, alcenos, aldeídos, hidroperóxidos, hidroxiácidos e cetonas, sendo que os mais

estudados são os aldeídos e os hidroperóxidos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Os aldeídos resultantes da injúria mediada por radicais livres com danos diretos nas membranas, incluem principalmente, o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-nonenal (SLATER, 1984). Destes, o MDA é o aldeído mais abundantemente produzido na peroxidação lipídica. A formação de MDA ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e tecidos (BONNES & GUÉRIN, 1992), além disso, pode ser considerado um marcador de peroxidação lipídica (DRAPER et al., 1988). O MDA é um aldeído de cadeia curta que faz parte das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) sendo um dos compostos frequentemente avaliados (FACHERIS et al., 2004).

Todas estas modificações oxidativas, causam mudanças nas propriedades físicas e químicas nas membranas, modificando a sua fluidez e permeabilidade, com expansão do líquido intracelular e risco de ruptura das membranas da célula e das organelas, com conseqüente morte celular (VASCONCELOS et al., 2007).

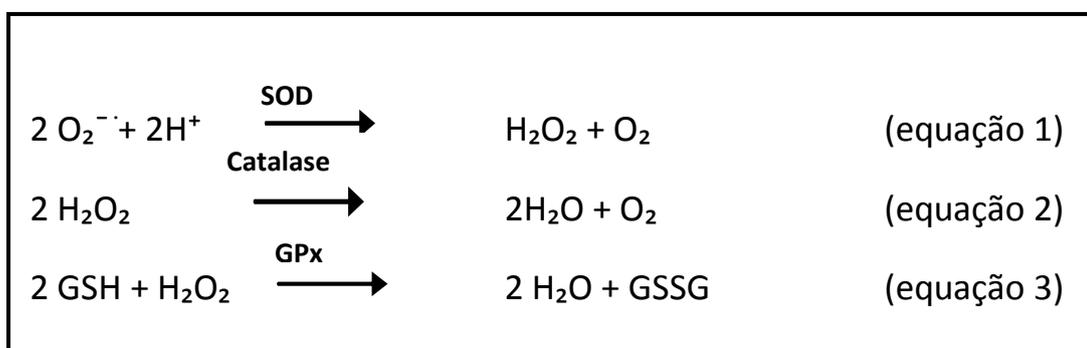
A existência de hidroperóxidos dentro das membranas causa grandes prejuízos à sua função, pois alterações decorrentes na sua fluidez permitem que íons, tais como o cálcio, atravessem em excesso na membrana. Conseqüentemente, a elevação do cálcio intracelular pode levar a injúria neuronal (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

O término da lipoperoxidação ocorre quando o radical lipídico e radical peroxila produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem a si próprios (FERREIRA & MATSUBARA, 1997), ou ainda, com a neutralização dos radicais formados pela reação de dois radicais lipídicos formando produtos não radicalares ou por ação de antioxidantes (VASCONCELOS et al., 2007).

## 2.5 Antioxidantes

O organismo dispõe de um eficiente sistema de defesa, composto por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, que agem sobre as espécies reativas doando elétrons, evitando assim, o dano celular (VALKO et al., 2007).

Os antioxidantes enzimáticos são representados, principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx; Figura 7; VASCONCELOS et al., 2007).



**Figura 7. Antioxidantes enzimáticos: SOD, catalase e GPx.** Equação 1: a superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) a peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e  $\text{O}_2$ ; Equação 2: a catalase (CAT) atua na decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ ; Equação 3: a glutatona peroxidase (GPx) atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutatona como co-fator resultando em  $\text{H}_2\text{O}$  e glutatona oxidada (GSSG). Fonte: Vasconcelos et al., 2007.

As principais formas de superóxido dismutases, encontradas em humanos são a cobre-zinco/SOD (Cu/Zn SOD) que está presente principalmente no citosol (dimérica), além de lisossomas, núcleo e espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria (tetramérica) e a manganês/SOD (Mn/SOD) localizada na mitocôndria (VASCONCELOS et al., 2007).

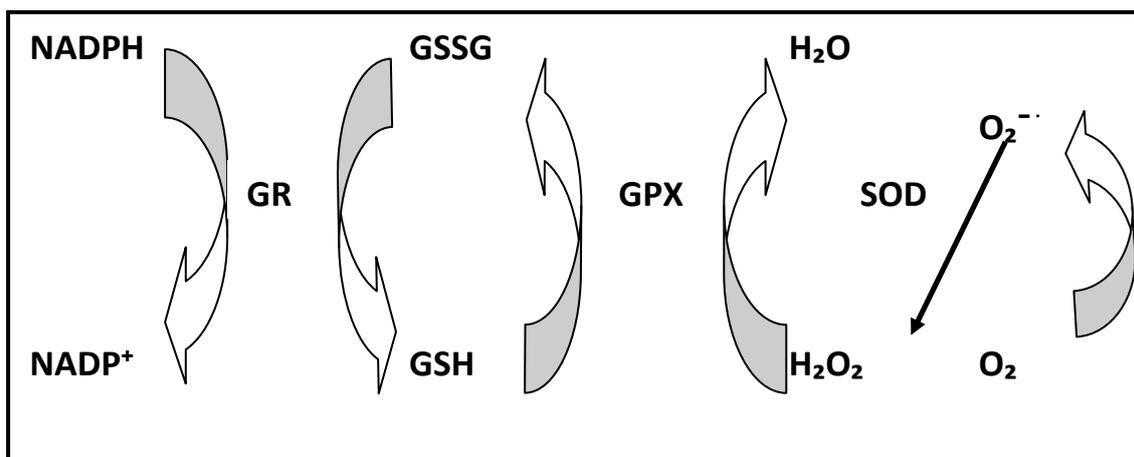
A catalase é uma hemeoproteína citoplasmática, está enclausurada no peroxissoma, a principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, fonte inesgotável de peróxidos orgânicos, produtos carbonílicos e oxigênio singlete. A catalase também é encontrada nas mitocôndrias e tecido cardíaco (VASCONCELOS et al., 2007).

A glutationa-peroxidase (GPx) reduz  $H_2O_2$  e outros peróxidos a água ou álcool. A família do GPx integra o grupo de selenoproteínas, que têm, em seu sítio ativo, o selênio (Se), obtido da dieta ligado à metionina, em alimentos de origem vegetal (selenometionina) e, ligado à cisteína, em alimentos de origem animal (selenocisteína). O selênio é reconhecidamente um nutriente antioxidante, com recomendações de obtenções na dieta considerando sua atividade antioxidante e nutricional (AMAYA-FARFAN et al., 2001).

O sistema não enzimático é formado por muitas substâncias, com destaque para a glutationa (GSH), principal composto antioxidante intracelular,  $\alpha$ -tocoferóis (vitamina E), ascorbato, ácido úrico e  $\beta$ -caroteno, além de proteínas de transporte de metais de transição como a transferrina (transporte do ferro) e ceruloplasmina (transporte do cobre e oxidação do ferro para ser captado pela transferrina) (HALLIWELL & GUTERRIDGE, 2007).

A glutationa (GSH) é um tripeptídeo (*L*- $\gamma$ -glutamil-*L*-cisteinilglicina) que desempenha importantes funções em células humanas, especialmente como agente antioxidante. A forma reduzida da glutationa (GSH) mantém os grupos tióis (-SH) das proteínas, reduz ligações dissulfetos (-S-S) induzidas pelo estresse oxidativo, neutraliza os radicais livres e detoxifica eletrófilos (DICKINSON, 2002). Desta forma, a concentração intracelular de GSH é um indicador da capacidade da célula em manter sua homeostase, através da neutralização de agentes oxidantes (SCHOTT et al., 2007).

Mediante a presença de peróxidos, a GSH intracelular é convertida a glutationa oxidada (GSSG) pela glutationa peroxidase, que catalisa a redução destes peróxidos. A redução da GSSG a GSH ocorre na presença da enzima glutationa redutase, cujo substrato é o NADPH (COMPORTI, 1987). A glicose-6-fosfato desidrogenase, como fonte de NADPH, garante a redução da GSSG e a manutenção de uma constante da reserva de GSH, especialmente no eritrócito (MEINSTER, 1984; Figura 8).



**Figura 8.** O ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) é formado na mitocôndria através da fosforilação oxidativa de um oxigênio molecular e é convertido a  $H_2O_2$  pela superóxido dismutase (SOD). A detoxificação do  $H_2O_2$  é realizada através da glutaciona peroxidase (GPx) na presença da glutaciona reduzida (GSH), levando a formação da glutaciona oxidada (GSSG). A glutaciona redutase (GR) restaura a GSSG a GSH utilizando o NADPH. Fonte: Marcourakis, 2008.

O nível de glutaciona em eritrócitos está principalmente em sua forma reduzida (99,5%) e a concentração de GSSG em eritrócitos é descrita como baixa porque esta atravessa facilmente a membrana celular (MIMIC-OKA, 1998).

O sistema antioxidante enzimático e a glutaciona estão presentes, predominantemente, no meio intracelular, daí a utilização do eritrócito para sua análise. Por outro lado, o sistema antioxidante não enzimático localiza-se principalmente, no meio extracelular, sendo por isso analisado em plasma e soro (VASCONCELOS et al., 2007).

A avaliação da atividade das enzimas antioxidantes pode dar uma estimativa do sistema de defesa antioxidante que pode ser regulada pelo estresse oxidativo no organismo estudado (LLESUY et al., 1990).

Alguns autores defendem o estudo da capacidade antioxidante total (CAOT), pois reflete melhor o efeito antioxidante total (WAYNER et al., 1987; FOY et al., 1998), ao invés da análise de antioxidantes isolados, principalmente devido à interação que existe entre eles no plasma ou no soro (VASCONCELOS et al., 2007). Na análise da CAOT, leva-se em conta a ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes neste meio, obtendo-se um parâmetro integrado, capaz de revelar alterações do equilíbrio redox *in vivo* (VASCONCELOS et al., 2007).

Existem várias técnicas para mensurar a CAOT nos fluidos biológicos. Nestes ensaios um radical é gerado e reage com moléculas-alvo, para produzir cor, fluorescência, quimioluminescência, perda ou ganho de sinais de ESR (“Electron Spin Resonance” ou Ressonância do Spin Eletrônico) ou outra mudança mensurável. A presença de antioxidantes altera esses sinais, o que permite a sua análise quantitativa (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Dentre os testes utilizados, a capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox (TEAC), baseia-se na determinação analítica envolvendo a transferência de elétrons (HUANG et al., 2005). Neste teste, a capacidade antioxidante é comparada com o análogo sintético da vitamina E, o Trolox (VASCONCELOS et al., 2007).

## **2.6 Estresse oxidativo e Doença de Alzheimer**

O cérebro é particularmente sensível ao dano oxidativo devido à riqueza de ácidos graxos poliinsaturados; por ser responsável por cerca de 20% do consumo total de oxigênio; pela pobreza nos mecanismos de defesa antioxidante; por possuir altos níveis de ferro; pelo grande fluxo de cálcio no metabolismo neuronal; e pela presença de aminoácidos excitatórios no sistema nervoso central, tal como o glutamato (MARKESBERRY, 1999; MIGLIORE & COPPEDÈ, 2009).

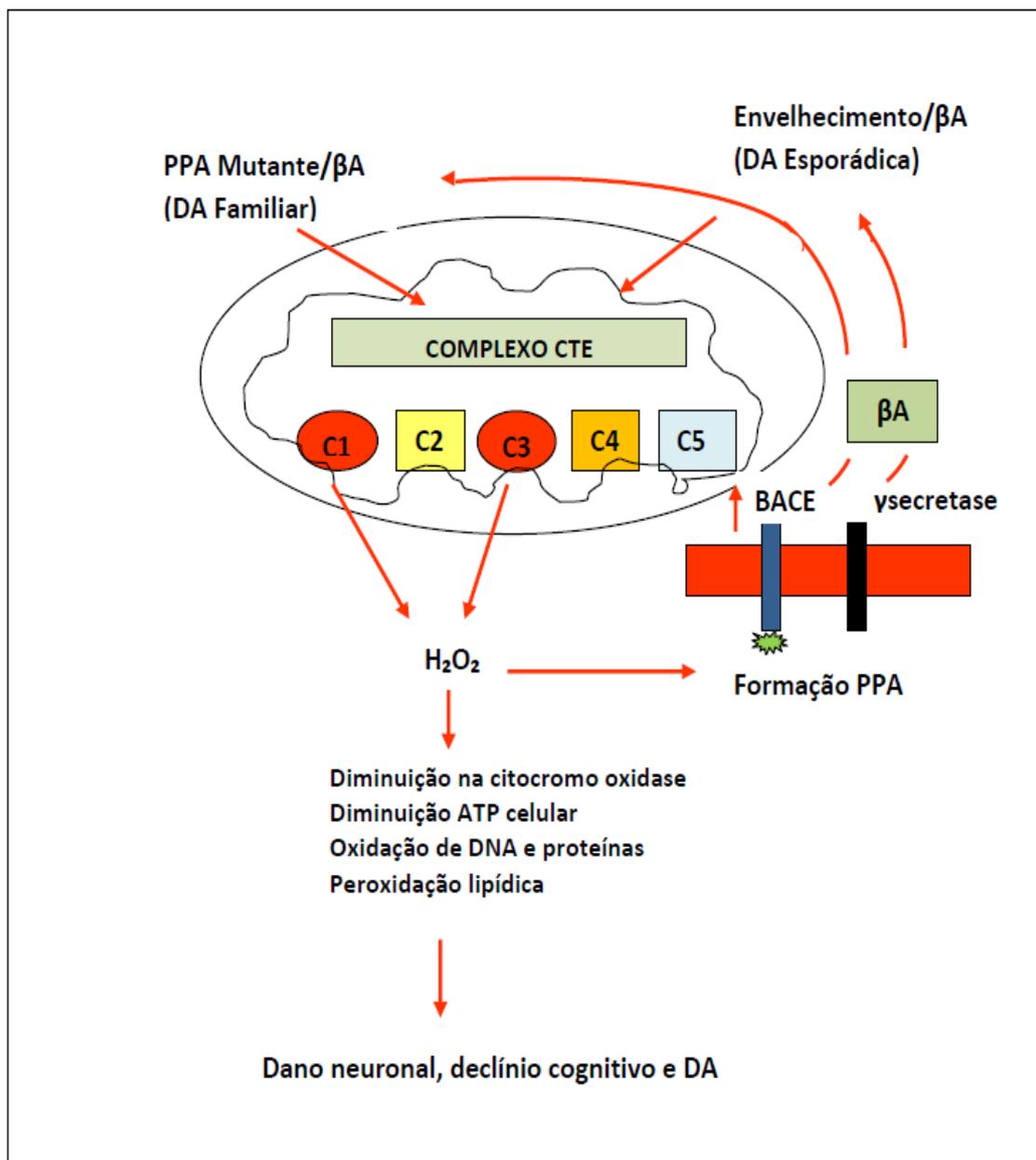
Investigações nos cérebros de pacientes com DA revelaram aumento dos níveis de marcadores de estresse oxidativo (PRATICÒ, 2008). Uma teoria para a patogênese da DA postula que a neurodegeneração é o resultado de alterações no metabolismo oxidativo (MARKESBERRY, 1999; SOLFTRIZZI, 2006) com acometimento do tecido cerebral vulnerável (MARKESBERRY, 1999).

O fato de o envelhecimento ser um fator de risco na DA, reforça também a hipótese da participação dos radicais livres, pois os efeitos de sua ação podem se acumular durante anos (MARKESBERRY & LOVELL, 2006; DEL VALLE, 2011). No envelhecimento, o acúmulo de oxidação de macromoléculas como os lipídios, proteínas e DNA, decorrente da ação dos radicais livres estão relacionadas com o declínio funcional no cérebro, se manifestando por uma deterioração nas funções cognitivas e na capacidade motora (POON et al., 2004).

A toxicidade mediada pela proteína  $\beta$ -amilóide induzindo o estresse oxidativo corrobora com a teoria do envolvimento do estresse oxidativo na gênese da DA (MASTERS & SELKOE, 2012). Nas formas esporádicas da DA foram observados que a disfunção mitocondrial e o metabolismo oxidativo têm um papel importante na sua patogênese (REDDY & BEAL, 2005; ZHU et al., 2005; DUMONT et al., 2010).

A neurotoxicidade induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide pode ser mediada por vários mecanismos, tais como alterações nas enzimas mitocondriais (ECKERT et al., 2003) com danos na estrutura da mitocôndria (CHEN et al., 2006). Estudos sugerem que nos neurônios da DA, os radicais livres são formados na matriz mitocondrial (LI et al., 2004). No entanto, o mecanismo bioquímico exato da neurotoxicidade da proteína  $\beta$ -amilóide, bem como a influência do estresse oxidativo sobre a morte neuronal na DA, ainda é desconhecido (ZAFRILLA et al., 2006; BUTTERFIELD & SULTANA, 2011).

Na mitocôndria, aproximadamente 98% do oxigênio molecular são consumidos pela cadeia de transporte de elétrons (CTE) mitocondrial. Sob condições de estresse oxidativo e no envelhecimento, o sistema de transporte de elétrons pode aumentar consideravelmente a formação de ERON, especificamente no complexo I (NADH desidrogenase) e III (citocromo- ubiquinona C redutase). Assim, a mitocôndria pode ser tanto fonte como alvo de ERON (HUANG & MANTON, 2004). De modo geral, a disfunção mitocondrial pode levar a degeneração neuronal na DA pelo prejuízo na produção de adenosina trifosfato (ATP), alteração na homeostase do cálcio, alteração na permeabilidade mitocondrial e excitotoxicidade (MARKESBERY, 1999) que podem levar a oxidação de DNA, de proteínas e a peroxidação lipídica. O círculo vicioso de radicais livres levando a formação de  $\beta$ A, e o  $\beta$ A formando os radicais livres resulta em dano neuronal, neurodegeneração e declínio cognitivo (LI et al., 2004; Figura 9).



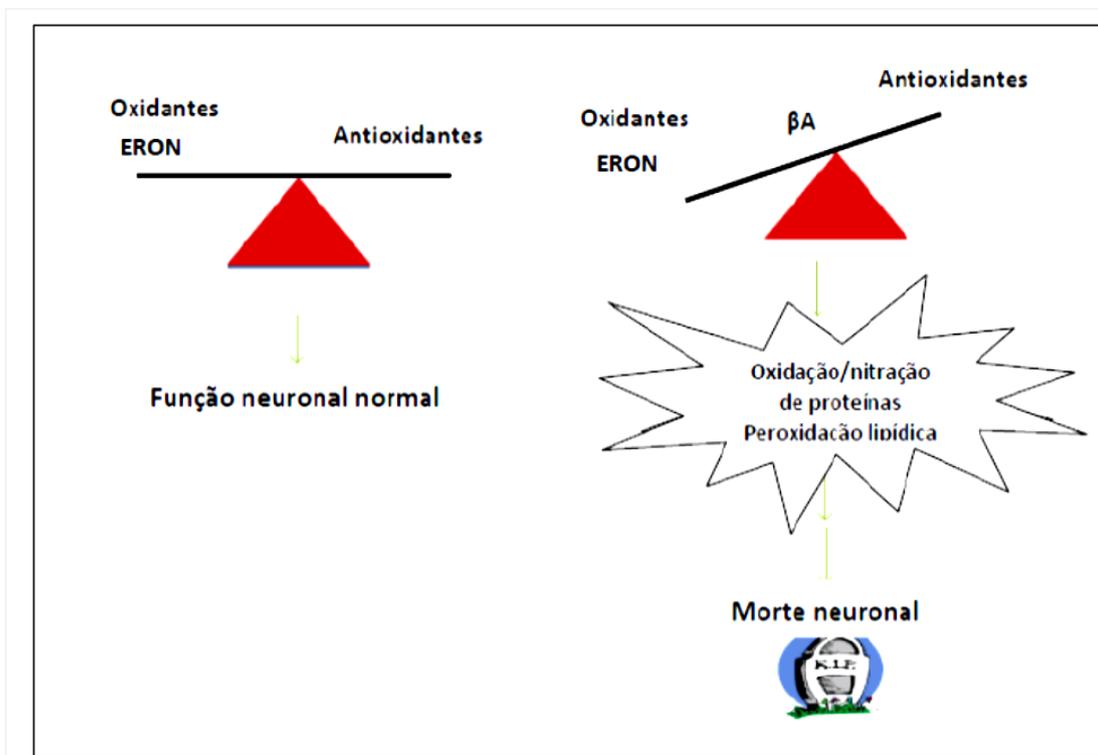
**Figura 9. Modelo proposto de uma possível relação entre ERON e a DA familiar/espórádica.** No modelo de DA familiar, a proteína precursora amilóide (APP) mutante e/ou βA solúvel localiza-se na mitocôndria neuronal, que leva a formação de radicais livres, tais como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nas formas esporádicas os radicais livres formados devem-se ao envelhecimento que ativa a enzima beta-secretase (BACE) e facilita a clivagem da molécula APP, com a formação do βA. Tanto o βA pode causar danos na cadeia transportadora de elétrons (CTE), através da formação de EROs, como a própria CTE, pode ser fonte de EROs que podem levar a formação do βA. Fonte: Li *et al.*, 2004.

A fosforilação da proteína *tau* com a formação dos emaranhados neurofibrilares observados na DA também está relacionada com o aumento na produção de

radicais livres. O aumento na produção de radicais livres, leva ao acúmulo de cálcio intracelular (HARMAN, 1995) e ativação de enzimas dependentes de cálcio. Como consequência do acúmulo de cálcio, ocorre ativação da proteína c kinase, um dos elementos responsáveis pela fosforilação da proteína *tau* com a formação dos emaranhados neurofibrilares (HARMAN, 2002) ou nos casos mais extremos, desencadeia a apoptose neuronal (SELKOE, 1999).

Adicionalmente, a presença dos metais de transição tais como o cobre e o ferro, tem papel importante no estresse oxidativo (JOMOVA et al., 2010). O ferro, por exemplo, se acumula com a idade, tornando o cérebro um alvo ideal para ação dos radicais livres (MCGRATH et al., 2001; CASTELLANI et al., 2007). As pesquisas também têm descrito o papel do alumínio numa variedade de desordens neurodegenerativas incluindo a DA, e tem sido associado à formação de ERON. Este pode potencializar os eventos oxidativos e inflamatórios induzidos pelo ferro, levando ao dano tecidual (JOMOVA et al., 2010). O alumínio e outros metais, particularmente o ferro, o cobre e o zinco foram encontrados em níveis elevados nos depósitos  $\beta$ -amilóides, sugerindo a sua participação, na agregação e acúmulo desses depósitos (SQUITTI, 2012).

O envolvimento do peptídeo  $\beta$ -amilóide na indução do estresse oxidativo levando a morte neuronal foi observado tanto em estudos *in vitro* como *in vivo* (MARKESBERY, 1999; BUTTERFIELD et al., 2007; BUTTERFIELD & SULTANA, 2011). O desequilíbrio entre o sistema oxidante e o sistema antioxidante associado ao peptídeo  $\beta$ -amilóide é decorrente do aumento da produção dos radicais livres (BUTTERFIELD & SULTANA, 2011) ou do déficit no sistema antioxidante endógeno (KIM et al., 2003), que é considerado outro mecanismo de neurotoxicidade induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide promovendo assim, o estresse oxidativo (BUTTERFIELD & SULTANA, 2011; MASTERS & SELKOE, 2012; Figura 10).



**Figura 10. Estresse oxidativo e perda neuronal induzido pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide na DA.** Desequilíbrio entre os oxidantes e antioxidantes induzido pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide. Ação dos oxidantes nas proteínas, lipídios e ácidos nucleicos altera sua estrutura e função, e pode levar a morte neuronal. Fonte: Butterfield & Sultana, 2011.

Na DA os níveis elevados de peroxidação lipídica são acompanhadas por uma elevação de mecanismos de defesa antioxidante representadas por um aumento na SOD, CAT e GPx (SUBBARAO et al., 1990). O aumento no nível de antioxidantes é uma forma de proteção criada pelo organismo, pois a grande produção de radicais livres pode levar a danos na célula. Este efeito, porém, pode se esgotar ao longo do tempo (CHINTA & ANDERSEN, 2008). Em relação à CAOT esta se encontra frequentemente diminuída e pode ser atribuída ao estresse oxidativo envolvido na DA (REPETTO et al., 1999).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Avaliar se ocorrem alterações no metabolismo oxidativo detectáveis no sangue de pacientes com a DA, e se estas podem ser relacionadas com os diferentes estágios da doença e com o quadro cognitivo dos pacientes.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a peroxidação lipídica no sangue dos pacientes e correlacionar com estágio da DA e o quadro cognitivo dos pacientes.

- Avaliar a capacidade antioxidante total no sangue dos pacientes e correlacionar com estágio da DA e o quadro cognitivo dos pacientes.

- Correlacionar dados demográficos, clínicos, neuropsicológicos, com estágio da DA, quadro cognitivo dos pacientes e os valores de TBARS e CAOT.

## 4. MÉTODOS

### 4.1 Sujeitos da pesquisa

Esta pesquisa foi realizada com pacientes atendidos na Unidade de Ensino e Assistência de Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade do Estado do Pará (UEAFTO), no município de Belém/Pará.

Inicialmente foram avaliados trinta e seis pacientes com DA, porém seis pacientes foram excluídos devido à co-existência de diabetes mellitus. A amostra final foi constituída de trinta pacientes com DA (idade média 82,9 anos,  $\pm 7,5$  anos, 22 mulheres e 8 homens). Estes pacientes foram diagnosticados segundo o Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – fourth edition (DSM-IV) e preenchem os critérios do National Institute of Neurological and Communication Disorders and Stroke (NINCDS) e pela Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (ADRDA) proposto por Mckhann et al. (1984). A duração média dos sintomas dos pacientes com DA era de 5,2 anos,  $\pm 3,1$  anos. Vinte cinco sujeitos estavam em uso de terapia com inibidores da acetilcolinesterase e/ou uso de memantina.

No grupo controle, dos trinta e três sujeitos selecionados, cinco foram excluídos devido à co-existência de diabetes mellitus. Este grupo de pacientes foi comparado com os pacientes com DA e foi constituída por vinte e oito sujeitos (idade média 68,1anos,  $\pm 8,0$  anos, 20 mulheres e 8 homens). Os sujeitos controles estavam livres de doença ou sintoma neurológico, avaliados através da anamnese, exame físico geral e neurológico, além de exames laboratoriais para avaliar os diversos sistemas, como função renal, hepática e tireoidiana.

O diabetes mellitus e o uso de drogas hipoglicemiantes são condições que podem mascarar os resultados em termos de estresse oxidativo (SERRA et al., 2004), por este motivo, os pacientes com diabetes do grupo de sujeitos com DA e controles foram excluídos.

Todos os participantes tanto do grupo controle quanto do grupo com a DA foram submetidos à avaliação clínica e neurológica, incluindo a avaliação das funções cognitivas, e foram avaliados por uma das duas médicas especialistas com área de atuação em neurologia que participaram na realização deste trabalho. Após

a avaliação médica os pacientes que corresponderam aos parâmetros de inclusão da pesquisa foram encaminhados para a coleta de amostra de sangue venoso que foi realizado pelo técnico de laboratório da UEPA.

Os pacientes com DA na fase grave foram avaliados em suas residências devido às dificuldades atribuídas ao processo da doença e na sua locomoção.

Os participantes da pesquisa foram incluídos segundo os preceitos da Declaração de Helsinque e do Código de Nuremberg, respeitadas as Normas de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Res. CNS 196/96) do Conselho Nacional de Saúde. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Hospital de Clínicas Gaspar Vianna, autorizado pelo coordenador da pesquisa (APÊNDICE A). A autorização para participação da pesquisa através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE B) foi obtida de todos os participantes ou de seus cuidadores, sendo os mesmos informados sobre os objetivos da pesquisa e a confidencialidade dos dados.

#### **4.2 Critérios de inclusão**

No grupo de DA os critérios de inclusão foram: Idosos atendidos no Centro de Geriatria e Gerontologia da UEPA e pacientes da Associação de Alzheimer da cidade de Belém previamente diagnosticados com DA; idade igual ou maior a 60 anos; de ambos os sexos; qualquer raça; qualquer escolaridade. No grupo controle os critérios de inclusão foram: idosos atendidos na UEAFTO da UEPA; acompanhantes ou cuidadores dos pacientes com DA; sem doença neurológica e/ou metabólica que pudesse interferir no desempenho das funções cognitivas; idade igual ou maior de 60 anos; de ambos os sexos; qualquer raça; qualquer escolaridade.

### **4.3 Critérios de exclusão**

Na seleção da amostra da população foram estabelecidos os seguintes critérios de exclusão: idade menor de 60 anos, algum tipo de doença no curso da avaliação; evidência de lesão cerebral orgânica; distúrbios metabólicos, como disfunções hepáticas, renais, tireoidianas e diabetes mellitus; presença de outra doença neurológica prévia ou concomitante que possa afetar a função cognitiva (ex: Doença de Parkinson ou síndrome parkinsoniana); uso de suplementos vitamínicos; presença de tabagismo e etilismo; solicitação espontânea para retirada da pesquisa.

### **4.4 Protocolo de Avaliação**

O Protocolo de Avaliação (APÊNDICE C) inclui informações sócio-demográficas, avaliação clínica geral e avaliação cognitiva. A avaliação clínica geral foi feita através da anamnese do paciente, além de exame físico geral e neurológico, complementada por exames laboratoriais (realizadas previamente nos pacientes com DA), tais como função hepática, renal, tireoidiana, ácido fólico, dosagem de vitamina B12, além do VDRL ("Venereal Disease Research Laboratory"), a fim de excluir causas sistêmicas de demência. Foram também avaliados os resultados de exames de imagem como a Tomografia Computadorizada (TC) de crânio e/ ou a Ressonância Nuclear Magnética (RNM) de Crânio para auxílio diagnóstico.

### **4.5 Avaliação da função cognitiva**

A função cognitiva dos pacientes com Alzheimer foi avaliada através de testes baseados em recomendações do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia (ABN).

Foram avaliadas as funções cognitivas (global, memória, atenção, linguagem, funções executivas, conceituação e abstração e habilidades construtiva), nos quais foram utilizados testes neuropsicológicos, como o Mini-Exame do Estado Mental (MEEM; FOLSTEIN et al., 1975; ANEXO A), o Teste de Fluência Verbal (ISAACS &

KENNIE, 1973; ANEXO B), Teste do Desenho do Relógio (SUDERLAND et al., 1989; ANEXO C) e Teste da Bateria Cognitiva Breve (NITRINI et al., 1994; ANEXO D)

#### **4.5.1 Instrumentos para avaliação**

O Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) é um teste de rastreio que necessita de outros instrumentos para avaliar a função cognitiva. A pontuação vai de 0 a 30 e os níveis de corte utilizadas foram as médias propostas por Brucki et al. (2003) para as diversas faixas de escolaridade, menos um desvio-padrão. Para 1 a 4 anos de escolaridade foi utilizada a nota 22, para 5 a 8 anos, a nota 24, e para mais de 9 anos de escolaridade, a nota 26.

O teste de fluência verbal (TFV) empregado foi o de categoria semântica (animais/minuto). Neste teste solicita-se ao indivíduo que diga o maior número de animais no menor tempo possível. O escore é definido como o número de itens (excluindo-se as repetições) em um minuto. As notas de corte foram 9 para escolaridade <8 anos e 13 para escolaridade mais alta. O TFV tem como vantagem a sua brevidade e a disponibilidade de notas de corte definidas em função da escolaridade (NITRINI et al., 2005).

A versão utilizada no teste do desenho do relógio (TDR) foi o proposto por Suderland et al. (1989). Basicamente o que se solicita ao indivíduo é o desenho espontâneo de um mostrador de relógio com todos os números e com os ponteiros mostrando horário previamente estabelecido. A grande limitação do TDR diz respeito à forte influência da baixa escolaridade sobre o desempenho.

O teste da bateria cognitiva breve (TBCB) proposto por Nitrini et al. (1994) consiste na apresentação de 10 figuras desenhadas em um papel. Estas são nomeadas individualmente e em seguida devem ser lembradas de uma forma incidental, sem o aviso prévio de que deveriam ser memorizadas (memória incidental). As figuras são mostradas posteriormente mais duas vezes, seguida em cada etapa para que digam quais eram as figuras (memória imediata). Subseqüentemente é realizado uma interferência através do teste da fluência verbal e o teste do desenho do relógio. Em seguida avalia-se a memória tardia dos 10

itens, solicitando a evocação das figuras apresentadas. O teste final é feita através do reconhecimento das 10 figuras misturadas com 10 distratores. Essa bateria é menos influenciada pela escolaridade do que as outras provas de memória (NITRINI et al., 2004).

Para o estadiamento da doença foi utilizado o "Clinical Dementia Rating" (CDR; HUGHES et al., 1982). É uma escala de estadiamento específica utilizada para avaliar a gravidade da progressão da DA. Os itens avaliados na escala são: memória, orientação, juízo e solução de problemas, vida cotidiana, tarefas do lar e lazer, e cuidados e higiene pessoal, com escore 0.5 (demência possível), 1 (demência leve), 2 (demência moderada) e 3 (demência grave; ANEXO E).

A depressão foi avaliada em todos os pacientes através da Escala Geriátrica de Depressão (GDS) versão de 30 itens (YESAVAGE, 1983; ANEXO F) e a Escala Analógica de Felicidade (BENSEÑOR, 1997; ANEXO G).

#### **4.6 Coleta de Sangue**

A coleta das amostras de sangue foi realizada após avaliação clínica e neurológica no período da manhã, em jejum, por um técnico de enfermagem habilitado do posto de coleta do Laboratório de Análises Clínicas da UEPA.

Foram colhidos dos pacientes 10 ml de sangue venoso em tubos com heparina. Os tubos foram imediatamente colocados em gelo e levados para o laboratório de pesquisa onde foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos. Uma parte da amostra do sangue foi encaminhada ao Laboratório de Análises Clínicas da Universidade do Estado do Pará (UEPA) para os exames bioquímicos. Os seguintes exames laboratoriais foram realizados: hemograma completo, glicemia, creatinina, uréia, sódio, potássio, cálcio total, TGO, TGP, Gama-GT e VDRL. O plasma obtido da centrifugação foi armazenado no freezer a -70°C para análise posterior da peroxidação lipídica através da determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da capacidade antioxidante total através da determinação da capacidade antioxidante total equivalente ao trolox (TEAC). Estes últimos testes bioquímicos foram realizados no Laboratório de Morfofisiologia Aplicado a Saúde da UEPA.

Os resultados dos exames bioquímicos foram entregues aos pacientes, e aqueles que apresentaram alguma alteração nos exames, foram encaminhados à Unidade Básica do Marco, ou orientados a serem avaliados pelo médico assistente que o encaminhou para participar do trabalho.

#### **4.7 Medidas de Peroxidação Lipídica**

A determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada seguindo os fundamentos iniciais propostos por Konn & Livesedge (1944) e que foi modificada por Percário et al (1994). O método é baseada na reação do malondialdeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em pH baixo e temperatura elevada, para formar o complexo MDA-TBA, de coloração rosada e absorção máxima em 535nm à espectrofotometria. Na amostra testada, cada molécula de MDA reage com duas de TBA.

A etapa inicial consistiu em preparar a água acidificada com ácido acético ou clorídrico até obter o pH 2,5. Em seguida adicionou-se em 1000 ml de água acidificada, 10g de fosfato monobásico de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) para obter uma solução tampão fosfato com concentração de 75 Mm (pH de 2,5).

No procedimento foi adicionado 200  $\mu\text{l}$  de amostra de plasma dos pacientes com 1,0 ml do reagente do ácido tiobarbitúrico (TBA 10 nM em  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  75 Mm) em tubos de ensaio. Em seguida levou-se ao banho-maria a 94°C por uma hora. Após a incubação o mesmo ficou esfriando em temperatura ambiente por um período de 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 4,0 ml de álcool n-butílico (CAAL; 11413), e posteriormente homogeneizou-se bem com a utilização do vórtex (Phenix, AP56) e foi centrifugado a 2500 rpm por 10 min. Após a centrifugação a amostra apresentava duas fases e 3,0 ml do sobrenadante foi retirado com a pipeta e colocado numa cubeta para leitura espectrofotométrica a 535 nm. As cubetas foram mantidas a 25°C e as leituras realizadas em espectrofotômetro.

O MDA presente na amostra é calculado a partir da equação da reta obtida por meio de uma curva-padrão estabelecida por concentrações conhecidas de MDA. A dosagem de MDA, baseado na reação com TBA, em condições acidificadas e de

aquecimento, tem sido a forma mais utilizada de avaliação de peroxidação lipídica (PERCÁRIO et al., 2004).

#### **4.8 Medida da capacidade antioxidante total equivalente ao trolox (TEAC)**

A atividade antioxidante foi determinada segundo a sua equivalência a um potente antioxidante conhecido, o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametoxicromono-2-carboxílico; Aldrich Chemical Co 23881-3), análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. O método realizado foi o de Miller e colaboradores (1993) modificado por Re e colaboradores (1999). O radical cátion  $ABTS^{\cdot+}$  da versão original é formado através da interação do ABTS com a espécie radical ferrilmioglobina, gerado pela ativação da metamioglobina com  $H_2O_2$ . A técnica do TEAC modificada consiste numa técnica colorimétrica baseada na reação entre o 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio (ABTS) com o persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ), produzindo radical cátion  $ABTS^{\cdot+}$ , cromóforo de coloração verde/azul, com absorvância máxima nos comprimentos de onda a 645, 734 e 815nm (RE et al. 1999).

O TEAC mede a capacidade dos antioxidantes presentes na amostra de doar elétron ou hidrogênio que são capazes de eliminar o radical cátion  $ABTS^{\cdot+}$ , comparando-se com o padrão trolox (KARALI et al., 2009). A adição de antioxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz a ABTS, na extensão e escala de tempo dependente da capacidade antioxidante, concentração de antioxidantes e duração da reação (MILLER & RICE-EVANS, 1996).

A técnica consiste na preparação inicial dos reagentes. Foi preparado uma solução tampão fosfato (PBS com pH 7.2) que foi utilizada como solvente no preparo dos reagentes e diluição das amostras. Para o preparo desta solução foram adicionados 1,48g de fosfato de sódio dibásico ( $Na_2HPO_4$ ), 0,43g de fosfato de sódio monobásico ( $NaH_2PO_4$ ) e 7g de cloreto de sódio (NaCl) em 1 litro de água ( $H_2O$ ) destilada. Também foi feito uma solução de estoque de  $ABTS^{\cdot+}$  12 horas antes das dosagens. Para o preparo desta solução foram adicionados 0,0768g do sal diamônio ABTS em 20 ml de PBS, cuja concentração foi de 7mM, e 0,7560g de  $K_2S_2O_8$  em 20 ml de PBS, com concentração de 140mM. Para obtenção da solução de estoque retirou-se 352 $\mu$ l da solução de ABTS anteriormente realizada e misturou-se a esta

solução 352µl da solução de persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ). A concentração final desta mistura foi de 2,45mM. A solução foi conservada no escuro à temperatura ambiente. Além disso, foi preparada a solução de estoque de trolox (Aldrich Chemical Co 23,881-3) que consiste na adição de 0,647g de trolox em 1l de PBS, com concentração de 2,5mM.

No dia da realização das dosagens utilizou-se a solução de trabalho de ABTS<sup>•+</sup>. Esta solução consiste na mistura da solução de estoque ABTS a PBS até que a absorbância a 734 nm seja  $0.7 \pm 0.02$  equilibrada a 30°C.

Para a leitura foi colocado 2970 µl da solução de trabalho de ABTS<sup>•+</sup> na cubeta, e realizou-se a leitura da absorbância a 734 nm (corresponde a T0). Em seguida, foram acrescentados 30 µl da solução de trolox (padrão) sendo homogeneizados manualmente com o auxílio de uma pipeta por 20 segundos, reiniciando-se a leitura na mesma absorbância dentro de um intervalo de 5 minutos. O procedimento foi repetido para cada solução de trolox previamente diluída em PBS em diferentes volumes correspondentes a concentração final de 0 a 2,5 (mM de trolox) separado em 6 tubos de ensaios para a construção da curva padrão. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 734 nm em temperatura ambiente de 25°C.

O mesmo procedimento foi realizado com um controle branco (30 µl de PBS) e com as amostras biológicas estudadas.

A extensão da descoloração como índice de inibição do radical cátion ABTS<sup>•+</sup> é determinada como a atividade antioxidante total da amostra (MILLER et al., 1993), sendo então calculada a sua relação com a reatividade do trolox como padrão, sob as mesmas condições. Os resultados finais foram expressos em micromoles por litro (mM/l) correspondente a concentração do trolox com capacidade antioxidante equivalente à da amostra estudada, padrão de medida denominado de TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*).

#### **4.9 Análise Estatística**

Os grupos de estudo foram constituídos por indivíduos com Doença de Alzheimer e por indivíduos controles. Todos os valores são apresentados como média  $\pm$  DP. Para avaliação das variáveis demográficas foi realizado o teste-*t* de Student. A capacidade antioxidante total equivalente ao trolox (TEAC) e as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram medidas no grupo controle e DA sendo realizados entre todos os grupos a Análise de Variância (ANOVA) seguida da aplicação do Teste de Tukey para comparação entre os grupos. Correlações dos testes cognitivos com variáveis demográficas, de testes cognitivos e variáveis demográficas com os níveis de TBARS e TEAC, foram analisadas utilizando o teste de correlação de Pearson. Também foi realizado o Teste de Kruskal- Wallis para avaliação da correlação entre os testes cognitivos e as variáveis demográficas. O nível de significância  $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo para estes testes.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação clínica e epidemiológica

As características demográficas e clínicas de pacientes com DA e do grupo controle estão apresentadas na tabela 1.

**Tabela 1. Variáveis demográficas e clínicas de pacientes com DA e grupo controle.**

Variáveis	Controles (N= 28)	DA leve (N= 12)	DA moderada (N= 8)	DA grave (N= 10)
Sexo (M/F)	8/20	5/7	1/7	2/8
Idade (anos)	68.1 (± 8.0)	78.2 (± 6.6) **	83.3 (± 5.8) **	88.1 (± 6.5) **; #
Idade de início (anos)	–	74.2 (± 6.1)	78.7 (± 7.3)	80.9 (± 5.8)
Escolaridade (anos)	5.3 (± 3.2)	4.8 (± 3.4)	4.0 (± 3.3)	5.2 (± 4.6)
Duração da doença (anos)	–	4.0 (± 2.4)	4.62 (± 2.9)	7.2 (± 3.1) #
Tempo de uso da medicação (anos)				
Iche	–	2.1 (± 1.9)	1.2 (± 0.8)	2.5 (± 1.9)
Memantina	–	1.1 (± 0.9)	1.6 (± 1.3)	4.3 (± 3.9)

Valores expressos em M (Média), ± DP (Desvio Padrão)

\*\* $p < 0.01$  vs Controle; #  $p < 0.05$  vs DA leve

Na amostra estudada houve um predomínio do sexo feminino na DA (73.3%) e no grupo controle (71.4%). As mulheres com DA tiveram idade média de 84.9 anos (DP ± 8.3 anos) e mediana de 84.5 anos, e os homens idade média de 79.6 anos (DP ± 3.8 anos) e mediana de 81 anos, com diferença estatisticamente significativa ( $p=0.026$ ). Foi observada ainda uma média de idade maior nos estágios mais avançados da doença com diferença significativa ( $p < 0.05$ ) quando se comparou com o estágio leve e diferenças significativas também foram observadas quando se comparou cada estágio da doença com o grupo controle ( $p < 0.01$ ).

A média de escolaridade na DA foi de 4.7 anos (DP ± 3.8 anos) e mediana de 4 anos. No grupo controle, a média de escolaridade foi de 5.3 anos (DP ± 3.2 anos)

e mediana de 5 anos. Não houve diferença significativa quanto à escolaridade entre os grupos ( $p=0.15$ ).

O tempo de evolução da DA foi em média de 5.2 anos ( $DP \pm 3.1$  anos) e mediana de 5 anos, com diferenças estatisticamente significativas quando foi comparado o tempo médio de duração do estágio grave da doença com o estágio leve ( $p<0.05$ ).

A maioria dos pacientes com DA (83.3%) estavam fazendo uso de terapia medicamentosa com inibidores da acetilcolinesterase e/ou memantina.

**Tabela 2. Características clínicas e níveis de TBARS e TEAC no grupo controle e pacientes com DA.**

Variáveis	Controles (N= 28)	DA (N= 30)	P
Hipertensão, n (%)	15 (53.5)	17 (56.6)	0.9782
Dislipidemia, n (%)	11 (39.2)	5 (16.6)	0.1027
D. Cardiovascular, n (%)	3 (10.7)	2 (6.6)	0.6651
Medicação para HAS, n (%)	12 (42.8)	15 (50)	0.7783
Uso de estatinas, n (%)	5 (17.8)	1 (3.3)	0.0968
Uso de aspirina, n (%)	2 (7.1)	2 (6.6)	1.000
TBARS, nmol MDA/ml	64.58 (27.5)	85.75 (52.6)	0.0505
TEAC, mM/l	1.22 (0.14)	0.74 (0.02)	< 0.0001

A comparação entre o grupo controle e pacientes com DA foram analisados por  $\chi^2$ , teste exato de Fisher ou teste-*t* de Student. Os valores são expressos como n (%) ou Média  $\pm$  DP.

Em relação às características clínicas e níveis de TBARS e TEAC no grupo controle e pacientes com DA (tabela 2), foi observado que a presença de doenças associadas independe do paciente ser portador da DA, e que a proporção de pacientes com hipertensão foi semelhante no grupo controle e nos pacientes com DA. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a frequência de doenças cardiovasculares no grupo controle e pacientes com DA. Os níveis de TEAC estavam significativamente elevados no grupo controle ( $1.22 \pm 0.14$  mM/l) do que nos pacientes com DA ( $0.74 \pm 0.02$  mM/l).

## 5.2 Avaliação neuropsicológica

A tabela 3 mostra os desempenhos nos testes neuropsicológicos realizados nos grupos controles e DA.

**Tabela 3. Escores dos testes cognitivos de pacientes com DA e grupo controle.**

Testes	Controles (N= 28)	DA leve (N= 12)	DA moderada (N= 8)	DA grave (N= 10)
Escore MEEM	25.9 ± 2.6	19.6 (± 4.3) **	11.6 (± 4.0) **	1.5 (± 3.1) **
Fluência verbal (categoria animais)	12.2 (± 4.2)	8.9 (± 2.4) *	4.3 (± 3.5) **, #	0.4 (± 1.0) **, ##
Desenho do relógio	6.4 (± 2.7)	5.3 (± 2.9)	2.0 (± 1.9) **, #	1 **, ## a
Memória imediata (TBCB) c	7.7 (± 1.0)	4.3 (± 1.3) **	2.5 (± 2.4) **, #	0 b
Memória tardia (TBCB)	8.3 (± 1.5)	2.2 (± 1.7) **	0.4 (± 1.1) **/#	0 b

Valores expressos em M (Média), ± DP (Desvio Padrão)

\* $p < 0.05$  vs Controle; \*\*  $p < 0.01$  vs Controle; #  $p < 0.05$  vs DA leve; ##  $p < 0.01$  vs DA leve.

MEEM: Mini-Exame do Estado Mental

TCTB: Teste da Bateria Cognitiva Breve

a não tentou ou não conseguiu; pontuação mínima 1.

b não tentou ou não conseguiu; pontuação mínima 0.

c média das três tentativas

Em relação aos testes neuropsicológicos aplicados nos pacientes, o escore do MEEM do grupo de pacientes com DA comparado aos controles foi significativamente baixo ( $11,4 \pm 8,7$  vs  $25,9 \pm 2,6$ ,  $p < 0.0001$ ), observando-se um desempenho progressivamente diminuído no MEEM conforme a gravidade da doença ( $p < 0.01$ ) para cada comparação entre os diferentes estágios da doença com o grupo controle.

Diferenças estatisticamente significativa foram observadas nos outros testes neuropsicológicos comparando com o grupo controle, excetuando-se o teste do desenho do relógio que no estágio leve da doença não mostrou diferenças significativas em relação com o grupo controle (tabela 3).

**Tabela 4. Correlação dos testes neuropsicológicos conforme o sexo dos pacientes com DA e grupo controle.**

Testes Neuropsicológicos	Sexo				p*
	Controles		DA		
	M <sup>(a)</sup>	F <sup>(b)</sup>	M <sup>(c)</sup>	F <sup>(d)</sup>	<0.05
<b>MEEM</b>	26.6 (± 3.3)	25.1 (± 2.4)	17.3 (± 4.4)	13.2 (± 13.3)	(a) vs (c); (a) vs (d)
<b>Fluência verbal</b>	11.2 (± 3)	12.1 (± 3.8)	6.5 (± 3)	7.1 (± 5.2)	(b) vs (d)
<b>Desenho do relógio</b>	6.4 (± 3)	6.8 (± 2.7)	4.2 (± 3)	3.5 (± 2.8)	(b) vs (d)
<b>Memória imediata (TBCB)</b>	8 (± 1.1)	7.6 (± 1)	3.7 (± 1.2)	3.8 (± 1.1)	(a) vs (c); (a) vs (d); (b) vs (c); (b) vs (d)
<b>Memória tardia (TBCB)</b>	8.6 (± 1.5)	8.2 (± 1.5)	0.8 (± 1.3)	1.5 (± 1.8)	(a) vs (c); (a) vs (d); (b) vs (c); (b) vs (d)

Valores expressos em M (Média), ± (Desvio Padrão)

MEEM: Mini-Exame do Estado Mental

TBCB: Teste da Bateria Cognitiva Breve

Correlação do Teste de Kruskal- Wallis

Quanto à influência do sexo no desempenho nos testes neuropsicológicos, um desempenho melhor do minimal no sexo masculino do grupo controle foi estatisticamente significativo quando foi feita a comparação com ambos os sexos dos pacientes com DA. No desenho do relógio e na fluência verbal foi observada diferença estatisticamente significativa somente entre o sexo feminino no grupo controle e DA. Já na avaliação da memória imediata e tardia observaram-se diferenças estatisticamente significativas quando foram realizadas comparações entre ambos os sexos dos dois grupos (tabela 4).

**Tabela 5. Correlação dos testes neuropsicológicos com a idade e escolaridade nos pacientes com DA e grupo controle.**

Testes Neuropsicológicos (p valor)	Idade		Escolaridade	
	Controle	DA	Controle	DA
<b>Escore MEEM</b>	0.7538	<b>0.0378</b>	<b>0.0258</b>	0.5903
<b>Fluência verbal</b>	0.8591	0.1162	<b>0.0045</b>	0.5238
<b>Desenho do relógio</b>	0.9197	0.2434	<b>0.0377</b>	0.4822
<b>Memória imediata (TBCB)</b>	0.8801	0.1395	0.2873	0.6954
<b>Memória tardia (TBCB)</b>	0.6254	<b>0.0189</b>	0.376	0.4091

MEEM: Mini-Exame do Estado Mental

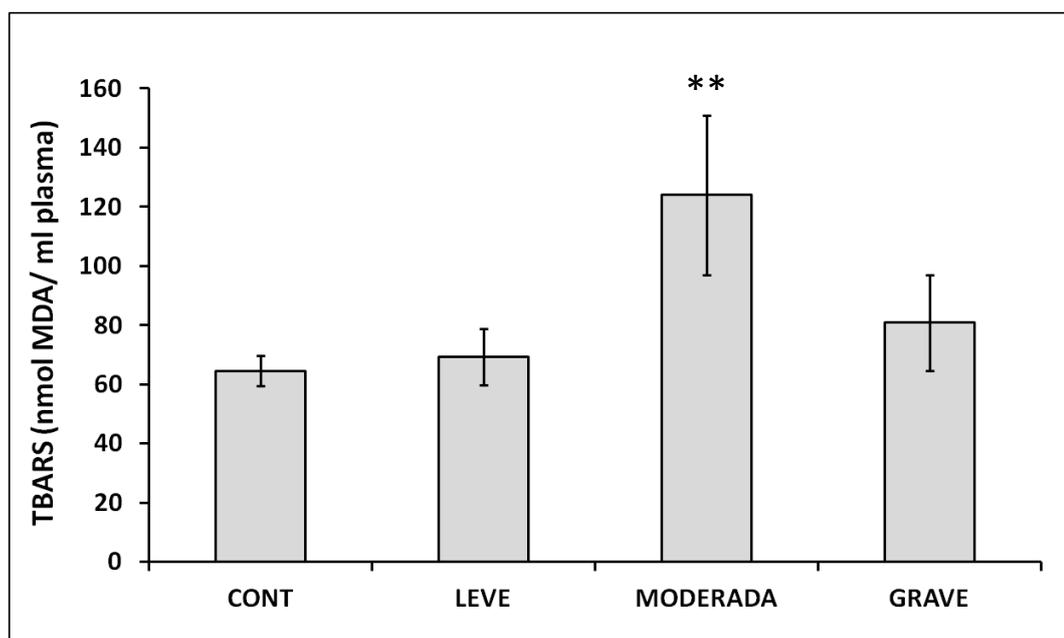
TBCB: Teste da Bateria Cognitiva Breve

Teste do coeficiente de correlação de Pearson

Na avaliação da correlação dos testes neuropsicológicos com a idade e escolaridade no grupo controle e nos pacientes com DA, foi observado a correlação da idade somente nos pacientes com DA no desempenho no teste do mini-mental ( $p=0.0378$ ) e no teste que avalia a memória tardia ( $p=0.0189$ ). Quanto à escolaridade houve diferenças estatisticamente significativas apenas no grupo controle no teste do mini-mental ( $p=0.0258$ ), teste da fluência verbal ( $p=0.0045$ ) e teste do desenho do relógio ( $p=0.0377$ ). Não foram observadas correlações da idade no grupo controle e da escolaridade nos pacientes com DA, no desempenho dos testes neuropsicológicos (tabela 5).

### 5.3 Avaliação da concentração das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS):

Ao se avaliar a concentração de TBARS houve diferença significativa apenas entre os pacientes no estágio moderado da DA e o grupo controle ( $p < 0.01$ ), com níveis de TBARS maior nos pacientes com DA. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes estágios da doença (Figura 11).



**Figura 11.** Níveis de TBARS em indivíduos controle e pacientes com doença de Alzheimer leve, moderada e grave. Os dados estão expressos como média  $\pm$  D.P.M (ANOVA-Tukey\*\*  $p < 0.01$  vs. controle).

Quanto à influência do sexo nos níveis de TBARS, não houve diferença estatisticamente significativa tanto no grupo controle ( $p = 0.312$ ) quanto nos pacientes com DA ( $p = 0.356$ ) no teste- $t$  de Student. A idade também foi outra variável demográfica que não mostrou diferenças estatisticamente significativas tanto no grupo controle ( $r = 0.0036$ ;  $p = 0.985$ ) quanto nos pacientes com DA ( $r = -0.051$ ;  $p = 0.78$ ) quando correlacionados com os níveis de TBARS.

A correlação dos níveis de TBARS com os testes neuropsicológicos no grupo controle e nos pacientes com DA não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (tabela 6).

Tabela 6. Correlação dos testes neuropsicológicos com os níveis de TBARS.

Testes Neuropsicológicos (p valor)	Níveis de TBARS (MDA)	
	Controle	DA
Escore MEEM	0.9626	0.7592
Fluência verbal	0.6874	0.1166
Desenho do relógio	0.5827	0.9016
Memória imediata (TBCB)	0.5491	0.8319
Memória tardia (TBCB)	0.9536	0.5953

MEEM: Mini-Exame do Estado Mental

TBCB: Teste da Bateria Cognitiva Breve

Teste do coeficiente de correlação de Pearson

O tempo de duração da doença também não apresentou resultados estatisticamente significativos quando foi realizada a sua correlação com os níveis de TBARS no plasma ( $r = -0.0058$ ;  $p=0.9755$ ; Figura 12).

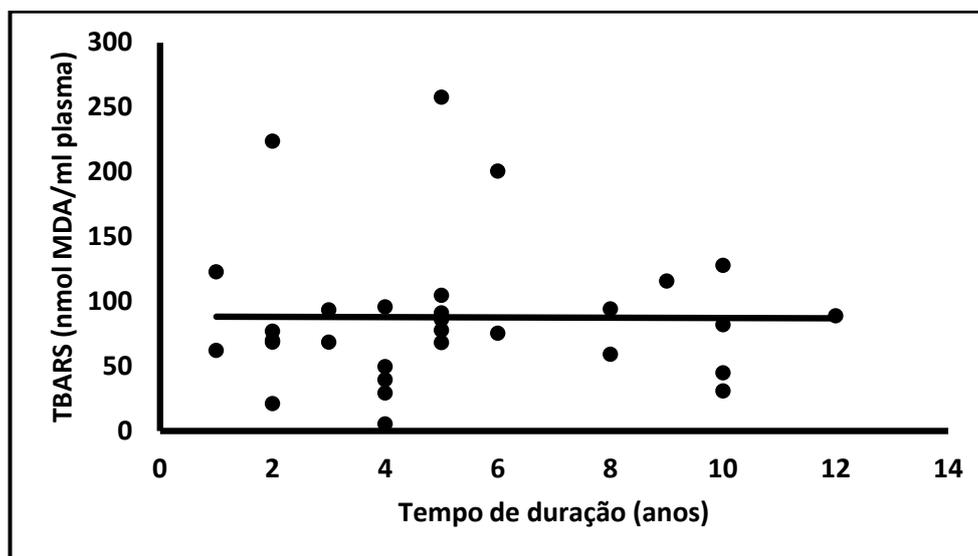
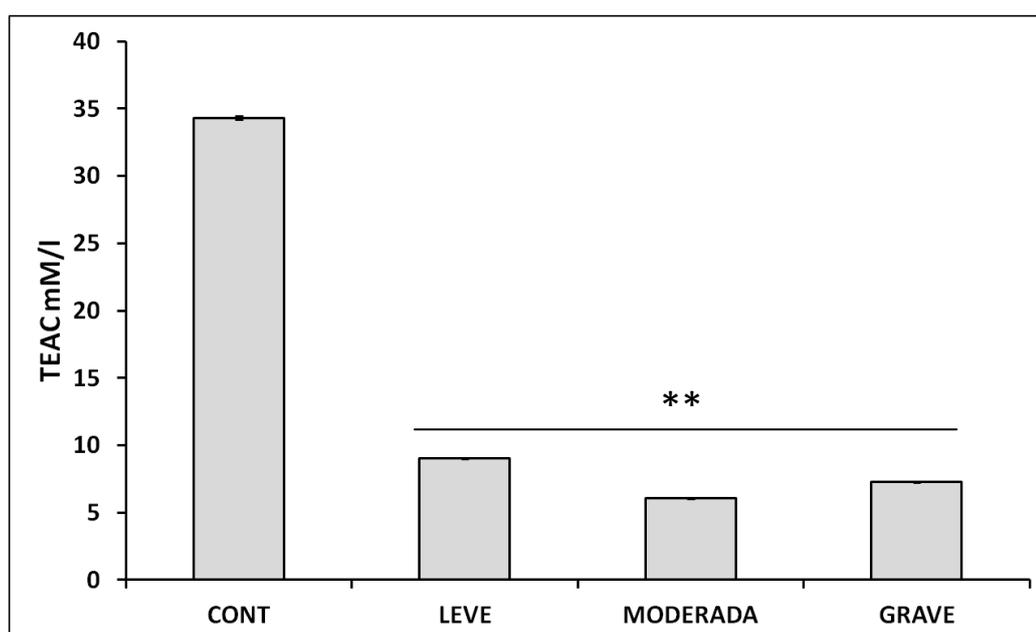


Figura 12. Correlação entre níveis de TBARS no plasma e o tempo de duração da doença (em anos), com  $p=0.9755$ . Teste do coeficiente de correlação de Pearson.

#### 5.4 Avaliação da capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC)

Na avaliação dos níveis da capacidade antioxidante total houve diferença significativa entre os pacientes com DA e grupo controle ( $p < 0.01$ ), com níveis da capacidade antioxidante total menor nos pacientes com DA. Porém, observou-se que não houve diferença entre os estágios da doença de acordo com a escala CDR (Figura 13).



**Figura 13.** Medida da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) em indivíduos controle e pacientes com doença de Alzheimer leve, moderada e grave. Os dados estão expressos como média  $\pm$  D.P.M. (ANOVA-Tukey\*\* $p < 0.01$  vs. controle).

Em relação à influência do sexo nos níveis de TEAC, não houve diferença estatisticamente significativa tanto no grupo controle ( $p = 0.11$ ) quanto nos pacientes com DA ( $p = 0.31$ ) no teste- $t$  de Student. Foi observado ainda que ao se realizar a correlação da idade com os níveis de TEAC não houve diferenças estatisticamente significativas tanto no grupo controle ( $r = -0.110$ ;  $p = 0.57$ ) quanto nos pacientes com DA ( $r = 0.0031$ ;  $p = 0.98$ ) no teste do coeficiente de correlação de Pearson.

Na avaliação da correlação dos testes neuropsicológicos com os níveis de TEAC no plasma não mostraram diferenças estatisticamente significativas nos pacientes com DA (tabela 7). No grupo controle, houve correlação significativa na

fluência verbal ( $r = -0.4131$ ;  $p=0.0182$ ) e no desenho do relógio ( $r = -0.1662$ ;  $p=0.0439$ ).

**Tabela 7. Correlação dos testes neuropsicológicos com os níveis de TEAC.**

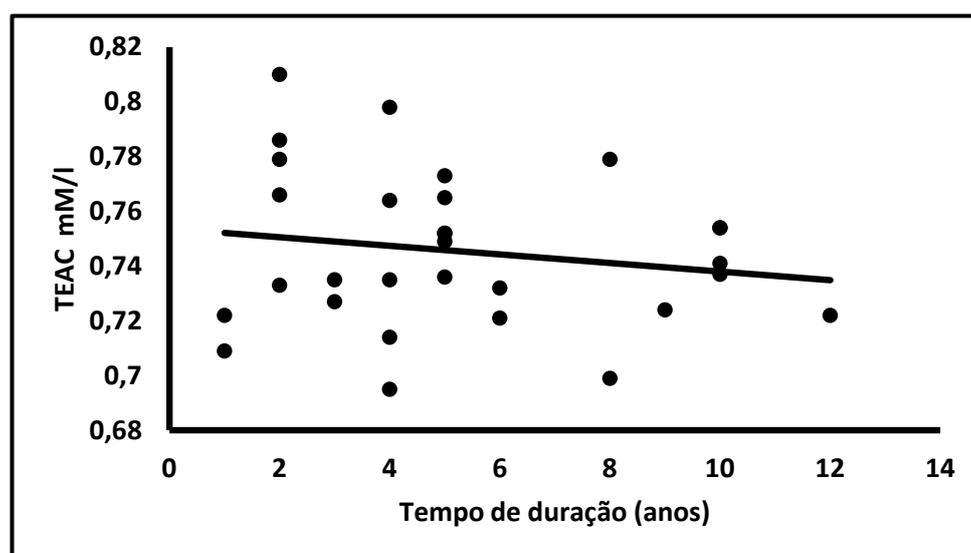
Testes Neuropsicológicos (p valor)	Níveis de TEAC	
	Controle	DA
Escore MEEM	0.4981	0.6307
Fluência verbal	<b>0.0182</b>	0.8919
Desenho do relógio	<b>0.0439</b>	0.5074
Memória imediata (TBCB)	0.9279	0.3516
Memória tardia (TBCB)	0.9514	0.0572

MEEM: Mini-Exame do Estado Mental

TBCB: Teste da Bateria Cognitiva Breve

Teste do coeficiente de correlação de Pearson

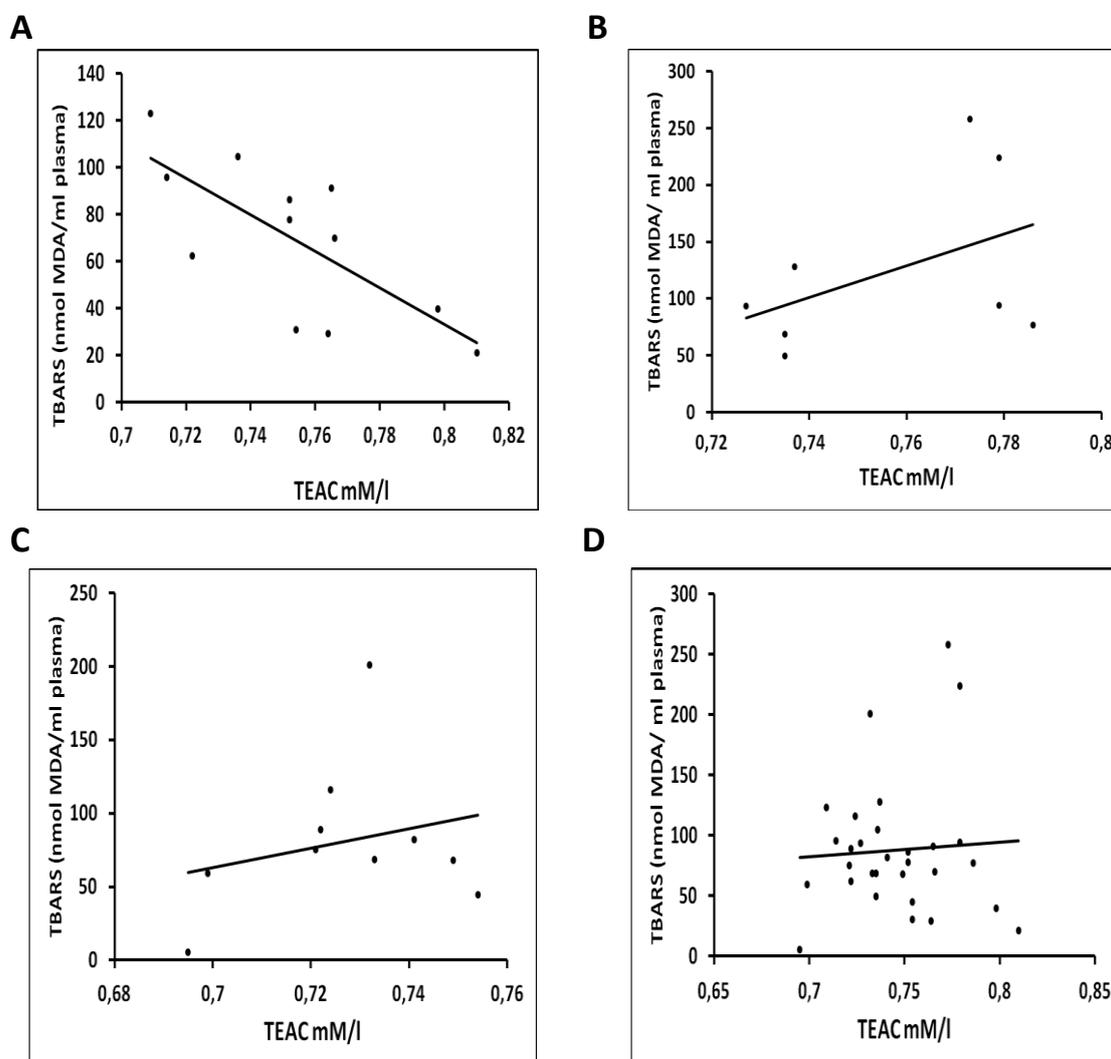
Em relação ao tempo de duração da doença, os resultados não foram estatisticamente significativos quando foi realizada a correlação do mesmo com os níveis de TEAC no plasma ( $r = -0.0436$ ;  $p=0.3706$ ; Figura 14).



**Figura 14.** Correlação entre níveis de TEAC no plasma e o tempo de duração da doença (em anos), com  $p=0.3706$ . Teste do coeficiente de correlação de Pearson.

### 5.5 Correlação entre a concentração das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC):

Ao se realizar a correlação entre a capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) e a concentração das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos diferentes estágios da DA, foi observado que apenas a fase leve da doença apresentou correlação significativa ( $p= 0.002$ ), não sendo observada correlação nas outras fases da doença analisadas isoladamente, como também, quando correlacionada com todas as fases da doença em conjunto (Figura 15).



**Figura 15.** Correlação entre níveis da capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) e TBARS no plasma em pacientes com doença de Alzheimer em estágio leve (A),  $p=0.002$ ; estágio moderado (B),  $p=0.87$ ; estágio grave (C),  $p=0.67$ ; todos os estágios (D)  $p=0.75$ . Teste do coeficiente de correlação de Pearson.

## 6. DISCUSSÃO

O estresse oxidativo tem sido envolvido em diversas doenças relacionadas ao envelhecimento e a desordens neurodegenerativas como a DA, DP, Esclerose Lateral Amiotrófica e Doença de Huntington. Na DA, particularmente, observam-se alterações oxidativas nos lipídios, carboidratos, proteínas e DNA. Alguns produtos de oxidação foram encontrados nos emaranhados neurofibrilares e nas placas senis que representam as principais alterações histopatológicas da DA (CEBALLOS-PICOT, 1997; MARKESBERY & CANEY, 1999). Várias evidências demonstram que o estresse oxidativo não está restrito ao SNC, por este motivo neste trabalho visou-se a investigação do metabolismo oxidativo em amostras de sangue periférico dos pacientes com DA, além de correlacioná-los com os diferentes estágios da doença e o quadro cognitivo dos pacientes.

A peroxidação lipídica é uma das características centrais do estresse oxidativo e pode ser avaliada por vários métodos incluindo a quantificação de produtos finais de peroxidação (CASADO et al., 2008). O MDA é um dos produtos finais de peroxidação e a mensuração do MDA através da técnica do TBARS é um dos mais utilizados. A quantificação de MDA nos sistemas biológicos é um parâmetro importante para avaliação do estresse oxidativo celular (SIM et al., 2003). Vários estudos anatomopatológicos em pacientes com DA têm demonstrado evidências de um aumento de TBARS em diferentes áreas do cérebro, especialmente nos lobos frontais e occipitais, como também no hipocampo e na região do córtex cerebral. Estes achados sugerem que a peroxidação lipídica pode ter um papel importante na neurodegeneração do tecido cerebral (KANSKI et al., 2002).

No presente estudo, os níveis de TBARS encontravam-se elevados na DA em comparação com o grupo controle, porém apenas a fase moderada da DA mostrou diferença estatisticamente significativa quando comparada com o grupo controle. A observação dos níveis elevados de peroxidação lipídica na fase moderada, em contradição do que se espera observar na fase mais avançada sugere que o estresse oxidativo provavelmente esteja relacionado ao mecanismo patogênico da DA, e a perda neuronal que ocorre na progressão da doença, talvez contribua para que não se observe níveis elevados de TBARS no estágio grave. Diversos autores também não observaram níveis elevados de TBARS no estágio grave da DA

(PALMER et al., 1994; LOVELL et al., 1995; LYRAS et al., 1997; GALBUSERA et al., 2004; SIMPSON et al., 2010). O estudo de Galbusera et al. (2004) além de não observar diferenças nos níveis de TBARS no estágio avançado da DA quando comparado com controles, encontrou uma significativa correlação inversa entre severidade da DA e a peroxidação lipídica. Em contrapartida, Zafrilla et al. (2006) observaram que a peroxidação lipídica encontrava-se elevada nas fases avançadas em comparação com grupo controle e não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes estágios da DA, este último resultado corrobora com o presente estudo, na qual também se observou que não houve diferenças significativas entre os diferentes estágios.

Uma importante descoberta foi observada no estudo de Praticó et al. (2000), que observaram um aumento na geração de isoprostano, um índice de peroxidação lipídica, na urina, sangue e líquido céfalo-raquidiano (LCR) de pacientes com DA. Este achado confirma que a peroxidação lipídica encontra-se elevada na DA. Além disso, Mcgrath et al. (2001) observaram elevação nos níveis de 4-hidroxinonal (4-HNE) nos pacientes com DA comparando com controles, porém não observou em relação ao MDA. O 4-hidroxinonal é um produto aldeído resultante da peroxidação lipídica, age como uma neurotoxina nas culturas de tecido e em estudos *in vivo*, e está elevado nos fluídos ventriculares na DA. A neurotoxicidade do 4-HNE sugere que a peroxidação lipídica pode ter um papel na morte neuronal na DA que é a base para o déficit cognitivo.

Na avaliação da correlação do sexo com os níveis de TBARS, não foram observadas neste estudo, diferenças significativas tanto no grupo controle, quanto nos pacientes com DA. Corroborando com os nossos resultados, Casado et al. (2008) e Schuessel et al. (2009) também não observaram correlação entre o sexo e os níveis de MDA. Schuessel et al. (2009) também avaliaram os níveis de 4-hidroxinonal e observaram que este apresentava níveis mais elevados no sexo feminino que nos pacientes do sexo masculino, sugerindo o elevado risco de DA no sexo feminino, e que a diferença nos parâmetros de estresse oxidativo observada nos diferentes sexos pode estar relacionada a elevada prevalência da DA no sexo feminino.

A idade também foi correlacionada com os níveis de TBARS e não foram observadas diferenças significativas tanto no grupo controle, quanto nos pacientes com DA. Corroborando com os nossos resultados, Serra et al. (2009) também não observaram correlação entre a idade e os níveis de TBARS. Já Polidori & Mecocci (2002), observaram que na DA com idade avançada apresentavam aumento na peroxidação lipídica quando comparado com o grupo controle. Casado et al. (2008) observaram que o MDA estava elevado com a idade não só na DA, como também na Demência Vasculiar (DV) e grupo controle.

Em relação aos testes cognitivos aplicados, não houve correlação significativa entre o resultado dos testes neuropsicológicos com os níveis de TBARS no presente estudo. Em contrapartida, Delibas et al. (2003) e Ansari & Scheff (2010), observaram que o MEEM e o nível de TBARS foram significativamente correlacionados, os indivíduos com escore baixo de MEEM apresentavam níveis elevados de TBARS. Delibas et al. (2003) sugerem com estes resultados que a peroxidação lipídica pode ser um dos fatores da deterioração cognitiva.

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre espécies reativas ao oxigênio (ERO) e o sistema de defesa antioxidante (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Um aumento na produção de ERO ou uma pobre defesa antioxidante pode levar a um dano progressivo na célula com declínio na sua função. Para proteger-se a célula possui um sistema de defesa que inclui antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Apesar da importância da avaliação dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos alguns autores defendem o estudo da capacidade antioxidante total, ao invés da análise isolada dos antioxidantes, principalmente devido à interação que existe entre eles no plasma ou soro. Na análise da capacidade antioxidante total, leva-se em conta a ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes; obtém-se um parâmetro integrado, capaz de revelar nuances acerca do delicado equilíbrio redox existente *in vivo*. A medida da capacidade antioxidante total auxilia na avaliação dos fatores nutricionais, fisiológicos e ambientais do balanço redox em seres humanos (GHISELLI et al., 2000; HALIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A capacidade antioxidante no plasma também é uma das principais formas de medida para avaliar o estado e o potencial do estresse oxidativo tanto no

envelhecimento como de outros eventos patológicos a ele relacionados. Uma vez que o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes gera a condição de estresse oxidativo, a estimativa da capacidade antioxidante no plasma é o primeiro passo para prever a presença do estresse oxidativo nestas situações (PANDEY & RIZVI, 2010).

No presente estudo foi observado que os pacientes com DA apresentavam a capacidade antioxidante total significativamente diminuída quando comparados com o grupo controle, porém não apresentavam diferenças significativas entre os diferentes estágios da doença, refletindo que o estágio da doença do paciente não interferiu significativamente nos valores da capacidade antioxidante.

Repetto et al. (1999) observaram uma diminuição significativa de 24% da capacidade antioxidante total nos pacientes com DA provável quando comparado com grupo controle saudáveis. Outros estudos também observaram uma diminuição na capacidade antioxidante total no plasma (GUIDI et al., 2006; BALDEIRAS et al., 2008; SERRA et al., 2009).

Já Foy et al. (1999) observaram significantes reduções nos antioxidantes (vitamina A, vitamina C, beta-caroteno) no grupo DA e Demência Vascular (DV) quando comparado aos controles, porém ao avaliar a capacidade antioxidante total não observaram diferenças significativas em nenhum grupo, sugerindo que as alterações nos antioxidantes individuais não eram refletidas na capacidade antioxidante total.

Em relação à correlação entre o estágio da doença e o nível da capacidade antioxidante total, no estudo de Zafrilla et al. (2006) os autores analisaram os biomarcadores de estresse oxidativo nos diferentes estágios da doença e observaram uma diminuição na capacidade antioxidante total dos pacientes da fase leve-moderada e grave comparando com o grupo controle, porém diferenças significativas foram observadas apenas quando se comparou o estágio grave da DA com o grupo controle. Em adição a estes resultados, alguns autores observaram correlação negativa entre níveis capacidade antioxidante total e o tempo de duração da doença (GUIDI et al., 2006; BALDEIRAS et al., 2008). No presente estudo, porém, o tempo de duração da DA não apresentou correlação estatisticamente significativa com os níveis da capacidade antioxidante total no plasma.

Na avaliação da correlação da idade e o sexo com os níveis da capacidade antioxidante total, não foram observadas neste estudo, diferenças significativas tanto no grupo controle, quanto nos pacientes com DA. Corroborando com os nossos resultados, Serra et al. (2009) também não observaram correlação entre a idade e os níveis da capacidade antioxidante total. No entanto, Polidori & Mecocci (2002), observaram que os pacientes com DA com idade mais avançada apresentaram diminuição no estado antioxidante no plasma.

Adicionalmente foi avaliada neste estudo, a correlação dos testes cognitivos com níveis da capacidade antioxidante total que não se mostrou significativa. Já os achados do trabalho de Sekler et al. (2008), mostraram uma correlação positiva entre os parâmetros de testes do MEEM e teste que avalia a praxia com a capacidade antioxidante total.

Ao se avaliar a correlação entre os níveis de TBARS e o TEAC foram observados resultados significativos apenas no estágio leve com correlação negativa, os indivíduos com níveis de TBARS baixo, apresentavam TEAC elevado. Nos outros estágios a correlação era positiva, porém não significativa. O estudo de Tayler et al. (2010), mostrou correlação positiva entre TEAC e níveis de TBARS, e observaram que a capacidade antioxidante estava fortemente relacionada com os níveis de  $\beta$ - amiloide insolúveis e que este aumentava com a progressão da doença.

A identificação de alterações no metabolismo oxidativo no sangue periférico de pacientes com DA poderia ser de utilidade para observação de alterações que possam estar ocorrendo ao nível do SNC, possibilitaria a introdução de estratégias terapêuticas ainda nas fases iniciais e/ou até mesmo em pacientes ainda em estágios pré-clínicos. Porém, a sua utilidade como biomarcador da DA necessitaria de mais estudos e padronizações. Da mesma forma, pesquisas são necessárias para o uso de antioxidantes com a finalidade de equilibrar o metabolismo oxidativo.

A longa duração da doença, o caráter progressivo, a resposta modesta a terapêutica, com estabilização por certo período, faz com que a DA componha um grupo de doenças que é, entre outras moléstias neurológicas dos idosos, o de maior impacto para os sistemas de saúde e previdência social justificando a busca incessante por métodos diagnósticos precoces e desenvolvimento de agentes terapêuticos eficazes.

## 7. CONCLUSÃO

Neste estudo, após avaliação dos resultados foram observados os seguintes achados nos pacientes do grupo com a doença de Alzheimer:

- Diminuição progressiva nas funções cognitivas com a evolução da doença;
- A correlação negativa entre os níveis de TBARS e a capacidade antioxidante total no estágio leve da DA, sugere o envolvimento do estresse oxidativo já nas fases iniciais da doença;
- A avaliação da peroxidação lipídica através dos níveis de TBARS possivelmente não é um biomarcador adequado para a doença de Alzheimer;
- Provável relação entre a diminuição da capacidade antioxidante total com a doença de Alzheimer;
- Não houve correlação entre o desempenho nos testes cognitivos com os níveis de concentração de TBARS e da capacidade antioxidante total.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGOSTINHO, P.; CUNHA, R.A.; OLIVEIRA, C. Neuroinflammation, oxidative stress and pathogenesis of Alzheimer's disease. **Curr Pharm Des**, 16 (25), 2766-2778, 2010.
2. ALIEV, G.; OBRENOVICH, M.E; REDDY, V.P; SHENK, J.C.; MOREIRA, P.I.; NUNOMURA, A.; ZHU, X.; SMITH, M.A.; PERRY, G. Antioxidant Therapy in Alzheimer's Disease: Theory and Practice. **Mini Rev Med Chem**, 8(13), 1395-1406, 2008.
3. AL-MEHDI, A.B.; DODIA, C.; JAIN, M.K.; FISHER, A.B. A phospholipase A2 inhibitor decreases generation of thiobarbituric acid reactive substance during lung ischemia-reperfusion. **Biochim Biophys Acta**, 17, 56-62, 1993.
4. ALEXOPOULOS, G.S.; ABRAMS, R.C.; YOUNG, R.C.; SHAMOIAN, C.A. Cornell Scale for depression in dementia. **Biol Psychiatry**, 23, 271-284, 1998.
5. ALMEIDA, M.H.M. Confiabilidade do instrumento para classificação de idosos quanto a capacidade para o autocuidado. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.42, n.2, abr. 2008.
6. AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**, (4<sup>th</sup> ed.), American Psychiatric Association, Washington, D.C., 1994.
7. ANSARI, M.A.; SCHEFF, S.W. Oxidative Stress in the Progression of Alzheimer Disease in the Frontal Cortex. **J Neuropathol Exp Neurol**, 69(2), 155-167, 2010.
8. AXELSEN, P.H.; KOMATSU, H.; MURRAY, I.V.J. Oxidative stress and cell membranes in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Physiology**, 26, 54-69, 2011.
9. BALDEIRAS, I.; SANTANA, I.; PROENÇA, M.T.; GARRUCHO, M.H.; PASCOAL, R.; RODRIGUES, A.; DURO, D.; OLIVEIRA C.R. Peripheral Oxidative Damage in Mild Cognitive Impairment and Mild Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, 15, 115-128, 2008.
10. BENSEÑOR, I.J.M. Comportamento da pressão arterial na cefaléia crônica diária. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1997.
11. BERTOLUCCI, P.H.F.; OKAMOTO, I.H. Doença de Alzheimer e outras demências. Manual de consulta. São Paulo: **Lemos Editorial**, 2003.
12. BONNES, T.; GUÉRIN, T. Is malonaldehyde a valuable of peroxidation? **Biochemical Pharmacology**, 44(5), 985-988, 1992.
13. BRUCKI, S.M.D.; NITRINI, R.; CARAMELLI, P.; BERTOLUCCI, P.H.F.; OKAMOTO, I.H. Sugestões para o uso do Mini-Exame do Estado Mental no Brasil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, 61 (3-B), 777-781, 2003.

14. BUTTERFIELD, D.A.; KANSKI, J.; AKSENOVA, M. The hydrophobic environment of Met35 of Alzheimer's A $\beta$ (1-42) is important for the neurotoxic and oxidative properties of the peptide. **Neurotoxicity Research**, 4(3), 219-223, 2002.
15. BUTTERFIELD, D.A.; REED, T.; NEWMAN, S.F.; SULTANA, R. Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Free Radical Biology and Medicine**, 43 (5), 658-677, 2007.
16. BUTTERFIELD, D.A.; SULTANA, R. Methionine-35 of A $\beta$ (1-42): Importance of oxidative stress Alzheimer disease. **Journal of Amino Acids**, 1-10, 2011.
17. CARAMELLI, P. Doença de Alzheimer. São Paulo: **Apsen Saúde Mental**, 2005.
18. CARAMELLI, P.; VIEL, A. H. 100 anos da Doença de Alzheimer. São Paulo: **Segmento Farma**, 2006.
19. CARAMELLI, P.; TEIXEIRA A.L.; BUCHPIGUEL, C.A.; LEE, H.W.; LIVRAMENTO, J.A.; FERNANDEZ, L.L.; ANGHINAH, R. Grupo para Recomendações em Doença de Alzheimer e Demência Vascular da Academia Brasileira de Neurologia. Diagnóstico de doença de Alzheimer no Brasil. Exames Complementares. **Dement Neuropsychol**, 5 (3), 11-19, 2011.
20. CASADO, A.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, M.A.; CASADO, M.C. AND LA TORRE, R. Lipid Peroxidation and Oxidant Enzyme Activities in Vascular and Alzheimer Dementias. **Neurochem Res**, 33: 450-458,2008.
21. CASTELLANI, R.J.; MOREIRA, P.I.; LIU G.; DOBSON, J.; PERRY, G.; SMITH, M.A.; ET AL. Iron: the redox-active center of oxidative stress in Alzheimer disease. **Neurochem Res**, 32, 1640-1645, 2007.
22. CEBALLOS-PICOT, I. Oxidative stress in Alzheimer's disease. In: CEBALLOS-PICOT I. ed. **The role of oxidative stress in Neuronal Death**. New York, NY: Springer Publishing Co Inc, 99-139, 1997.
23. CHAVES, M.L.F.; GODINHO, C.C.; PORTO, C.S.; MANSUR, L.; CARTHERY-GOULART, M.T.; YASSUDA, M.S.; BEATO, R. & GRUPO PARA RECOMENDAÇÕES EM DOENÇA DE ALZHEIMER E DEMÊNCIA VASCULAR DA ACADEMIA BRASILEIRA DE NEUROLOGIA. Doença de Alzheimer. Avaliação cognitiva, comportamental e funcional. **Dement Neuropsychol**, 5(3), 20-30, 2011.
24. CHEN, X.; STERN, D.; YAN, S.D. Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease. **Curr Alzheimer Res**, 3, 515-520, 2006.
25. CHINTA , S. J.; ANDERSEN, J. K. Redox imbalance in Parkinson's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1780, 1362-1367, 2008.
26. CLARK, T.A.; LEE, H.P.; ROLSTON,R.K.; ZHU, X.; MARLATT, M.W.; CASTELLANI, R.J.; NUNOMURA, A.; CASADESUS, G.; SMITH, M.A.; LEE, H.G.; PERRY, G. Oxidative Stress and its Implications for Future Treatments and Management of Alzheimer Disease. **Intern J Biom Sci**, 6 (3), 225-227, 2010.

27. COHEN, M.V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann Intern Med**, 111, 918-931, 1989.
28. COMPORTI, M. Glutathione depleting agents and lipid peroxidation. **Chem. Phys. Lipids**, 45, 143, 1987.
29. CONVIT A.; DE LEON M.J.; TARSHISH C.; ET AL. Specific hippocampal volume reductions in individuals at risk of Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, 18, 131-138, 1997.
30. DELIBAS, M.; OZCANKAYA, R.; ALTUNTAS, I. Clinical importance of erythrocyte malondialdehyde levels as a marker for cognitive deterioration in patients with dementia of Alzheimer type: a repeated study in 5-year interval. **Clin Biochem**, 32, 137-141, 2002.
31. DEL VALLE, L.G. Oxidative stress in aging: theoretical out-comes and clinical evidences in humans. **Biomedicine and Aging Pathology**, 1 (1), 1-7, 2011.
32. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4<sup>th</sup> ed. (DSM-IV) Washington DC: **American Psychiatric Association**, 1994.
33. DICKINSON, D.A.; FORMAN, H.J. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochem. Pharmacol**, 64 (5-6), 1019-1026, 2002.
34. DRAPER, H.H.; DHANAKOTI, S.N.; HADLEY, M. ET AL. Malondialdehyde in biological systems. In: Chow CK (ed) Cellular antioxidant defense mechanism. **CRC Press, Boca Raton**, 97-100, 1988.
35. DUBOIS, B.; FELDMAN, H.H.; JACOVA, C.; ET AL. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. **Lancet Neurol**, 6, 734-746, 2007.
36. DUMONT, M.; LIN, M.T.; BEAL, M.F. Mitochondria and antioxidant targeted therapeutic strategies for Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, 20, S633-643, 2010.
37. ECKERT, A.; KEIL, U.; MARQUES, C.A.; BONERT, A.; FREY, C.; SCHUSSEL, K.; MULLER, W.E. Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. **Biochem Pharmacol**, 66, 1627-1634, 2003.
38. FACHERIS, M.; BERETTA, S.; FERRARESE, C. Peripheral markers of oxidative stress and excitotoxicity in neurodegenerative disorders: Tools for diagnosis and therapy? **Journal of Alzheimer's Disease**, 6, 177-184, 2004.
39. FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesas e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, 43(1), 61-68, 1997.
40. FLOYD, R.A. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. **Proc Soc Exp Biol Med**, 222, 236-245, 1999.
41. FOLSTEIN, M.F.; FOLSTEIN, S.F.; MCHUGH, P.R. Mini Mental State: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. **J. Psychiatr Res**, 12, 189-198, 1975.

42. FOY, A.J.; PASSMORE, A.P.; VAHIDASSR, M.D.; YOUNG, I.S.; LAWSON, J.T. Plasma chain-breaking antioxidants in Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease. **Q J Med**, 92, 39-45,1999.
43. FROTA, N.A.F.; NITRINI, R.; DAMASCENO, B.P.; FORLENZA, O.V.; DIAS-TOSTA, E.; SILVA, A.B.; ET AL. Critérios para o diagnóstico da doença de Alzheimer. **Dementia Neuropsychologia**, 5(3), 6-10, 2011.
44. GALBUSERA, C.; FACHERIS, M.; MAGNI, F.; GALIMBERTI, G.; SALA, G.; TREMOLADA L.; ISELLA, V.; GUERINI, F.R.; APPOLLONIO, I.; GALLI-KIENLE, M.; FERRARESE, C. Increased susceptibility to plasma lipid peroxidation in Alzheimer's disease patients. **Curr Alzheimer Res**, 1(2), 103-109, 2004.
45. GELLA, A.; DURANY, N. Oxidative stress in Alzheimer disease. Special Focus: Molecular and Cellular Events Controlling Neuronal and Brain Function and Dysfunction. **Cell Adhesion & Migration**, 3(1), 88-93, 2009.
46. GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biol. Med.**, 29,1106-1114, 2000.
47. GREENBERG, D.A.; AMINOFF, M.J.; SIMON, R.P. Clinical Neurology. VII edn. **Lange Medical Books/ McGraw-Hill Companies Inc**, New York. 2009.
48. GUIDI, I.; GALIMBERTI, D.; LONATI, S.;NOVEMBRINO, C.; BAMONTI, F.; TIRITICCO, M., ET AL. Oxidative imbalance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, 27, 262-269, 2006.
49. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**,186, 1-85, 1990.
50. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine, **Oxford University Press: Oxford**; 4<sup>th</sup> ed., 2007.
51. HARMAN, D. Free radical theory of aging: Alzheimer's disease pathogenesis. **Age**, 18, 97-119, 1995.
52. HARMAN, D. Alzheimer's disease: role of aging in pathogenesis. **Ann N Y Acad Sci**, 959, 384-395, 2002.
53. HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J Agric Food Chem**, 53,1841-1856, 2005.
54. HUGHES, C.P.; BERG, L.; DANZIGER, W.L.; ET AL. A new clinical scale for the staging of dementia. **Br J Psychiatry**, 140, 566-572, 1982.
55. HUMPEL C., MARKSTEINER J. Peripheral biomarkers in Dementia and Alzheimer's disease. In: Ristner M.S. (Editor). The handbook of Neuropsychiatric Biomarkers, Endophenotypes and Genes. Volume III: **Metabolic and Peripheral Biomarkers**. Berlin: Springer, 2009.
56. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/indicadores\\_minimos/sinteseindicais/SIS\\_pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/indicadores_minimos/sinteseindicais/SIS_pdf)>2010.

57. ISAACS B.; KENNIE A.T. The set test as an aid to the detection of dementia in old people. **Brit J Psych**, 123, 467-470, 1973.
58. JACK JR., C.R.; ALBERT, M.S.; KNOPMAN, D.S.; MCKHANN, G.M.; SPERLING R.A.; CARRILLO, M.C.; THIES, B.; PHELPS, C.H. Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, 7, 257-262, 2011.
59. JIALAL, L.; GRUNDY, S.M. Effect of dietary supplementation with alpha-tocopherol on oxidative modification of low density lipoprotein. **J Lipid Res**, 33 (6), 899-906, 1992.
60. JOMOVA, K.; VONDRAKOVA, D.; LAWSON, M.; VALKO, M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Mol Cell Biochem**, 345 (1-2), 91-104, 2010.
61. KARALI, N.; GÜZEL, Ö.; ÖZSOY, N.; ÖSBEY, S.; SALMAN, A. Synthesis of new spiroindolinones incorporating a benzothiazole moiety as antioxidant agents. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, 5, 1068-1077, 2010.
62. KIM, H.C.; YAMADA, K.; NITTA, A.; OLARIU, A.; TRAN, M.H.; MIZUNO, M.; NAKAJIM,A.; NAGAI,T.; KAMEI, H.; JHOO, W.K.; IM, D.H.; SHIN, E.J.; ET AL. Immunocytochemical evidence that amyloid beta (1-42) impairs endogenous antioxidant systems *in vivo*. **Neurosci**, 119, 399-419, 2003.
63. KOHN, H.I.; LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **J Pharmacol Experimen Ther**, 82, 292- 300, 1944.
64. LA FERLA, F.M. & ODDO, S. Alzheimer's disease A $\beta$ , tau and synaptic dysfunction. **Trends in Molecular Medicine**, 11, 2005.
65. LI, R.; LINDHOLM, K.; YANG, L.B.; ET AL. Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. **Proc Natl Acad Sci**, 101, 3632-3637, 2004.
66. LLESUY, S.; MILEI, J.; GONZALEZ FLECHA, B.; BOVERIS A. Myocardial damage induced by doxorubicins: hydroperoxide- initiated chemiluminescence and morphology. **J Free Rad Biol Med**, 8, 259-264, 1990.
67. LOVELL, M.A.; EHMANN, W.D.; BUTLER, S.M., ET AL. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. **Neurology**, 45, 1594-1601, 1995.
68. LYRAS, L.; CAIRNS, N.J.; JENNER, A.; ET AL. An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. **J Neurochem**, 68, 2061-2069, 1997.
69. MANDAL, P.K.; TRIPATHI, M.; SUGUNAN, S. Brain oxidative stress: detection and mapping of anti-oxidant marker 'Glutathione' in different brain regions of healthy male/female, MCI and Alzheimer patients using non-invasive magnetic resonance spectroscopy. **Biochem Biophys Res Commun**, 417(1), 43-48, 2012.

70. MARCOURAKIS, T.; CAMARINI, R.; KAWAMOTO, E.M.; ET AL. Peripheral biomarkers of oxidative stress in aging and Alzheimer's disease. **Dementia & Neuropsychologia**, 2(1), 2-8, 2008.
71. MARKESBERY, W.R. The role of oxidative stress in Alzheimer disease. **Arch Neurol**, 56, 1449-1452, 1999.
72. MARKESBERY, W.R.; CARNEY, J.M. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. **Brain Pathol**, 9, 133-146, 1999.
73. MARKESBERY, W.R.; LOVELL, M.A. DNA oxidation in Alzheimer's disease. **Antioxid Redox Signal**, 8, 2039-2045, 2006.
74. MASTERS, C.L.; SELKOE, D.J. Biochemistry of amyloid b-protein and amyloid deposits in Alzheimer disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 2(6), 1-24, 2012.
75. MCDONALD C.R., MCEVOY L.K., GHARAPETIAN L., ET AL. Regional rates of neocortical atrophy from normal aging to early Alzheimer disease. **Neurology**, 73, 457-465, 2009.
76. MCGRATH, L.T.; MCGLEENON, B. M.; BRENNAN, S.; MCCOLL, D.; MCILROY, S.; PASSMORE, A.P. Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde. **Q J Med**, 94, 485-490, 2001.
77. MCKHANN, G.; DRACHMAN, D.; FOLSTEIN, M.; KATZMAN, R.; PRICE, D.; STANDLAN, E.M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task force on Alzheimer's disease. **Neurology**, 34, 939-944, 1984.
78. MCKHANN, G.M.; KNOPMAN, D.S.; CHERTKOW, H.; BRADLEY, T.H.; JACK JR, C.R.; KAWAS, C.H.; ET AL. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, 7, 263-269, 2011.
79. MECOCCHI, P. Oxidative stress in mild cognitive impairment and Alzheimer disease: A continuum. **Journal of Alzheimer's Disease**, 6, 159-163, 2004.
80. MEINSTER, A. New aspects of glutathione biochemistry and transport: Selective alteration of glutathione metabolism. **Fed. Proc**, 43, 3031-3042, 1984.
81. MIGLIORE, L.; COPPEDÈ. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. **Mutation Research**, 674 (1-2), 73-84, 2009.
82. MILLER, N.; RICE-EVANS, C. Spectrophotometric determination of antioxidant activity. **Redox Rpt**, 2, 161-171, 1996.
83. MILLER, N.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clin Sci**, 84, 407-412, 1993.

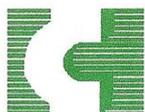
84. MIMIC-OKA, J.; DJUKANOVIC, L.; MARKOVIC, B. Erythrocyte and plasma glutathione levels in patients with chronic renal insufficiency **Biochem. Med. Met. Biol**, 39, 48-54, 1988.
85. MORRIS, J.C. Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. **Neurology**, 43, 2412-2414, 1993a.
86. NITRINI, R.; LEFÈVRE, B.H.; MATHIAS, S.C.; CARAMELLI, P.; CARRILHO, P.E.M.; SAUAIA, N.; MASSAD, E.; TAKIGUTI, C.; DA SILVA, A.I.O.; PORTO, C.S.; MAGILA, M.C.; SCAFF, M. Testes neuropsicológicos de aplicação simples para o diagnóstico de demência. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, 52, 457-465, 1994.
87. NITRINI, R.; CARAMELLI, P.; BOTTINO, C.M.C; DAMASCENO, B.P.; BRUCKI, S.M.D.; ANGHINAH, R. Diagnóstico de Doença de Alzheimer no Brasil. Avaliação Cognitiva e Funcional. Recomendações do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, 63 (3-A), 720-727, 2005.
88. NUNOMURA, A.; PERRY, G.; ALIEV, G.; HIRAI, K., TAKEDA, A., BALRAJ, E.K.; ET AL. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, 60, 759-767, 2001.
89. NUNOMURA, A.; MOREIRA, P.I.; LEE, H.G.; ET AL. Neuronal death and survival under oxidative stress in Alzheimer and Parkinson's diseases. **CNS & Neurological Disorders- Drug Targets**, 6 (6), 411-423, 2007.
90. PACKER, L. Oxidative stress, antioxidants, aging and disease. In: Cuthler, R.G., Packer, L. and Mori, L., eds, **Oxidative Stress and Aging**. (Birkhauser Verlag Basel, Switzerland). 1995:1-14.
91. PALMER, A.M., BURNS M.A. Selective increase in lipid peroxidation in the inferior temporal cortex in Alzheimer's disease. **Brain Res**, 645, 338-342, 1994.
92. PANDEY, K.B.; RIZVI, S.I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 3(1), 2-12; 2010.
93. PERCÁRIO, S. Dosagem das LDLs modificadas através da peroxidação lipídica: correlação com o risco aterogênico. **AMHFFCMSCSP**, 13(49-52), 07-09, 1993.
94. PERCÁRIO, S.; ET AL. Dosagem do dialdeído malônico. **NewsLab**, 6, 46-50, 2004.
95. PETERSEN, R.C.; COREY-BLOOM, J. Differential diagnosis of dementia: Improvements in detection techniques. **Report of the quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology**. 2003.
96. POLIDORI, M.C.; MECOCCHI, P. Plasma susceptibility to free radical-induced antioxidant consumption and lipid peroxidation is increased in very old subjects with Alzheimer disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, 4 (6), 517-522, 2002.
97. POON, H.; CALABRESE, G.; SCAPAGNINI, G.; BUTTERFIELD, D. Free radicals and brain aging. **Clinics in Geriatric Medicine**, 20 (2), 329-359, 2004.

98. PRATICÒ, D.; DELANTY, N. Oxidative injury in diseases of central nervous system: focus on Alzheimer's disease. **Am J Med**, 109: 577-585, 2000.
99. PRATICÒ, D.; URYU K.; LEIGHT, S.; TROJANOSWKI, J.Q.; LEE, V.M. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. **J Neurosci**, 21, 4183-4187, 2001.
100. PRATICÒ, D.; SUNG S. Lipid Peroxidation and oxidative imbalance: Early functional events in Alzheimers disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, 6, 171-175, 2004.
101. PRATICÒ, D. Peripheral biomarkers of oxidative damage in Alzheimer's disease: the road ahead. **Neurobiol Aging**, 26, 581- 583, 2005.
102. PRATICÒ, D. Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows. **Ann N Y Acad Sci**, 1147-1170, 70- 78, 2008.
103. RE, R.; PELLEGRINI R.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad Biol Med**, 26, 1231-1237, 1999.
104. REDDY P. H.; BEAL M. F. Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? **Brain Res. Rev.**, 49, 618-632, 2005.
105. REDDY, P. H. Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage: Implications for the development and progression of Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, 96, 1-13, 2006.
106. REDDY, P. H. Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease. **Brain Res**, 1415, 136-148, 2011.
107. REITZ, C.; BRAYNE, C.; MAYEUX, R. Epidemiology of Alzheimer disease. **Nat Rev Neurol**, 7(3), 137-152, 2011.
108. REPETTO, M.G.; REIDES, C.G.; EVELSON, P.; KOHAN, S.; DE LUSTIG, E.S.; LLESUY, S.F. Peripheral markers of oxidative stress in probable Alzheimer patients. **European Journal of Clinical Investigation**, 29, 643-649, 1999.
109. ROSEN, W. Verbal fluency in aging and dementia. **J Clin Neuropsychol**, 2, 135-146, 1980.
110. SCHOTT, K.; CHARÃO, M.F.; VALENTIN, J.; ET AL. Influência de desproteinizantes ácidos na quantificação da glutatona reduzida eritrocitária por CLAE-UV. **Quim. Nova**, 30 (3), 592-596, 2007.
111. SCHUESSEL K.; LEUTHER S.; CAIMS N.J.; MÜLLER W.E.; ECKERT A. Impact of gender on upregulation of antioxidants defence mechanisms in Alzheimer's disease brain. **J Neural Transm**, 111(9), 1167-1182, 2004.
112. SEKLER, A.; JIMÉNEZ, J.M.; ROJO, L.; PASTENE, E.; FUENTES, P.; SLACHEVSKY, A.; MACCIONI, A.B. Cognitive impairment and Alzheimer's disease: Links with oxidative stress and cholesterol metabolism **Neuropsychiatr Dis Treat**, 4(4), 715–722, 2008.

113. SELKOE, D.J. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. **Nature**, 399, A23-A31, 1999.
114. SELKOE, D.J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiol Rev**, 81, 741-766, 2001.
115. SELKOE, D.J. Alzheimer's disease is a synaptic failure. **Science**, 298, 789-791, 2002.
116. SERRA, J.A.; MARSCHOFF, E.R.; DOMÍNGUEZ, R.O.; ET AL. Oxidative stress in Alzheimer's and vascular dementias: masking of the antioxidant profiles by a concomitant type II diabetes mellitus condition. **J Neurol Sci**, 218, 17-24, 2004.
117. SERRA, J.A.; DOMÍNGUEZ, R.O.; MARSCHOFF, E.R.; GUARESCHI, E.M.; FAMULARI, A.L.; BOVERIS, A. Systemic oxidative stress associated with the neurological diseases of aging. **Neurochem Res**, 34, 2122-2132, 2009.
118. SIM, A.S.; SALONIKAS, C.; NAIDOO, D.; WILCKEN, D.E.L. Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard. **J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.**, 785, 337-344, 2003.
119. SIMPSON, J.E.; INCE, P.G.; HAYNES, L.J.; THEAKER, R.; GELSTHORPE, C.; et al. MRC Cognitive Function and Ageing Neuropathology Study Group. Population variation in oxidative stress and astrocyte DNA damage in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. **Neuropathol Appl Neurobiol**, 36(1); 25-40; 2010.
120. SLATER, T.F. Overview of the methods used for detecting lipid peroxidation. In: Packer L (ed) *Methods in enzymology, oxygen radicals in biological systems*. **London Academic Press**, 105, 283-293, 1984.
121. SOLFTRIZZI, A.; D'INTRONO, A.M.; COLACICCO, C.; CAPURSO, O.; TODARELLO, V.; PELLICANI, S.A.; ET AL. Circulating biomarkers of cognitive decline and dementia. **Clin Chem Acta**, 364, 91-112, 2006.
122. SQUITTI, R. Metals in Alzheimer's disease: a systemic perspective. **Front Biosci**, 17, 451-472, 2012.
123. SU, B.; WANG, X.; NUNOMURA, A.; MOREIRA, P.I.; LEE, H-G.; GEORGE, P.; SMITH, M.A.; ZHU, X. Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. **Curr Alzheimer Res**, 5(6), 525-532, 2008.
124. SUBBARAO, K.V.; RICHARDSON, J.S.; ANG, L.C. Autopsy samples of alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. **J Neurochem**, 55, 342-345, 1990.
125. SUNDERLAND, T.; HILL, J.L.; MELOW, A.M.; ET AL. Clock drawing in Alzheimer's disease: a novel measure of dementia severity. **J Am Geriatr Soc**, 37, 725-729, 1989.
126. TANZI, R.E.; GUSELLA, J.F.; WATKINS, P.C.; BRUNS, G.A.; ET AL. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. **Science**, 235, 880-884, 1987.

127. TAYLER, H.; FRASER, T.; MINERS, J.S.; KEHOE, P.G.; LOVE, S. Oxidative balance in Alzheimer's disease: relationship to APOE, Braak tangle stage, and the concentrations of soluble and insoluble amyloid- $\beta$ . **J Alzheimers Dis**, 22(4),1363-73, 2010.
128. TOMLINSON, B.E., BLESSED, G.; ROTH, M. Observations on the brains of demented old people. **Journal of Neurological Sciences**, 7, 331-356, 1968.
129. VALKO, M.,MORRIS, H.; CRONIN, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. **Curr. Med. Chem.**, 12, 1161–1208, 2005.
130. VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 39, 44-84, 2007.
131. VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, 30 (5), 1323-1338, 2007.
132. VASSAR R.; CITRON, M. A $\beta$ -generating enzymes: recent advances in  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase research. **Neuron**, 27, 419-422, 2000.
133. WAYNER, D.D.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U.; BARCLAY, L.R.; LOCKE, S.J. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. **Biochim Biophys Acta**, 924, 408-419, 1987.
134. YESAVAGE, J.A.; BRINK, T.L.; ROSE, T.L.; ET AL. Development and validation of a geriatric depression screening scale: A preliminary report. **Journal of Psychiatric Research**, 17, 37-49, 1983.
135. ZAFRILLA, P.; MULERO, J.; XANDRI, J.M.; SANTO, E.; CARAVACA, G.; MORILLAS, J.M. Oxidative Stress in Alzheimer Patients in Different Stages of the Disease. **Current Medicinal Chemistry**, 13, 1075-1083, 2006.
136. ZHU, X.; LEE H. G.; CASADESUS, G.; AVILA J.; DREW, K.; PERRY, G. AND SMITH, M. A. Oxidative imbalance in Alzheimer's disease. **Mol. Neurobiol**, 31, 205–217, 2005.

**APÊNDICE A- PARECER APROVADO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS DO HOSPITAL DE CLÍNICAS GASPAR VIANNA.**



**FUNDAÇÃO PÚBLICA ESTADUAL  
HOSPITAL DE CLÍNICAS GASPAR VIANNA  
GERÊNCIA DE ENSINO E PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**



Belém, 26 de março de 2009.

**PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**

1. Protocolo: Nº 018/2009 - CEP/FHCGV
2. Projeto de Pesquisa: "CORRELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS CLÍNICOS, FUNCIONAIS E OXIDATIVOS EM PACIENTES IDOSOS PORTADORES DE DOENÇA DE ALZHEIMER E DOENÇAS DE PARKINSON ATENDIDOS NO CENTRO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DO ESTADO"
3. Pesquisador Responsável: Jofre Jacob da Silva Freitas
4. Instituição/Unidade: UEAFTO – Universidade do Estado do Pará -
5. Data de Entrada: 03/03/2009
6. Data do Parecer: 26/03/2009

**PARECER:** O Comitê de Ética em Pesquisa da FHCGV analisou o Projeto supra-citado e, conforme Parecer datado de 26/03/2009 emitido por este CEP, verificou que foram atendidas todas as adequações recomendadas de acordo com as normas da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto manifesta-se pela sua aprovação.

**Parecer: APROVADO**

**Helder José Lima Reis**  
Coordenador em exercício do CEP/FHCGV

**GEP/FHCGV**

Tv. Alferes Costas s/n – Pedreira – Belém (PA) – CEP: 66087-660  
Fone/Fax: (091)3276-1770  
E-mail: gepfhcgv@yahoo.com.br

## **APÊNDICE B- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.**

**PROJETO: Correlação entre Parâmetros Clínicos, Funcionais e Oxidativos em Pacientes Idosos Portadores de Doença de Alzheimer e Doença de Parkinson Atendidos no Centro de Geriatria e Gerontologia da Universidade do Estado do Pará.**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O projeto de pesquisa consiste em correlacionar dados epidemiológicos, clínicos e funcionais, com análises laboratoriais de metabolismo oxidativo em pacientes idosos, portadores das doenças de Alzheimer (DA) e Parkinson (DP), atendidos no Centro de Geriatria e Gerontologia da Universidade do Estado do Pará. Farão parte do estudo 30 idosos previamente diagnosticados como portadores da DA, 30 idosos com DP e 30 idosos sem doença neurológica. Os pacientes realizarão avaliações neurológicas, cognitivas, funcionais e laboratoriais com profissionais de saúde qualificados. A avaliação neurológica será realizada pela anamnese do paciente e complementada por exames laboratoriais, como os exames de proteína-C-reativa, VDRL, exames de função hepática, renal e tireoidiana, a fim de investigar causas sistêmicas de demência. Em situações em que seja necessário exame de neuroimagem, os pesquisadores encaminharão os participantes da pesquisa para realizarem no respectivo lugar a ser informado. Além disso, serão avaliados os aspectos emocionais através da Escala de Depressão GDS e a Escala Analógica de Felicidade. A avaliação cognitiva dos pacientes será realizada através de testes validados no Brasil, como o Mini-exame do estado mental, fluência verbal, teste do relógio, desenhos do CERAD, recordação tardia do CERAD ou de objetos apresentados como figuras. Na avaliação da capacidade funcional dos idosos acometidos pela doença de Alzheimer e Parkinson, serão utilizados testes de Atividades da Vida Diária (AVD) pela Escala de Katz, Atividades Instrumentais da Vida Diária (AIVD) de Lawton e Escala de Avaliação da Marcha e Equilíbrio de Tinetti. Em qualquer momento do estudo, os idosos e seus cuidadores terão acesso aos pesquisadores, para esclarecimento de dúvidas e fornecimento de resultados parciais. Os riscos para os sujeitos são a revelação de sua identidade, porém os pesquisadores se comprometem a preservar o sigilo da identidade dos mesmos durante toda a realização da pesquisa e na apresentação dos dados coletados e alguma alteração do quadro clínico, entretanto, caso isto ocorra, o idoso será encaminhado aos profissionais de saúde do Centro de Geriatria e Gerontologia da Universidade do Estado do Pará para tratamento. Os pesquisadores estarão atentos a qualquer manifestação de fadiga física, interrompendo a atividade se necessário, além de se comprometerem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa e para divulgação científica, sendo eliminados ou incinerados, no máximo, após 5 anos de utilização. Os benefícios aos sujeitos da pesquisa são a melhoria da capacidade funcional, cognitiva e clínica, ou seja, da qualidade de vida no acompanhamento das patologias. É garantida aos idosos a liberdade de deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo ao seu atendimento no Centro de Geriatria e Gerontologia da UEPA. Não serão divulgadas quaisquer informações que possam levar à identificação de quaisquer pesquisados. Em caso de dano pessoal, diretamente provocado pelos procedimentos propostos na pesquisa, os participantes terão direito (por parte dos principais investigadores) a indenizações legalmente estabelecidas. Não há despesas pessoais aos participantes em qualquer fase do estudo e não haverá nenhum pagamento pela participação. Este estudo será realizado com recursos financeiros da SECTAM, através do Programa Pesquisa para o SUS.

\_\_\_\_\_

Assinatura do Coordenador

Jofre Jacob da Silva Freitas

End. Tv. Dom Romualdo de Seixas, 1630

Telefone: 81287858

\_\_\_\_\_

Assinatura dos Pesquisadores

### **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa, cooperando com a coleta de material para exame.

Belém, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

Assinatura do participante e/ou responsável da pesquisa

## APÊNDICE C- PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DOS PACIENTES COM A DOENÇA DE ALZHEIMER.

Universidade do Estado do Pará  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Unidade de Ensino e Assistência de Fisioterapia e Terapia Ocupacional – UEAFTO

PESQUISA: Correlação entre Parâmetros Clínicos, Funcionais e Oxidativos em Pacientes Idosos Portadores de Doença de Alzheimer e Doença de Parkinson Atendidos no Centro de Geriatria e Gerontologia da Universidade do Estado do Pará.

### PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO – DOENÇA DE ALZHEIMER

Protocolo de atendimento: Nº \_\_\_\_\_

Data avaliação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### Identificação:

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_ Estado civil: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) M ( ) F Idade: \_\_\_\_\_ Data nascimento: \_\_\_\_\_

Escolaridade: \_\_\_\_\_ Local estudo (rural ) ou (cidade):

Sabe ler ( ) Sabe escrever ( ) Só assina nome ( )

Razão do abandono escolar: ( ) não havia escola

( ) não conseguia acompanhar

( ) precisou trabalhar

Tipo (s) de profissão (ões) / atividades na maior parte da vida:

\_\_\_\_\_

Exposição metais pesados : ( ) sim ( ) não Qual? \_\_\_\_\_

Exposição agrotóxicos : ( ) sim ( ) não Qual? \_\_\_\_\_

Local de nascimento: rural ou cidade

Passou a infância : rural ou cidade

Passou a vida adulta (18 a 64 anos):

**História:**

Tempo do início dos sintomas: \_\_\_\_\_

Presença de:

Alucinações: ( ) sim ( ) não \_\_\_\_\_

Delírios: ( ) sim ( ) não \_\_\_\_\_

Depressão: ( ) sim ( ) não \_\_\_\_\_

Apatia: ( ) sim ( ) não \_\_\_\_\_

Distúrbios do sono: ( ) sim ( ) não \_\_\_\_\_

Agressividade: ( ) sim ( ) não \_\_\_\_\_

Deambulação compulsiva: ( ) sim ( ) não \_\_\_\_\_

Alteração esfinteriana: ( ) sim ( ) não \_\_\_\_\_

Outros: \_\_\_\_\_

AMP: HAS ( ) DM ( ) DLP ( ) Cardiopatia ( ) Insuf. Renal ( )

Insuf. Hepática ( ) Outros \_\_\_\_\_

Tabagismo ( ) Etilismo ( )

Medicações em uso : \_\_\_\_\_

AMF: Dça cérebro-vascular ( ) Insuf. Coronariana ( ) Demência ( )

Desordens psiquiátricas ( )

**Ex. físico geral:**

PA: \_\_\_\_\_

Aparelho cárdio-vascular: ( ) NL ( ) alterado \_\_\_\_\_

Aparelho respiratório: ( ) NL ( ) alterado \_\_\_\_\_

Aparelho digestivo: ( ) NL ( ) alterado \_\_\_\_\_

Extremidades: ( ) NL ( ) alterado \_\_\_\_\_

**Ex. neurológico:**

Sinais localizatórios: ( ) sim ( ) não \_\_\_\_\_

Axiais da face:

Orbicular das pálpebras ( ) sim ( ) não

Oro-orbicular ( ) sim ( ) não

Mandibular ( ) sim ( ) não

Sinais Parkinsonianos:

Tremor ( ) sim ( ) não

Rigidez ( ) sim ( ) não

Bradicinesia ( ) sim ( ) não

Marcha: NL ( ) alterado ( ) \_\_\_\_\_

Outros: \_\_\_\_\_

**Escala de Depressão GDS:** \_\_\_\_\_

**“Escala analógica de felicidade”:** \_\_\_\_\_ figura

**Escore total no Mini-Exame do Estado Mental :** \_\_\_\_\_

Orientação temporal:

Orientação espacial

Memória imediata:

Cálculo:

Memória de evocação:

Nomeação:

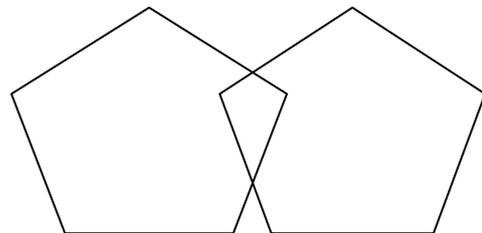
Repetição:

Comando:

Leitura:

Frase:

Desenho:



**Fluência verbal:**

**0-15:** \_\_\_\_\_

**15-30:** \_\_\_\_\_

**30-45:** \_\_\_\_\_

**45-60:** \_\_\_\_\_

**Escore:** \_\_\_\_\_

**Desenho do relógio:**

**Escore:** \_\_\_\_\_

**Estadiamento CDR**

0= sem demência

1= demência leve

2= demência moderada

3= demência severa

**Resultado de exames:**

Hemograma: NL ( ) alterado ( )

Hb: \_\_\_\_\_ Htc: \_\_\_\_\_ leuc: \_\_\_\_\_ plaq: \_\_\_\_\_

Desvio a E: ( ) sim ( ) não

Na+: \_\_\_\_\_ K+: \_\_\_\_\_ C: \_\_\_\_\_ U: \_\_\_\_\_ Ca: \_\_\_\_\_

Glic: \_\_\_\_\_ AST: \_\_\_\_\_ ALT: \_\_\_\_\_ GGT: \_\_\_\_\_ Vit B12: \_\_\_\_\_ VDRL:

\_\_\_\_\_ TSH: \_\_\_\_\_ T4L: \_\_\_\_\_

LCR: NL ( ) alterado ( ) \_\_\_\_\_

Outros: \_\_\_\_\_

**Exames de imagem:**

TC de crânio: (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)

---

---

RNM de crânio: (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)

---

---

Uso de medicação inibidor da acetilcolinesterase? ( ) sim ( ) não

Medicação prescrita:

( ) Rivastigmina Tempo uso: \_\_\_\_\_ (dias, sem, meses, anos) dose: \_\_\_\_\_

( ) Galantamina Tempo uso: \_\_\_\_\_ (dias,sem, meses, anos) dose: \_\_\_\_\_

( ) Donepezil Tempo uso: \_\_\_\_\_ (dias, sem, meses, anos) dose: \_\_\_\_\_

( ) Memantina Tempo uso: \_\_\_\_\_ (dias, sem, meses, anos) dose: \_\_\_\_\_

Local de origem: \_\_\_\_\_

Prescrição: ( ) neurologista ( ) psiquiatra ( ) geriatra ( ) clínico geral

Data início medicação: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

## ANEXO A- TESTE DO MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL (MEEM).

### ORIENTAÇÃO:

- Dia da semana (1 ponto)..... ( )
- Dia do mês (1 ponto).....( )
- Mês (1 ponto).....( )
- Ano (1 ponto).....( )
- Hora aproximada (1 ponto).....( )
- Local específico (apartamento ou setor) (1 ponto).....( )
- Instituição (residência, hospital, clínica) (1 ponto).....( )
- Bairro ou rua próxima (1 ponto).....( )
- Cidade (1 ponto).....( )
- Estado (1 ponto).....( )

### MEMÓRIA IMEDIATA

- Fale 3 palavras não relacionadas. Posteriormente pergunte ao paciente pelas 3 palavras. Dê 1 ponto para cada resposta correta.....( )  
Depois repita as palavras e certifique-se de que o paciente as aprendeu, pois mais adiante você irá perguntá-las novamente

### ATENÇÃO E CÁLCULO

- (100-7) sucessivos, 5 vezes sucessivamente.  
Dê 1 ponto para cada cálculo correto.....( )  
(alternativamente soletrar MUNDO de trás para frente)

### EVOCAÇÃO

- Pergunte pelas 3 palavras ditas anteriormente (1 ponto por palavra)...( )

### LINGUAGEM

- Nomear um relógio e uma caneta (2 pontos).....( )
- Repetir “Nem aqui, nem ali, nem lá” (1 ponto).....( )

- Comando (“Pegue este papel com a mão direita, dobre no meio e coloque no chão”) (3 pontos).....( )
- Ler e obedecer “Feche os olhos” (1 ponto).....( )
- Escrever uma frase (1 ponto).....( )
- Copiar um desenho (1 ponto) .....( )

Escore (\_\_\_/30)

## **ANEXO B- TESTE DA FLUÊNCIA VERBAL (TFV).**

- ❖ Orientações para aplicação e avaliação dos resultados:
  - Solicita-se à pessoa que diga o maior número de itens da categoria (animais) durante um espaço definido de tempo (usualmente um minuto), e o escore se dá pelo número de respostas corretas obtidas.
  - Indivíduos normais com escolaridade de 8 anos ou mais são capazes de evocar pelo menos 13 animais, enquanto indivíduos normais com menos de 8 anos de escolaridade evocam pelo menos 11 animais.

## **ANEXO C- TESTE DO DESENHO DO RELÓGIO (TDR).**

- Comando:
  - Folha de papel em branco
  - Desenhar o relógio com todos os números
  - Coloque os ponteiros marcando 8h e 20 minutos

Avaliação: 1-5 desenhos do relógio e dos números incorretos

- 1- Não tentou ou não conseguiu representar um relógio.
- 2- Alguma evidência de ter entendido as instruções, mas o desenho apresenta vaga semelhança com um relógio.
- 3- Números e relógios não mais conectados. Ausência de ponteiros
- 4- Números faltando ou situados fora dos limites do relógio.
- 5-Números em ordem inversa ou concentrados em alguma parte do relógio.

Avaliação: 6-10 relógio e número estão corretos

- 6- Uso inapropriado (código digital ou de círculos envolvendo números)
- 7- Ponteiros completamente errados.
- 8- Distúrbio mais intenso nos ponteiros.
- 9-Leve distúrbio nos ponteiros.
- 10-Hora certa.

## ANEXO D- TESTE DA BATERIA COGNITIVA BREVE (TBCB).

- Etapas do teste:
  - ❖ 10 figuras desenhadas numa folha de papel são apresentadas ao sujeito.
  - ❖ As figuras são nomeadas individualmente em voz audível. Neste momento se avalia a percepção e a nomeação.
  - ❖ Em seguida devem ser lembrados de uma forma incidental, sem o aviso prévio de que deveriam ser memorizados (memória incidental).
  - ❖ As figuras são mostradas posteriormente mais duas vezes, seguida em
  - ❖ cada etapa para que digam quais eram as figuras (memória imediata).
  - ❖ Após a memória imediata é realizado o teste de interferência através do teste da fluência verbal e o teste do desenho do relógio.
  - ❖ A memória tardia dos 10 itens é avaliada após a interferência, solicitando a evocação das figuras apresentadas.
  - ❖ O teste final é feita através do reconhecimento das 10 figuras misturadas com 10 distratores.



## ANEXO E- TABELA DO CDR “CLINICAL DEMENTIA RATING SCALE”

	<b>Normal (CDR- 0)</b>	<b>Demência possível (CDR- 0.5)</b>	<b>Demência leve (CDR- 1)</b>	<b>Demência moderada (CDR- 2)</b>	<b>Demência grave (CDR- 3)</b>
<b>Memória</b>	Memória normal ou esquecimento leve e inconstante.	Esquecimento leve e constante: recuperação parcial de eventos.	Perda de memória moderada, mais marcante para eventos recentes que interfere com as atividades diárias.	Perda de memória grave: somente informações exaustivamente aprendidas são retidas: novas informações rapidamente perdidas.	Perda de memória grave: somente fragmentos permanecem.
<b>Orientação</b>	Orientado	Orientado	Certa desorientação temporal: orientado para lugar e pessoas ao exame: pode apresentar certa desorientação espacial.	Desorientação temporal e frequentemente espacial.	Somente orientação para pessoas.
<b>Juízo e solução de problemas</b>	Juízo preservado: resolve bem os problemas do cotidiano.	Somente dificuldade duvidosa em resolver problemas, e de perceber diferenças e semelhanças.	Dificuldade moderada em resolver problemas complexos: juízo social geralmente mantido.	Dificuldade grave para resolver problemas complexos: juízo social geralmente prejudicado.	Incapacidade para tentar analisar ou resolver problemas.

<b>Vida cotidiana</b>	Vida independente no trabalho, compras, negócios, tarefas financeiras e grupos sociais.	Dificuldade leve ou duvidosa nessas atividades.	Incapaz de vida independente nessas atividades, embora ainda possa permanecer funcional em algumas: ainda pode aparentar normalidade em exame casual.	Sem capacidade para vida independente fora de casa.	Sem capacidade para vida independente fora de casa.
<b>Tarefas do lar e lazer</b>	Tarefas do lar, lazer e interesses intelectuais mantidos.	Tarefas do lar, lazer e interesses intelectuais mantidos ou ligeiramente alterados.	Dificuldade leve mas definida nas tarefas do lar: atividades de lazer mais complicadas e interesses intelectuais abandonados.	Preservada apenas tarefas simples, interesses muito restritos, pobremente sustentados.	Nenhuma tarefa do lar significativa fora do seu próprio quarto.
<b>Cuidados e higiene pessoal</b>	Normal	Normal	Necessita de auxílio ocasional para tarefas.	Necessita auxílio para vestir-se, higiene e manutenção da aparência pessoal.	Necessita muita ajuda para cuidados pessoais; frequentemente com incontinência.

## ANEXO F- ESCALA GERIÁTRICA DE DEPRESSÃO (GDS).

Escala com 30 itens o paciente responde sim ou não para cada pergunta.

0= Quando a resposta for diferente do exemplo entre parênteses

1= Quando a resposta for igual ao exemplo entre parênteses

Total maior que 10 = suspeita de depressão

- 1- Está satisfeito com sua vida? (não)
- 2- Interrompeu muitas de suas atividades e interesses? (sim)
- 3- Sente que a sua vida está vazia? (sim)
- 4- Sente-se frequentemente aborrecido? (sim)
- 5- Você tem muita fé no futuro? (não)
- 6- Tem pensamentos negativos? (sim)
- 7- Na maior parte do tempo está de bom humor? (não)
- 8- Tem medo que algo de mal vá lhe acontecer? (sim)
- 9- Sente-se feliz na maior parte do tempo? (não)
- 10- Sente-se frequentemente desamparado, adoentado? (sim)
- 11- Sente-se frequentemente intranquilo? (sim)
- 12- Prefere ficar em casa em vez de sair? (sim)
- 13- Preocupa-se muito com o futuro? (sim)
- 14- Acha que tem mais problema de memória que os outros? (sim)
- 15- Acha bom estar vivo? (não)
- 16- Fica frequentemente triste? (sim)
- 17- Sente-se inútil? (sim)
- 18- Preocupa-se muito com o passado? (sim)
- 19- Acha a vida muito interessante? (não)
- 20- Para você é difícil começar novos projetos? (sim)
- 21- Sente-se cheio de energia? (não)
- 22- Sente-se sem esperança? (sim)
- 23- Acha que os outros têm mais sorte que você? (sim)
- 24- Preocupa-se com coisas sem importância? (sim)
- 25- Sente frequentemente vontade de chorar? (sim)
- 26- É difícil para você concentrar-se? (sim)
- 27- Sente-se bem ao despertar? (não)
- 28- Prefere evitar as reuniões sociais? (sim)
- 29- É fácil para você tomar decisões? (não)
- 30- O seu raciocínio está tão claro quanto antigamente? (não)

**Escore: ( \_\_\_\_/30)**

**ANEXO G- ESCALA ANALÓGICA DE FELICIDADE.**

Solicita-se ao sujeito para que escolha a figura com a qual o mesmo se identifica ou a figura correspondente de como está se sentindo.

