

MAIRA DI CIERO MIRANDA

ESTUDO DE RECEPTORES COLINÉRGICOS MUSCARÍNICOS E DA ATIVIDADE  
CETILCOLINESTERÁSICA EM CÉREBRO DE PACIENTES IDOSOS COM DEMÊNCIA

Dissertação preparada no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará durante o curso de pós-graduação em Farmacologia em cumprimento às exigências para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

ORIENTADORA: Dra. GLAUCE SOCORRO DE BARROS VIANA

FORTALEZA

1991

FC-00002581-5

MAIRA DI CIERO MIRANDA

ESTUDO DE RECEPTORES COLINÉRGICOS MUSCARÍNICOS E DA ATIVIDADE ACETILCOLINESTERÁSICA EM CÉREBRO DE PACIENTES IDOSOS COM DEMÊNCIA

ORIENTADORA: DRA. GLAUCE S.B. VIANA

FORTALEZA-CE

1991

Aos meus pais (Ronaldo e Candelária), irmãos (Vicente, Jorge, Ronaldo e Germano) e ao meu marido Icaro com AMOR.

"Nos olhos do velho brilha a luz,  
Nos olhos do jovem arde a chama".

Vitor Hugo

ii

## AGRADECIMENTOS

- À Dra. Glauce Socorro de Barros Viana, minha orientadora, pelos ensinamentos e exemplo de dedicação e trabalho, despertando em mim o interesse pela pesquisa.
- Ao professor Dr. José Afonso Bruno, pelo auxílio na dissecação das áreas cerebrais e opiniões dadas na parte metodológica desse trabalho.
- Ao professor Dr. Carlos Maurício de Castro Costa, pela tão valiosa ajuda na análise das lâminas e pela aceitação do convite em compor a banca examinadora dessa dissertação de tese.
- À professora Dra. Veralice Bruim, pela colaboração na avaliação neurológica dos pacientes incluídos nesse estudo.
- Ao professor Dr. Marcus Raimundo Vale, pela demonstração de amizade e pela colaboração no trabalho datilográfico e de impressão dessa tese.
- Ao professor Dr. Vietla Satyanarayana Rao pelo acompanhamento e incentivo durante as etapas de elaboração dessa tese.
- À Dra. Helena Maria dos Santos Rodrigues, geriatra do Lar Torres de Melo, pelo auxílio prestado junto aos idosos para que con-

seguíssemos os dados desejados.

- Aos meus amigos e companheiros Maria Jeane Margort e Silva e José Júlio Costa Sidrim pelo estímulo dado nas horas mais difíceis.

- À Ivanise Sales, técnica de laboratório, que tão eficientemente confeccionou as lâminas de tecido cerebral por nós analisadas.

- À Maria Vilani Rodrigues Bastos, técnica de laboratório, pelo pronto auxílio nos ensaios laboratoriais.

- Ao Francisco Duarte Ferreira, técnico de necrópsia, pela disponibilidade oferecida na execução das necrópsias dos pacientes estudados.

- Ao CNPq pelo suporte financeiro que possibilitou a execução desse trabalho.

## SUMÁRIO

	página
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
ABREVIACOES.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇAO.....	1
1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E SOCIAIS DO ENVELHECIMENTO... 1	
1.2 ALTERAOES FISIOLÓGICAS DO PROCESSO DE ENVELHECIMENTO... 3	
1.3 DEMÊNCIA.....	11
1.4 ALGUNS TIPOS DE DEMÊNCIA NA SENESCÊNCIA.....	15
1.5 DOENÇA DE ALZHEIMER.....	22
1.5.1 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS.....	23
1.5.2 DIAGNÓSTICO.....	27
1.5.3 ETIOLOGIA.....	32
1.6 DOENÇA DE ALZHEIMER E O SISTEMA COLINÉRGICO.....	38
1.7 MODELOS EXPERIMENTAIS DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	43
1.8 POSSIBILIDADES TERAPÊUTICAS PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER... 48	
2. OBJETIVOS.....	59
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	60
3.1 PACIENTES.....	60

3.2 TESTES DE "SCREENING".....	61
3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	62
3.4 DISSECÇÃO DAS ÁREAS CEREBRAIS.....	63
3.5 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DE RECEPTORES MUSC.....	64
3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	66
3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNA.....	66
3.8 SOLUÇÕES E APARELHOS UTILIZADOS.....	67
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68
4. RESULTADOS.....	71
5. DISCUSSÃO .....	93
6. CONCLUSÕES.....	104
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106



## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1: Resultados dos testes de "screening" aplicados aos idosos de um asilo em Fortaleza-CE, diagnosticados clinicamente como dementes.....64
- TABELA 2: Densidade de receptores muscarínicos colinérgicos marcados com 3H-NMS em seis áreas cerebrais de pacientes dementes e controles.....68
- TABELA 3: Atividade acetilcolinesterásica em seis áreas cerebrais de pacientes dementes e controles.....78
- TABELA 4: Dosagem de proteína em seis áreas cerebrais de pacientes dementes e controles.....81

## LISTA DE FIGURAS

1. CORRELAÇÃO IDADE X RECEPTOR (HIPOCAMPO).....	66
2. CORRELAÇÃO IDADE X ATIV. ENZIMÁTICA (HIPOCAMPO).....	67
3. HISTOGRAMA - RECEPTORES MUSCARÍNICOS.....	70
4. CURVA DE SATURAÇÃO (HIPOCAMPO - CONTROLE).....	71
5. CURVA DE SATURAÇÃO (HIPOCAMPO - DEMENTE).....	72
6. CURVA DE SATURAÇÃO (SUBST. INOM.-DEMENTE).....	73
7. CURVA DE SATURAÇÃO (SUBST. INOM.-CONTROLE).....	74
8. SCATCHARD PLOT (SUBST. INOMINADA).....	75
9. SCATCHARD PLOT (HIPOCAMPO).....	77
10. HISTOGRAMA - ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	79
11. HISTOGRAMA - CONCENTRAÇÃO PROTEICA.....	82
12. HISTOLOGIA DE CÓRTEX FRONTAL NORMAL.....	83
13. HISTOLOGIA DE CÓRTEX TEMPORAL PATOLÓGICO.....	84

## ABREVIACÕES

AAE - Aminoácidos excitotóxicos  
AChE - Acetilcolinesterase  
bdB - Banda diagonal de Broca  
CAT - Colina acetiltransferase  
DA - Doença de Alzheimer  
DP - Doença de Parkinson  
FPH - Filamentos pareados helicoidais  
GABA - cido gama amino butírico  
MSF - Metanosulfonilfluoreto  
NMDA - N-metil-D-aspartato  
nbM - Núcleo basal de Meynert  
NGF - Fator de crescimento neuronal  
NMS - N- metil escopolamina  
nsm - Núcleo septal medial  
PMSF - Fenilmetilsulfonilfluoreto  
PS - placas senis  
QNB - Quinuclidinil benzilato  
RCM - Receptor colinérgico muscarínico  
THA - Tetrahidroaminoacridina

## RESUMO

Apesar do sistema colinérgico ser bastante explorado por inúmeros pesquisadores na investigação da doença de Alzheimer, ainda há consideráveis discrepâncias nos resultados relacionados às alterações colinérgicas, sobretudo a respeito dos receptores colinérgicos. Por outro lado, não se poderá excluir a influência do envolvimento de outros sistemas de neurotransmissores para uma real compreensão dessa complexa patologia que atinge cerca de 5 a 15% da população com idade superior a 65 anos.

No presente trabalho foram investigadas alterações no sistema colinérgico central, utilizando homogenatos de tecido cerebral de seis pacientes dementes (75-95 anos) oriundos de um asilo na cidade de Fortaleza-CE e quinze controles (69-102 anos) obtidos do Hospital Universitário. Os pacientes foram diagnosticados como portadores da doença de Alzheimer através de testes de "screening" (IMC - Informação, Memória e Concentração; e SET test), acompanhamento clínico, avaliação neurológica e análise histológica do córtex cerebral.

Foram determinadas a atividade acetilcolinesterásica, número de receptores muscarínicos e concentração proteica de seis áreas cerebrais (giro pré-central, giro pós-central, hipocampo, núcleo caudado, núcleo lentiforme e substância inominada). A análise histológica dos córtices cerebrais (temporal, frontal e parietal) detectou a presença de degenerações neurofibrilares presentes na doença de Alzheimer, embora não patognomônicas dessa

doença.

Foi observado um aumento de receptores muscarínicos somente no hipocampo e na substância inominada, sugerindo um mecanismo compensatório, ou seja, um fenômeno semelhante à supersensibilidade de deservação. A atividade acetilcolinesterásica estava significativamente reduzida no hipocampo e no núcleo caudado, com tendência a redução também nas demais áreas estudadas.

## ABSTRACT

In spite of cholinergic system being enough explored by various workers in the investigation of Alzheimer's disease, still exist considerable discrepancies in the results related to cholinergic alterations particularly in respect to receptor number, needing more detailed studies. On the other hand, we can not exclude the involvement of other neurotransmitter systems for a real understanding of this complex pathology that affects nearly 5 to 15% of the population aged 65 years or older.

In the present work, alteration in central cholinergic system were studied utilizing homogenates of brain tissue from six demented patients (75-95 years) from a nursing home in Fortaleza-CE (Brasil) and fifteen controls (69-102 years) from University Hospital. Alzheimer's disease patients were diagnosed based on screening tests (IMC - Information, Memory and Concentration, and SET test), clinical follow up, neurological evaluation and histologic analysis of brain cortex.

We analysed the acetylcholinesterase activity, muscarinic receptor number and protein concentration in six brain areas ( precentral gyrus, postcentral gyrus, hippocampus, caudate nucleus, lentiform nucleus and substantia inominata). The histologic analysis of brain cortex ( temporal, frontal and parietal) detected the presence of neurofibrillary tangles in patients with Alzheimer's disease, although this finding is not pathognomonic of this disease.

We observed an increase of muscarinic receptors only in hippocampus and in substantia inominata, suggesting a compensatory mechanism or manifestation of denervation supersensitivity. The cholinergic enzyme activity was significantly reduced in hippocampus and in caudate nucleus, with a tendency for reduction also in other areas studied.

# ESTUDO DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS E DA ATIVIDADE ACETILCOLINESTÉRICA EM CÉREBROS DE PACIENTES DEMENTES.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E SOCIAIS DO ENVELHECIMENTO

O envelhecimento da população mundial é um fenômeno novo ao qual mesmo os países mais ricos e poderosos estão tentando se adaptar.

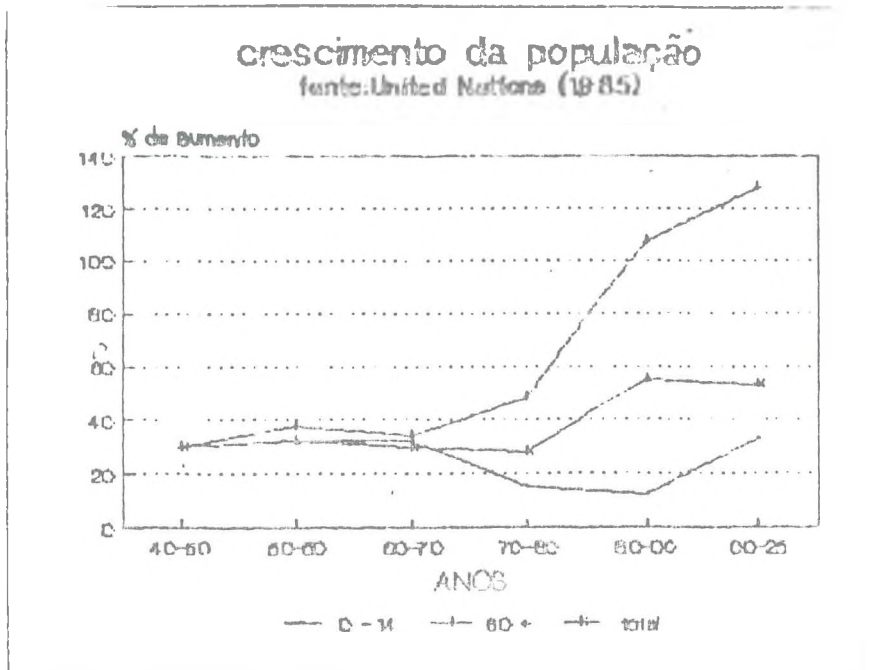
Desde a década de 50, a maioria dos idosos vive em países do terceiro mundo, fato ainda não apreciado por muitos que continuam associando a velhice com os países mais desenvolvidos. Projeções demográficas indicam que de 1980 até o final do século, cerca de três quartos do aumento da população idosa ocorrerão em países subdesenvolvidos. Na América Latina, entre 1980 e o ano 2000 deverá ocorrer um aumento de 120% da população total (de 363,7 para 803.6 milhões), enquanto que o aumento da população acima de 60 anos será de 236% (de 23.3 para 78.2 milhões), ou seja, duas vezes maior que o percentual de aumento para a população como um todo (KALACHE et al, 1987).

Em parte, o aumento atual do número de pessoas idosas em países menos desenvolvidos é decorrente do alto número de nascimentos durante as primeiras décadas deste século, associado a um progressivo decréscimo nas taxas de mortalidade e mais recentemente ao declínio nas taxas de fecundidade.

No Brasil o crescimento da população idosa vem sendo acentuadamente acelerado. Até o ano 2000 o grupo de 0 a 14 anos



deverá crescer apenas 14% contra 107% do crescimento do grupo de 60 anos ou mais, sendo que a população como um todo crescerá 56%. Em termos numéricos a população de idosos no Brasil no ano 2000 será de aproximadamente 14 milhões (United Nations, 1984; Fundação IBGE, 1981).



Crescimento(%) da população brasileira segundo grupos etários:  
0-14 anos; 60+, 1940-2025.

Fonte: Anuário Estatístico do Brasil (1985).

O aumento do número de idosos numa população se traduz em um maior número de problemas de longa duração, que com frequência dependem de intervenções custosas envolvendo tecnologia complexa para um cuidado adequado. Gradualmente se estabelece uma competição de recursos: de um lado problemas prementes, com alta mortalidade infantil ou desnutrição, de outro um número crescente de diabetes, acidentes vasculares cerebrais ou demência senil

(KALACHE et al,1987).

Ao lado de doenças infecciosas e parasitárias que continuam sendo causas de morte relativamente frequentes, as doenças crônicas, comuns das idades mais avançadas, estão se tornando progressivamente mais prevalentes em nosso país. No que diz respeito à saúde da parcela mais idosa da população a complexidade é agravada pela cronicidade das doenças e que absorvem grandes quantidades de recursos humanos e materiais (KALACHE et al,1987). O desafio assim gerado é considerável. De um lado países como o Brasil continuarão a mostrar, através de seus indicadores de saúde, as marcas do subdesenvolvimento e das desigualdades sociais e por outro lado, passarão a apresentar aumento da incidência e prevalência das doenças crônico-degenerativas e demais problemas comuns da terceira idade (KALACHE et al,1987)

Conclui-se que o Brasil, embora ainda longe de resolver os problemas relacionados com a infância, já está tendo de enfrentar as implicações sociais e de saúde decorrentes de um processo de envelhecimento compatível àquele experimentado pelos países mais desenvolvidos.

## 1.2. ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS DO PROCESSO DE ENVELHECIMENTO

Entre os indivíduos idosos ressaltam-se as anormalidades decorrentes da disfunção do sistema nervoso, como deficiência da memória, da capacidade intelectual, da coordenação motora, do equilíbrio, postura, etc. O sistema nervoso é invariavelmente o mais afetado no processo de envelhecimento uma vez que, diferen-

temente dos demais sistemas do organismo cuja capacidade de reparo celular se mantém no decorrer do tempo, as células nervosas não dispõem dessa capacidade reparadora, pois se trata de unidades funcionais pós-mitóticas, sem possibilidade de atividade reprodutora (DRACHMAN, 1984). A capacidade de aprendizado, de memória e reconhecimento implica em necessidade de retenção e estocagem de material bioquímico num sistema estável, não sujeito à substituição de elementos (STREHLER, 1975).

Ainda são desconhecidos os mecanismos moleculares que atuam no processo de envelhecimento. Há muitas evidências de que o código genético embutido em cada célula desempenhe um papel predeterminado nas alterações próprias do envelhecimento. Alguns consideram que, do nascimento até a morte, a contínua leitura bioquímica das informações contidas no código genético permite o desenvolvimento, maturação e senescência da célula, numa ordem pré-programada e inexorável, de modo que a inevitabilidade deste ciclo esteja garantida. Deste modo, no código genético já estaria estampado um mecanismo de auto-eliminação pré-programado que abrangeria um tempo mais ou menos determinado. Para outros, com o passar dos anos ocorrem alterações nos genes, mutações e anormalidades se acumulam; os ácidos nucleicos se alteram, devido a uma série de eventos como radiações ionizantes, infecções, toxinas ambientais, medicamentos, etc. Essas modificações levam a uma quebra da fisiologia celular, que eventualmente implicará na inviabilidade funcional e morte da célula (KREMZNER & CÔTE, 1983)

Alterações metabólicas funcionais com desvios bioquímicos, formação de radicais livres e superóxidos vão se acumulando

do nas células e levando-as à morte (ROTH, 1980).

De um modo mais abrangente, as alterações que ocorrem no envelhecimento fisiológico são devidas: a) a formação de radicais livres; b) ligações cruzadas a nível molecular; c) mutação somática; d) acumulação de erros macromoleculares; e) e perda de informação do genoma celular (ROTHSCHILD, 1984).

Quando o cérebro de um indivíduo na oitava ou nona década é confrontado com o de um jovem na primeira ou segunda década de vida, diferenças notáveis são observadas. Mesmo nos indivíduos idosos considerados normais, isto é, naqueles com o intelecto preservado (dentro do que se espera para a idade, o que já é relativo) e isento de anormalidades clínicas e neurológicas, o usual é que se observem algumas alterações vasculares, presença de placas senis ou degeneração granulovacuolar e mesmo um número limitado de neurônios com degeneração neurofibrilar que, caracterizam alguns quadros patológicos próprios da senilidade. O cérebro do idoso isento desses aspectos, ou com alterações mínimas é incomum. Até quando se admite a presença de tais anormalidades, e também de outras, considerando-se o cérebro observado representativo de um "envelhecimento normal", tal opinião é debatível e sujeita a interpretações subjetivas dos patologistas (ANDRADE, 1988).

No tocante ao peso do cérebro, existe redução em torno de 5 a 10% em média, quando se comparam idosos e jovens. O aspecto macroscópico à observação revela um aumento dos sulcos entre as circunvoluções, secundário à atrofia destas e aumento no tamanho dos ventrículos cerebrais.

Ao longo da vida há um decaimento no estoque de neurônios de maneira progressiva, cuja velocidade é muito pequena nas idades mais baixas, mas vai aumentando acentuadamente a partir dos cinquenta anos. A comparação dos números permite avaliar entre 50.000 a 100.000 o número de desaparecimento diário de neurônios, o que atesta, até certo ponto, a capacidade plástica do cérebro de se adaptar a tal perda. A arborização dendrítica das células piramidais do neocórtex sofre uma redução progressiva no idoso e a redução dos dendritos faz com que as sinapses se reduzam, e desta maneira as ligações entre os neurônios são diminuídas. Abaixo de algum "nível crítico" a redução dos neurônios e da arborização dendrítica dos remanescentes propiciará o início dos sintomas de deficiência cerebral (ANDRADE, 1988).

O processo de envelhecimento não afeta todas as regiões do cérebro igualmente, e dentro de cada região diferentes tipos de células nervosas mostram alterações marcantes dependendo da idade. Por exemplo, o córtex cerebral é mais afetado do que o tronco cerebral, e dentro do tronco alguns núcleos são mais afetados pelo processo de envelhecimento, enquanto outros são mais resistentes (BRODY, 1976).

No entanto, em comparação com a Doença de Parkinson (DP), onde a destruição de células se restringe aos neurônios dopaminérgicos, o processo de envelhecimento compromete as células nervosas mais extensamente. Então, mais do que um neurotransmissor deverá ser repostado para compensar as várias perdas funcionais do cérebro na idade avançada.

Evidências indicam que os neurônios produtores de catecolaminas são especialmente susceptíveis ao envelhecimento. Como mencionado anteriormente, os núcleos do tronco cerebral em geral parecem resistentes ao envelhecimento. Entretanto, duas exceções são o locus ceruleus e a substância nigra, sítios de neurônios produtores de noradrenalina e dopamina respectivamente (CARLSSON, 1985).

Um decréscimo na função dopaminérgica pode contribuir para a perda da iniciativa e da energia psíquica como também redução da atividade motora observada no envelhecimento. De outro modo, alteração do humor (deprimido) observado nos idosos pode particularmente ser devido a função diminuída das três principais monoaminas (CARLSSON, 1985).

A perda da memória está associada a redução da função colinérgica, o que realmente ocorre em uma determinada extensão durante o processo normal de envelhecimento, de acordo com vários estudos. Porém, as monoaminas são importantes na atenção, o que é um pré-requisito para a função normal da memória (CARLSSON, 1985).

É preciso não esquecer que o cérebro do velho pode funcionar otimamente, pelo menos sob condições favoráveis. Isso pode ser devido aos mecanismos compensatórios como o aumento do turnover do neurotransmissor pelos neurônios funcionais e da sensibilidade do receptor correspondente. Ao longo do tempo que o cérebro funcionar satisfatoriamente, a única consequência da perda de células nervosas será a redução da capacidade de reserva, por exemplo, a bem conhecida susceptibilidade ao delírio relacionada com a idade sob condições de stress. Entretanto, quando a perda

celular alcança um certo grau, os mecanismos compensatórios não são mais eficientes e as insuficiências são manifestadas (CARLSSON,1985). Estudos epidemiológicos indicam que a ocorrência de demência severa aumenta progressivamente acima dos 70 anos e aproxima-se de 50% na idade de 90 a 100 anos(ADOLFSSON et al,1981). Tem sido proposto que aquelas células nervosas que possuem forte dependência com a idade são mais vulneráveis de um modo geral. Por exemplo, elas são propensas ao prejuízo em condições agudas que afetam o metabolismo energético do cérebro, como isquemia, hipóxia, hipoglicemia e ataques epilépticos(SIESJO,1979).

Peroxidação das membranas intracelulares por radicais livres, tem sido sugerido como causa comum de prejuízo da célula nervosa. Isso, por sua vez, pode ser induzido por falha dos mecanismos de proteção que servem para anular enzimaticamente os radicais livres, como a superóxido desmutase, catalase, gluta-tião peroxidase, ou são capazes de prevenir a oxidação ou aprisionar os radicais livres como a vitamina E, vitamina C e o gluta-tião. Uma possível fonte de radicais livres são os peróxidos produzidos pela monoamino oxidase B. O prejuízo de maior importância dos radicais livres são os relacionados com alterações no DNA da célula levando a mecanismos de reparação defectivos, erros de transcrição e defeitos na síntese proteica(MANN et al,1981). Essa enzima está aumentada com a idade(DAVISON,1987). A enzima B em contraste com a A parece não está fortemente envolvida com o metabolismo de neurotransmissores do tipo monoaminas. Dados experimentais sugerem que a MAO B existe preferencialmente

nas células gliais (STUDENT & EDWARDS, 1977) e que o aumento seletivo dessa enzima pode ser induzido pela degeneração nervosa (FOWLER et al., 1980) ou pode ser interpretado como proliferação glial em resposta a degeneração de células nervosas.

A vulnerabilidade de certos tipos de células nervosas pode estar relacionada com a intensidade dos processos metabólicos intraneurais. Prejuízo vascular pode ser um fator envolvido, os grânulos de lipofucsina (pigmentos da idade) contém lipídios peroxidados (SIESJO, 1979).

A vulnerabilidade dos neurônios catecolaminérgicos é um caso especial. Tem sido demonstrado que as catecolaminas podem ser citotóxicas e mutagênicas sob condições especiais. O pré-requisito para essa atividade é a formação de semiquinonas que são compostos responsáveis principalmente pelos efeitos tóxicos. Esses compostos são capazes de formar ligação covalente com o DNA, proteínas e assim por diante. Se a formação desses compostos que acidentalmente ocorre em grande parte ou inteiramente de modo não enzimático é prevenida por um antioxidante, a ação tóxica é igualmente prevenida (MOLDÉUS et al., 1983).

A formação de compostos quinonóides se dá em certos locais, principalmente nas células nervosas que contém neuromelanina: os quinonóides são de modo geral considerados intermediários da formação de neuromelanina. Isso leva a postular que as células nervosas que contém neuromelanina cometem um suicídio ao longo dos anos pela produção de material citotóxico. Esse fato pode explicar a susceptibilidade dos neurônios catecolaminérgicos que contém neuromelanina presentes no locus ceruleus e na subs-



tância nigra (CARLSSON,1985).

Um tratamento racional das disfunções cerebrais na senescência necessitaria de um mapeamento preciso das perdas neuronais e dos neurotransmissores. Teoricamente a substituição terapêutica parece possível pela substituição de agonistas nas regiões bioquimicamente deficientes, como foi comprovado na Doença de Parkinson a melhora dos sintomas clínicos com a administração do precursor da dopamina, a L-dopa .Outra abordagem seria a prevenção do prejuízo oxidativo com medidas para elevar o nível de antioxidantes fisiológicos nos fluidos corporais ou favorecimento dos mecanismos de proteção.

### 1.3 DEMÊNCIA

O termo demência aplica-se a diminuição adquirida, progressiva e irreversível, de todas as funções intelectuais, memória, atenção, julgamento e capacidade de raciocínio, e às perturbações das condutas sociais resultantes.

A deterioração intelectual global que caracteriza a demência deve ser distinguida da perturbação limitada a um outro aspecto das funções simbólicas (afasia, apraxia, agnosia), consequência frequente de uma lesão localizada no encéfalo. Além disso, a deterioração intelectual de natureza demencial é definitiva e irreversível, o que a diferencia das funções superiores de natureza confusional (CAMBIER *et al.* 1988).

As circunstâncias da descoberta de uma deterioração progressiva das funções intelectuais são variáveis e frequentemente fortuitas, pois o doente não está perfeitamente consciente, o que é mais surpreendente, as pessoas que o cercam são algumas vezes bastante tolerantes. O início aparente pode ser francamente psiquiátrico, sob a forma de um episódio agudo de uma fuga, de um estado de excitação, de um delito de carácter médico-legal ou de perturbações mais insidiosas; a demência pode ter sua origem mascarada por um delírio persecutório, por um estado depressivo ou por alterações de carácter. Em outras circunstâncias, são os erros profissionais, as "más condutas", uma diminuição no rendimento ou, mais ainda, a incapacidade de se adaptar a uma nova situação, além de um enfraquecimento da memória e um empobrecimento da linguagem que mostram a deterioração já grave e extensa do conjunto

das funções superiores. O caráter global desta deterioração é facilmente reconhecido se a exploração é conduzida metodicamente (CAMBIER et al, 1988).

-Orientação no tempo e no espaço: a confusão de datas, a incapacidade de se situar no tempo, a impossibilidade de se orientar nos locais pouco habituais e, depois, nos locais familiares ou até na sua própria moradia são frequentes desde o início e agravam-se com o progresso da demência.

-Capacidades operatórias: a alteração da atenção aparece na necessidade de repetir as questões mais simples, na inconsistência das respostas, no comportamento do doente que não se submete às condições do exame, pois se levanta e anda durante o interrogatório.

As perturbações da memória referem-se inicialmente a fatos recentes: o indivíduo não consegue repetir algumas palavras ou uma frase curta que tenha lido ou ouvido a poucos minutos antes. Ele não pode resumir um texto curto que acaba de ler, assim como não conhece mais as personagens ou fatos que marcam a atualidade e refere-se a uma situação distante 10 ou 20 anos. Perde os objetos pessoais por não se lembrar onde os colocou. Por outro lado, a memória para os fatos antigos está relativamente conservada, mas, a medida que progride a doença, suas lembranças voltam até os anos da infância.

-Funções simbólicas: as alterações da atividade sexual, a apraxia construtiva e a apraxia ideatória, são frequentes na evolução das

demências; não é raro também que apareçam dificuldades que lembram uma afasia de Wernicke, alterações acentuadas da compreensão, parafasias, jargonofasias e erros de denominação. Em outros casos, trata-se de uma afasia amnésica. Porém, o aspecto mais característico é uma redução global dos valores da linguagem: a ideação é retardada; as frases não são terminadas, mostram-se imprecisas, com rodeios e entrecortadas de pausas. As respostas são inadequadas às perguntas, eventualmente consistindo apenas em uma repetição da pergunta (ecolalia); as estereotípias verbais abundam.

-Capacidade de raciocínio: o indivíduo é incapaz de resolver problemas elementares, ainda que o cálculo mental seja relativamente conservado.

-Julgamento: a impossibilidade de criticar uma história absurda e a perda da autocritica caracterizam essa alteração.

A demência, uma síndrome com prejuízo intelectual decorrente da disfunção cerebral é a maior causa de incapacidade na velhice e um crescente problema de saúde. A classificação mais acurada e sofisticados instrumentos diagnósticos têm permitido a identificação de algumas condições tratáveis, no entanto a avaliação precoce com suspeita de demência é essencial. A Doença de Alzheimer é a mais comum das demências, é difícil o diagnóstico nos estágios iniciais e não há tratamento efetivo. Hidrocefalia, infecções do SNC, encefalopatias metabólicas ou tóxicas, múltiplos infartos, tumores cerebrais e o alcoolismo crônico são causas de demências potencialmente tratáveis (HORN, 1987).

CUMMINGS e BENSON(1983) popularizaram a subclassificação da demência em cortical ou subcortical. Demências corticais (Alzheimer, Pick) são caracterizadas por amnésia, acentuados déficits cognitivos(cálculo, julgamento, abstrações), indiferença afetiva, déficits de linguagem, fala normal(articulação) e função normal do sistema motor. Pacientes com demência subcortical são descuidados e esquecidos, cognição lenta ou dilapidada, afeto deprimido, linguagem hipofônica e disartria. Apresentam também sinais motores anormais como a postura parada e tônus aumentado, desordens de movimento com tremor e alterações no modo de andar. Demências subcorticais são vistas em pacientes com Parkinson, coreia de Huntington, paralisia supranuclear progressiva, hidrocefalia e encefalopatias tóxicas ou metabólicas.

As demências na idade avançada incluem: demência por múltiplos infartos, demência senil, Doença de Alzheimer, Doença de Pick, Doença de Jacob-Creutzfeld e coreia de Huntington.

Várias investigações epidemiológicas revelam que 5 - 15% das pessoas com 65 anos ou mais apresentam alguma forma de demência. 60% dos pacientes com demência foram considerados como portadores da Doença de Alzheimer(TERRY & KATZMAN,1983). Outro importante subgrupo é a demência por múltiplos infartos (DMI), a qual se deve a distúrbios vasculares cerebrais. Aceita-se que 20 - 30% das demências na idade avançada se deva a doenças vasculares(TERRY & KATZMAN,1983).

GOTTFRIES,1985 demonstrou que existe uma forte correlação entre a percentagem de pacientes dementes e a idade. Isso pode sugerir que o processo fisiológico de envelhecimento tenha im-

portância patológica:

65 -74 anos: 0.8 - 1.6% dementes

75 -84 anos: 18.5% dementes

acima de 95 anos: 43.3% dementes.

No Brasil, embora não hajam estatísticas oficiais a respeito, não vemos razões para que haja discrepâncias com o levantamento numérico feito nos países do hemisfério norte.

#### 1.4 ALGUNS TIPOS DE DEMÊNCIA NA SENESCÊNCIA

DEMENCIA POR MÚLTIPLOS INFARTOS (noutro termo demência arterioesclerótica ou arterioesclerose cerebral) é uma síndrome com prejuízo intelectual secundário a múltiplos infartos cerebrais e tem sido reconhecida desde 1899 (FIELDS, 1986). Esse tipo de demência é o segundo mais comum. Infelizmente os critérios diagnósticos não são precisos. Caracteristicamente a demência por múltiplos infartos progride por passos, com algumas remissões. HACHINSKI *et al.* (1975) desenvolveram uma escala isquêmica para uso clínico a qual ajuda diferenciar a demência por múltiplos infartos da Doença de Alzheimer. Os maiores critérios são o início abrupto, flutuações nos déficits, história de conhecidos infartos cerebrais, sintomas neurológicos focais e sinais neurológicos focais devem estar presentes antes do diagnóstico da demência por múltiplos infartos ser feito. Este tipo de demência provavelmente compreende duas síndromes, uma causada por múltiplos infartos grandes e a outra causada por múltiplos infartos profundos e pequenos.

Na demência por múltiplos infartos a afasia pode coexistir com apraxia (no andar) e sinais extrapiramidais. A memória pode ser afetada devido a interrupções multifocais das vias basais via córtex - sistema de projeção colinérgica (BENSON *et al.*, 1983).

É potencialmente tratável se uma condição corrigível responsável pelos múltiplos infartos for encontrada antes que uma demência severa se instale. Fontes de embolia e vasculites cerebrais devem ser consideradas de modo relevante. Medicamentos antiagregantes plaquetários ou anti-hipertensivos podem retardar o curso da doença no estágio inicial em alguns pacientes. Demência severa ou prolongada deste tipo não é reversível e é tratada com terapia de apoio (sintomática) semelhante a Doença de Alzheimer (HORN, 1987). Embora etiologicamente diferentes a DMI e a Doença de Alzheimer (DA) apresentam similiaridades clínicas. O quadro de demência da DMI inclui distúrbio intelectual, emocional e motor do mesmo modo que a DA, porém, algumas vezes o diagnóstico diferencial se torna difícil. Os achados neuropatológicos detalham os problemas de diagnóstico diferencial, no entanto, um grupo misto foi encontrado onde tanto lesões da DA quanto infartos foram encontrados.

**DEMÊNCIAS IÓXICAS:** Podem ser produzidas por um grande número de agentes químicos, dentre eles drogas antipsicóticas, sedativos, hipnóticos, anticonvulsivantes e drogas anticolinérgicas. Pessoas idosas são particularmente susceptíveis ao aparecimento de reações adversas pelo uso prolongado de drogas psicoativas (DAVIS,

1975). Benzodiazepínicos são frequentemente ofensores, mas até mesmo anticonvulsivantes nos níveis sanguíneos terapêuticos podem reduzir a cognição (TRIMBLE & THOMPSON, 1983). Deve-se suspeitar de intoxicação por drogas quando nos deparamos com pacientes dementes.

Finalmente, até mesmo os pacientes com doenças degenerativas como a Doença de Alzheimer apresentam melhora dramática na cognição quando drogas sedativas/antipsicóticas são interrompidas.

INFECCÕES DO SNC: Muitos neurologistas recomendam a punção lombar em pacientes com demência de pelo menos seis meses de duração a fim de excluir casos ocasionais de neurosífilis ou meningite crônica.

Infeções virais respondem por muitas causas de demência, como a doença de Creutzfeld-Jacob. Qualquer paciente com síndrome demente subaguda com movimentos abruptos mioclônicos e proeminentes achados extrapiramidais, deve-se suspeitar da doença de Creutzfeld-Jacob. O diagnóstico pode ser apoiado com achados eletroencefalográficos de descargas periódicas (CELESIA, 1986). Infelizmente o diagnóstico ante-mortem pode ser feito com certeza somente pela biópsia cerebral e muitos casos não são diagnosticados. Demência acompanhada de disfunção motora poderá desenvolver em 65% dos pacientes com AIDS. Algumas das encefalopatias relacionadas com AIDS são devidas às infecções oportunistas, mas a maioria é resultado da infecção direta do vírus da imunodeficiência adquirida no cérebro afetando principalmente a substância



branca (NAVIA et al,1987). A atrofia e ventriculomegalia são demonstrados na tomografia computadorizada, frequentes achados na AIDS.

TUMORES CEREBRAIS: Particularmente os tumores de origem interna e que comprometem os lobos frontal e temporal direito podem causar uma síndrome de demência. Os tumores podem também obstruir a drenagem ventricular e produzir hidrocefalia. Meningiomas e gliomas quando volumosos podem causar demência(CUMMINGS & BENSON,1983). Pacientes severamente dementes, mesmo aqueles com tumores benignos podem não melhorar com a cirurgia.

Encefalopatia associada ao câncer sistêmico é comum(PLUM & POSNER,1980). Os mecanismos são lesões e incluem metástases intracranianas, infecções induzidas por imunossupressão, encefalopatia tóxica metabólica, coagulopatias, endocardite, vasculite e leucoencefalopatia relacionada com o tratamento.

DOENÇA DE PARKINSON: DP e demência tem sido associadas desde a descrição original de Parkinson. Estimativas modernas do prejuízo intelectual dos pacientes com Parkinson é da ordem de 40 a 50%(BOLLER et al,1980). A demência na doença de Parkinson pode ser cortical e subcortical(CUMMINGS & BENSON,1983), além do que pacientes com Parkinson e demência severa possuem alterações patológicas típicas da Doença de Alzheimer, incluindo degeneração acentuada do núcleo basal de Meynert(ROGERS et al,1986). O tratamento com anticolinérgicos e levodopa pode resultar em efeitos benéficos ou maléficos sobre a demência coexistente. Drogas anti-

parkinsonianas geralmente pioram o estado confusional observado nos pacientes severamente dementes e com Mal de Parkinson.

CORÉIA DE HUNTINGTON :é uma desordem autossômica com início na idade madura(40 a 50 anos). Alterações na personalidade, irritabilidade, depressão, apatia e tentativas de suicídio podem preceder o início da coréia(MARTIN,1984). A demência é tipicamente subcortical com funções cognitivas lentas e proeminente distúrbio de memória(CUMMINGS & BENSON,1983). Patologicamente há uma acentuada perda neuronal no estriado(putâmen e caudado) com substancial perda no globo pálido e córtex cerebral(MARTIN,1984). O núcleo basal não está muito envolvido na degeneração, surgindo a indagação da causa da perda da memória(CLARK et al,1983). A disfunção cognitiva na doença de Huntington parece estar relacionada a um reduzido fluxo sanguíneo cerebral nas regiões fronto-temporal(TANAHASHI et al,1985). A tomografia computadorizada do cérebro usualmente demonstra atrofia do núcleo caudado. Depressão e outros componentes afetivos podem responder a uma terapia sintomática, mas a demência não melhora com as drogas coreolíticas.

PSEUDODEMÊNCIA: foi assim denominada em 1880 por CARL WERNICKE referindo-se a um "estado crônico histérico mimetizando fraqueza mental"(BULBENA & BERRIOS,1986). Nos últimos 100 anos o termo pseudodemência tem sido frequentemente aplicado a condições funcionais psiquiátricas(depressão, esquizofrenia e histeria) as quais mimetizam demência(FISMAN,1985). Pseudodemência é mencionada devido a sua frequência e é usualmente tratável. O diagnóstico

de um episódio depressivo acentuado semelhante a demência depende da existência de alguns sintomas e sinais, como: humor disfórico, pouco apetite, significativa perda de peso, insônia e hipersônia, agitação psicomotora ou retardação, perda da energia ou fadiga, sentimento de desmerecimento e idéias suicidas (FISMAN, 1985). Muitos desses sintomas não são exclusivos da depressão, mas podem ser vistos em muitas doenças demenciais, é importante haver consulta psicológica e psiquiátrica quando a pseudodemência depressiva é suspeitada. Além disso, depressão pode ser a manifestação inicial de demência (FISMAN, 1985). Devido ser a depressão muito comum, muitos médicos dão ao paciente demente antidepressivos tricíclicos.

DOENÇA DE PICK: essa doença é um distúrbio degenerativo do córtex cerebral que produz demência na meia-idade e na velhice. Ela se diferencia da Doença de Alzheimer por sua anatomia mórbida. Em contraste com a DA na qual a atrofia cerebral é difusa, na Doença de Pick a atrofia é relativamente circunscrita e confinada aos lobos temporal e frontal, onde é grave. A patologia microscópica revela degeneração neuronal caracterizada pelo acúmulo perto do núcleo de uma massa globular argentofílica que distende o núcleo a uma forma tumefeita. Essa é a célula de Pick, geralmente difundida nas áreas atrofiadas do córtex. Há, por via de regra emaranhados neurofibrilares e placas senis nas partes atroficas do cérebro.

é difícil distinguir a doença de Pick da doença de Alzheimer em bases clínicas. a doença de Pick é bem menos comum que

a Doença de Alzheimer e ambas não possuem causa definida. Alguns exemplos da doença de Pick parecem ser transmitidos por um gene dominante em uma família, mas muitos não tem história familiar.

## 1.5 DOENÇA DE ALZHEIMER

Em 1907, Alois Alzheimer relatou um caso de uma mulher de 51 anos que no prazo de quatro anos e meio apresentou progressiva perda da memória, alterações na personalidade, distúrbios de linguagem e apraxia. Na autópsia utilizando um novo método de impregnação pela prata desenvolvido por Bielschowsky, Alzheimer (1907) encontrou numerosas degenerações neurofibrilares nos neurônios corticais. O córtex também continha inúmeros focos - provavelmente as chamadas placas senis ou neuríticas, estruturas essas primeiramente identificadas por Blocq e Marinesco em 1892 as quais foram associadas a demência senil por Redlich e por Fisher (AMADUCCI et al, 1986). Posteriormente Alzheimer ilustrou com mais detalhes as alterações neurofibrilares e três anos após a sua descoberta, Emil Krapelin, um ilustre psiquiatra, codificou a Doença de Alzheimer como uma entidade separada. Por muitos anos a Doença de Alzheimer era vista como uma demência rara cujo início dos sintomas era antes dos 65 anos. Mais recentemente, entretanto, tem-se observado que a forma senil e pré-senil da doença não é distinguível pelos achados clínicos e patológicos (BLESSED et al, 1968) e passou-se a empregar o termo Doença de Alzheimer sem considerar a idade do paciente em relação ao início dos sintomas (KATZMAN, 1976).

Em estudos pós-mortem, Alois Alzheimer identificou a presença de placas senis e degeneração neurofibrilar no córtex de pacientes dementes, alterações neuropatológicas clássicas da doença. Em 1911, Simchowicz salientou o achado comum de degenera-

ção granulovacuolar no hipocampo e mais recentemente a amiloidose cerebrovascular e a presença dos corpos de Hirano têm sido reconhecidos como achados patológicos frequentes. A importância funcional dessas anormalidades foi evidenciada em 1968 por BLESSED et al. quando da correlação da quantidade de placas no córtex com o escore de uma escala funcional de demência e o teste de informação, memória e concentração. Por isso eles sugeriram que as anormalidades corticais representadas pelas placas senis e degeneração neurofibrilar eram importantes causas da DA.

A extensão da ocorrência dos critérios microscópicos da DA nos idosos não dementes não foi estabelecida, podendo tais anormalidades estarem presentes como alterações inespecíficas, definindo a DA apenas pelo seu número excessivo.

#### 1.5.1 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Degeneração neurofibrilar: concentra-se na região perinuclear, citoplasmática, dos neurônios localizados no hipocampo, neocórtex e em outras áreas como nos núcleos da base. Na microscopia eletrônica a degeneração neurofibrilar consiste de um emaranhado de estruturas fibrilares contorcidas de forma helicoidal, são os filamentos pareados helicoidais (FPH). Filamentos retos, ribossomas e neurofilamentos ou neurotúbulos de aparência normal também são encontrados (PERRY et al., 1987; YAGISHITA et al., 1981). Embora proeminente na DA, a degeneração neurofibrilar também é encontrada no envelhecimento fisiológico bem como em várias outras doenças de

menciais como a Doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, demência pugilística, Síndrome de Down na idade adulta e em alguns casos de panencefalite esclerosante subaguda (WISNIEWSKI *et al*, 1979).

Ainda não está confirmado se as proteínas dos FPH representam uma alteração dos elementos do citoesqueleto ou síntese anormal de proteínas. DAVIES e MALONEY (1976) consideram que as alterações neurofibrilares estão relacionadas com defeitos bioquímicos neuronais e que a deposição intraneuronal de filamentos pode reduzir a atividade neuronal e seu metabolismo e, a quantidade da colina acetiltransferase (CAT) por neurônio pode também diminuir.

Placas neuríticas (ou senis): são descritas como uma massa esférica composta de neurônios degenerados e células reativas agrupadas. Existe uma parte central de material amilóide cercada por astrócitos reativos, células microgliais e restos neuronais. A localização preferencial guarda relação com a dos neurônios com degeneração neurofibrilar, concentrando-se no córtex frontal e temporal e hipocampo preferencialmente. A concentração de placas senis é diretamente proporcional ao grau de demência e inversamente proporcional a atividade da CAT (ANDRADE, 1988). Alguns autores acreditam que o material amilóide seja oriundo do sangue (MANN, 1985) e seja o evento incitador para a formação da placa. Outros pressupõem que a deposição do material amilóide acontece secundariamente, derivado talvez dos FPH ou outros produtos dos neurônios

degenerados ou da microglia após estímulo antigênico apropriado (STRUBLE *et al.*, 1982). Um aspecto interessante é a presença do alumínio como um componente importante do núcleo central da placa, concorrendo com 6 a 24% do material aí existente. Pensava-se inicialmente que o alumínio era decorrente da contaminação ambiental, atualmente acredita-se que o metal seja transportado para as placas por algum defeito na barreira hematoencefálica local ou alterações metabólicas dos neurônios degenerados e represente um fenômeno secundário (TERRY, 1984). De modo geral a degeneração neurofibrilar, as placas neuríticas não são específicas da DA, aparecendo no envelhecimento normal, nos pacientes com Síndrome de Down que sobrevivem até a idade madura e em alguns casos da doença de Pick (HENDERSON *et al.*, 1989).

Degeneração Granulovacuolar e Corpos de Hirano: descrita pela primeira vez por Simchowicz em 1911, sendo associada a demência. A degeneração granulovacuolar compreende vacúolos esféricos de 3 a 5 $\mu$  de diâmetro, os quais são vistos frequentemente nos neurônios piramidais do hipocampo (TOMLINSON & KITCHENER, 1972). Cada vacúolo contém um grânulo argentofílico de 0.5 a 1.5 $\mu$  de diâmetro, cuja imunorreatividade sugere ser a tubulina o principal constituinte (PRICE *et al.*, 1986).

Os corpos de Hirano foram primeiramente observados na Doença de Parkinson e esclerose amiotrófica lateral. Representam inclusões eosinofílicas com mais de 30 $\mu$  de comprimento semelhantes a um bastão e encontram-se no pericário e nos axônios de neu-



rônios hipocampais. Os corpos de Hirano são imunohistoquimicamente marcados com antisoro contra actina purificada (GOLDMAN, 1983). Como a degeneração granulovacuolar e as placas neuríticas, os corpos de Hirano e a degeneração granulovacuolar são também encontrados nos cérebros de velhos não dementes como nos portadores de outras doenças demenciais além da DA (GIBSON & TOMLINSON, 1977).

Amiloidose cerebrovascular: Na doença de Alzheimer também ocorrem alterações do parênquima como a angiopatia amilóide dos pequenos vasos meningeais e da substância cinzenta. Em larga proporção de casos, vasos na profundidade da substância branca mostraram alterações devido não somente aos depósitos amilóides, mas ao estreitamento arterioesclerótico de hialina. O material amilóide encontrado na vasculatura cerebral é o mesmo presente no centro das placas senis (ESIRI & WILCOCK, 1986) e trata-se de um polipeptídeo conhecido como "beta proteína" ou "beta amilóide" codificado por um gene do cromossoma 21. Na síndrome de Down o depósito de material amilóide é idêntico ao encontrado na DA (GLENNER & WONG, 1984). O peso molecular do material amilóide das placas é de 4KD e é algumas vezes referido como proteína A4 (MASTERS et al., 1985). Interessante é a presença do RNA mensageiro codificador da proteína precursora do material amilóide estar presente não somente no cérebro, mas em tecidos não neuronais. A estrutura e função desse possível precursor amilóide são sugestivas de uma glicoproteína presente na membrana celular que pode funcionar como um inibidor de protease. Uma atividade alterada da protease na

DA parece importante se, por exemplo, ela pode estar ligada ao acúmulo de substâncias proteicas anormais em placas e causar a degeneração neurofibrilar. Alternativamente, atividade alterada ou concentração excessiva do inibidor da protease podem afetar o funcionamento normal das proteases cerebrais cujo substrato é o precursor beta amilóide ou seus fragmentos (ABRAHAM et al, 1988).

#### 1.5.2 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E PATOLÓGICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

O diagnóstico da doença de Alzheimer é difícil devido às características clínicas laboratoriais e patológicas da DA também ocorrerem de maneira mais limitada no envelhecimento "normal" como também em outras doenças demenciais.

O diagnóstico da DA deve-se basear nos critérios desenvolvidos por um grupo patrocinado pelo National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS) e Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (ADRDA), onde os sintomas e sinais são subdivididos em prováveis e definitivos.

---

#### CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER

##### Prováveis (descobertos clinicamente)

1. Demência comprovada pelo exame clínico
2. Início de demência entre 40 e 90 anos
3. Déficits em duas ou mais esferas cognitivas
4. Deterioração progressiva da memória e outras funções cognitivas
5. Sem distúrbio de consciência
6. Inexistência de doenças que levariam a déficits cognitivos.

Definitivos(comprovados patologicamente)

1. Critérios clínicos prováveis para a DA
2. Evidência histopatológica da DA através da autópsia cerebral.

-----

Critérios de um grupo de trabalho patrocinado pelo NINCDS e ADRDA

Os pré-requisitos para um provável diagnóstico da DA devem incluir a inexistência de outras doenças sistêmicas ou neurológicas as quais podem levar a deterioração cognitiva. Felizmente a maioria das outras doenças são diagnosticadas por uma história apropriada, exame médico e neurológico além dos testes laboratoriais e o padrão da deficiência cognitiva das outras doenças demenciais difere da DA. Além do mais, outras doenças demenciais que semelhantemente a DA requerem confirmação histopatológica são muito menos comum.

A sobreposição sintomática entre DA e outras doenças demenciais é bastante problemática. As características patológicas da demência por múltiplos infartos, a segunda causa mais comum de demência são comuns na DA (MOLSA et al, 1985). As chamadas demências mistas parecem ter uma prevalência similar a demência por múltiplos infartos, mas a DA com infartos não pode ser distinguida através de critérios clínicos da demência por múltiplos infartos sem a histologia para identificar as alterações da DA (MOLSA et al, 1985).

Outra doença comum na velhice é o Parkinson. Demência na DP não é incomum e muitos pacientes com DA apresentam rigidez extrapiramidal, sugestiva de DP (MAYEUX et al, 1985; MOLSA et

al,1984)). Na autópsia muitos pacientes com DA apresentam evidências neuropatológicas de ambas doenças(DITTER & MIRRA,1987) mas somente alguns pacientes com Parkinson não possuem número significativo de placas neuríticas ou degeneração neurofibrilar(CHUI et al,1986). Outras doenças menos comum podem mimicar clinicamente a DA. A distinção antemortem entre DA e a Doença de Pick ou entre a DA e alguns casos da doença de Creutzfeld-Jacob pode ser difícil(WATSON,1979). Devido a essas razões e a alta prevalência da DA entre a população idosa, um provável diagnóstico da DA é muito válido. O diagnóstico definitivo requer confirmação histopatológica. O grupo NINCDS-ADRDA não especificou os critérios confirmatórios. Os critérios mínimos para o diagnóstico da DA foram estabelecidos posteriormente (tabela 2).

tabela 2: Critérios histológicos para diagnóstico da DA

-----

Amostras múltiplas do SNC para exame microscópico

1. Neocórtex (frontal,temporal e parietal)
- 2.outras regiões (amígdala,hipocampo, núcleos da base, substância nigra, córtex cerebelar, medula espinhal)

No neocórtex por mm<sup>2</sup> de tecido (200 x campo)

1. Para pacientes com menos de 50 anos, o número de placas e degeneração neurofibrilar deve ser de 2 a 5/campo.
2. Pacientes entre 50 e 65 anos pelo menos 8 placas por campo.
3. Pacientes entre 66 e 75 anos pelo menos 10 placas por campo.
4. Pacientes com mais de 75 anos, mais de 15 placas por campo.

---

HENDERSON(1986) e KHACHATURIAN(1985).

Se a história clínica sugere Doença de Alzheimer, os critérios histológicos podem ser considerados significativos até valores pela metade dos explícitos na tabela 2(KHACHATURIAN, 1985).

No presente, não há testes laboratoriais específicos antemortem para a DA. Entretanto, em alguns pacientes a tomografia computadorizada revela atrofia excessiva do cérebro além do que ocorre no envelhecimento normal(GADO et al,1983). A tomografia por emissão de positrons(TEP) pode determinar o fluxo sanguíneo e metabolismo cerebral(utilização de glicose): pacientes com DA apresentam metabolismo cerebral reduzido particularmente nas regiões temporais e parietais e alterações secundárias no fluxo sanguíneo cerebral(INGVAR & LASSEN,1979).

Outras possibilidades de diagnóstico antemortem da DA seria a utilização de anticorpos obtidos pela imunização com antígenos contidos nos homogenatos de cérebros de pacientes com Doença de Alzheimer. WALOSIN et al(1986) identificaram o Alz-50(anticorpo monoclonal) direcionado ao antígeno de 68.000 daltons(proteína"68 A"). A concentração da 68A é bastante elevada no cérebro e no líquido de pacientes com DA, embora possa estar em baixas concentrações em cérebros de idosos não dementes(Walosin et al,1986).

CHAPMAN et al(1988), encontraram aumento nos níveis séricos de anticorpos em pacientes portadores de DA direcionados a um antígeno de 200KD encontrado nos corpos celulares e axônios

dos neurônios eletromotores de Torpedo (neurônios colinérgicos). Esses anticorpos também podem ser detectados em controles sãos ou em pacientes com demência devido a outras causas (Doença de Parkinson e demência por múltiplos infartos), embora em proporção bem inferior aos dos pacientes com Doença de Alzheimer. Enfim, esses anticorpos podem servir como um marcador sorológico para a DA ou serem um instrumento de investigação dos mecanismos imunológicos antineuronais que podem ocorrer nessa doença.

Uma interessante técnica para o estabelecimento da DA como uma doença sistêmica seria o ensaio de ligação com os linfócitos. A ligação muscarínica e nicotínica nos linfócitos estão reduzidas na DA, mas a relação da deficiência central e periférica colinérgica ainda está por ser confirmada (RIEKKINEN *et al*, 1987).

KESSLER (1986) num relato preliminar sugeriu que os pacientes com DA possuem deficiência do fator de proliferação da CAT nos fibroblastos da pele, exemplificando outro exemplo de marcador extraneuronal para essa doença. MILLER *et al* (1981) relataram que os pacientes com doença de Alzheimer apresentavam redução das células assassinas naturais, ou seja, uma supressão imunológica. HANIN *et al* (1984) encontraram alterações na proporção de células vermelhas (eritrócitos) e do nível plasmático de colina, bem como na recaptação de colina por essas células. Em suma, há várias alternativas de marcadores periféricos, necessitando-se estabelecer a especificidade dos mesmos para a DA, uma vez que a sobreposição dessas alterações em pacientes normais podem colocar em dúvida a validade desses parâmetros.

A investigação no líquido cerebrospinal de marcadores neurofarmacológicos tem se mostrado de uso limitado para diagnosticar a doença de Alzheimer. Parece, entretanto, que patologias do SNC são pobremente refletidas no líquido cerebrospinal. Acetilcolinesterase e somatostatina são os mais bem documentados marcadores no líquor, porém são considerados apenas marcadores marginais e não específicos para a DA (RIEKKINEN, 1987).

### 1.5.3 POSSÍVEIS AGENTES ETIOLÓGICOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER

**ORIGEM GENÉTICA:** a hipótese patogênica da DA implicando um gene dominante autossômico seria uma simplificação exacerbada desse processo patológico cujas causas não estão totalmente esclarecidas. Tem sido descrito que a DA pode afetar apenas um dos gêmeos monozigóticos. Em outro estudo a DA teve seu início com diferença de mais de uma década em gêmeos monozigóticos, implicando na exposição a diferentes fatores ambientais que causam diretamente a DA ou tem um papel permissivo ou facilitador da expressão genética anormal comum entre os gêmeos.

Semelhanças entre a síndrome de Down e a doença de Alzheimer, apóiam a hipótese de HESTON (1977), GLENNER e WONG (1984), dentre outros ligando as duas entidades mórbidas ao cromossoma 21.

## TRAUMA CRÂNIO-ENCEFÁLICO

Alguns estudos indicam que o trauma crânio-encefálico está significativamente associado com o subsequente desenvolvimento da DA (MORTIMER et al., 1985). Como o trauma está envolvido no desenvolvimento histopatológico da DA não está certo, mas lesão axonal é a consequência patológica mais proeminente de um traumatismo de cabeça. Supostamente, a lesão axonal severa poderia exacerbar alterações da substância branca na fase pré-clínica da DA aumentando a probabilidade de descoberta da DA pela redução do limiar para detecção clínica ou poderia iniciar uma sequência de aberrações no citoesqueleto que talvez culminasse na acumulação de proteínas estruturais anormais (HENDERSON et al., 1989).

## AGENTES INFECCIOSOS

A predileção do vírus do herpes simples em invadir regiões do cérebro as quais são também afetadas na DA, tem alertado que essa ou outras viroses possam estar implicadas na DA (BALL, 1982). Além do mais, a degeneração neurofibrilar tem sido associada com várias doenças virais incluindo a encefalite pelo vírus do herpes simples, panencefalite esclerosante subaguda e a raiva (WISNIEWSKI et al., 1979). Os vírus teriam a capacidade de modificar o processo de transcrição do DNA, alterando o metabolismo dos neurofilamentos vistos na degeneração neurofibrilar e nas placas senis. Entretanto, não foi encontrado um vírus responsável pela DA; nem ocorre reprodução da doença com inoculação em primatas de preparações cerebrais de pacientes que morreram com doença de Alzheimer (DAVISON, 1987). A doença de Creutzfeld-Jacob, Kuru e



a síndrome de Gerstmann-Straussler são doenças neurodegenerativas humanas distintas, subagudas ou crônicas que podem ser transmitidas experimentalmente a vários mamíferos. Scrapie, uma doença que ocorre naturalmente em ovelhas, é mais comumente estudada em laboratório. Embora clinicamente heterogêneas no homem, alterações patológicas semelhantes no animal hospedeiro ocorrem após a transmissão. Os aspectos neuropatológicos incluem perda neuronal sem reação inflamatória e com intensa astrogliose. Placas amilóides, frequentemente diferente morfológica da DA, algumas vezes são vistas. Devido a abundante vacuolização observada no microscópio óptico, essas doenças são chamadas de "encefalopatia esponjiforme". Sinais de disfunção cerebelar acontecem juntamente com a demência no Kuru e na síndrome de Gerstmann-Straussler; contudo na doença de Creutzfeld-Jacob a demência é o sinal proeminente (HENDERSON et al., 1989). Os agentes infecciosos responsáveis não foram completamente caracterizados, mas pela patogenicidade parecem ser partículas pequenas filtráveis cuja infectividade não é inativada por procedimentos que degradam o ácido nucleico. Esses agentes são referidos como vírus não convencionais ou lentos. PRUSINER (1987) propôs o termo "prions" (partículas infecciosas proteínáceas) para diferenciá-los das viroses comuns.

## NEUROTOXINAS

Concentrações elevadas de alumínio e sílica (CRAPPER et al., 1976) foram encontradas em cérebro de pacientes com Doença de Alzheimer; mas ainda há controversa se essa acumulação é secundária à lesão neuronal ou se os efeitos neurotóxicos desses mine-

rais contribuem para a histopatologia da DA. No interior dos neurônios com degeneração neurofibrilar e no centro das placas senis, alumínio e sílica estão co-localizados (CANDY *et al.*, 1986). Alumínio e aluminossilicatos têm diversos efeitos sobre os neurônios e podem hipoteticamente iniciar a formação dos filamentos pareados helicoidais (FPH) ou sua acumulação. Experimentalmente a aplicação intracerebral de sais de alumínio induz mudanças neurofibrilares (CRAPPER *et al.*, 1973) com ultraestrutura e localização diferentes das que ocorrem na DA. Um mecanismo pelo qual o alumínio induz a acumulação de neurofilamentos pode ser através da interferência com o transporte axonal dos neurofilamentos, provavelmente como resultado da fosforilação excessiva dos neurofilamentos (BIZZI *et al.*, 1986). Outras evidências indicam que esses minerais estão aumentados no cérebro de pacientes com DA os quais podem exercer efeitos neurotóxicos e também estão associados com a histopatologia da DA, embora seus papéis como agentes causais ainda não estejam elucidados (HENDERSON *et al.*, 1989).

Devido sua alta concentração no SNC e seu potencial excitotóxico intrínseco, tem-se suspeitado da participação de aminoácidos (principalmente o glutamato) em doenças neurodegenerativas. Acredita-se que os neurônios do SNC podem ser particularmente vulneráveis a degeneração excitotóxica durante certos períodos do desenvolvimento e na idade avançada (OLNEY, 1990). Os análogos específicos do Glutamato (Glu) apresentam toxicidade relacionada com a potência de suas ações excitatórias e análogos sem atividade excitatória não apresentam neurotoxicidade. A lesão neuronal do Glu é devido a uma ativação excessiva dos receptores excitató-

rios na superfície dendrossômica dos neurônios (OLNEY, 1971). Um subtipo de receptor de aminoácidos excitotóxicos o N-metil-D-aspartato (NMDA) tem se tornado foco de atenção por estar envolvido em processos neuropsicológicos patológicos. A identificação de subtipos de receptores de aminoácidos excitotóxicos (AAE) baseia-se na diferente sensibilidade a diversos agonistas (N-metil-D-aspartato, ácido quisquálico, ácido kaínico) e a antagonistas que bloqueiam a ação excitotóxica dos AAE nesses receptores (HALL *et al.*; WATKINS *et al.*, 1981). Com a descoberta de antagonistas dos AAE, demonstrou-se proteção de neurônios hipotalâmicos "in vivo" em camundongos contra a ação neurotóxica do glutamato ou seu potente análogo, o NMDA (OLNEY *et al.*, 1979). Drogas anti-excitotóxicas mais poderosas são antagonistas de NMDA não competitivos que bloqueiam tanto a ação excitatória quanto tóxica do NMDA. A droga mais potente desse grupo é MK-801, desenvolvida pela Merk, Sharp e Dohme, com grande potencial terapêutico devido a boa penetração pela barreira hematoencefálica. Drogas comercializadas incluindo dextrometorfam (GOLDBERG *et al.*, 1987) e vários agentes anti-parkinsonianos (OLNEY *et al.*, 1987) são moderadamente potentes antagonistas não competitivos do NMDA. Antagonistas mistos como o ácido kinurênico e cis-2,3 piperidina descarboxilato bloqueiam os efeitos excitotóxicos tanto dos agonistas NMDA como não NMDA, mas são de pouco interesse devido a sua baixa potência e por não penetrarem a barreira HE. Um composto recente o CNQX (quinoxalinediona) tem a propriedade de bloquear os efeitos excitatórios e excitotóxicos dos agonistas não NMDA de modo mais eficaz do que dos agonistas NMDA (HONORÉ *et al.*, 1988). Certos tiobarbitúricos que pene-

tram facilmente a barreira hematoencefálica são moderadamente potente contra ambos os agonistas(OLNEY et al,1987).

Evidências correlacionando excitotoxinas exógenas a doenças paralíticas como neurolatirismo, devido a exposição crônica por período de meses ou anos a esses agentes(BOAA:b-N oxalilamino-L-alanina) levantou a possibilidade de excitotoxinas endógenas causarem degeneração neuronal de natureza crônica(por ex: Coréia de Huntington, Doença de Alzheimer ou Parkinson). Outra substância a b-N-metilamino-L-alanina:BMAA(encontrada na semente de uma planta) pode causar uma doença com características combinadas da esclerose amiotrófica lateral, parkinson e demência, encontrada originalmente na região de Guam.

Acredita-se que as excitotoxinas podem destruir os neurônios tanto por um processo agudo fulminante dependente de Na e Cl mas não de cálcio, ou por um processo lento dependente de cálcio. Uma melhor compreensão do mecanismo mais lento é necessária pois muitas desordens neurológicas humanas são decorrentes da degeneração lenta dos neurônios por um processo subagudo ou crônico.Outra possibilidade seria a ação conjunta de excitotoxinas exógenas(inclusive aquelas utilizadas como aditivos alimentares) com excitotoxinas endógenas na patogênese de condições neurodegenerativas crônicas(OLNEY,1990).

## 1.6 DOENÇA DE ALZHEIMER E O SISTEMA COLINÉRGICO

Análises do tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer revelaram níveis reduzidos da função colinérgica pré-sináptica (COLLERTON, 1986); principalmente a enzima de síntese da acetilcolina, a colina acetiltransferase como também a enzima de degradação, acetilcolinesterase (com relativa especificidade para os neurônios colinérgicos), recaptação da colina de alta afinidade estão todos deficientes na mesma extensão (50 a 90% reduzidos de acordo com a severidade do caso); enquanto em biópsia de tecido cerebral a produção e liberação de acetilcolina também estava bastante reduzida (DAVIES & MALONEY, 1976; PRICE *et al.*, 1985).

Isso sugere que pelo menos os sintomas principais da DA sejam resultados diretos do déficit da função colinérgica central. Estudos posteriores revelaram que funções intelectuais normais dependem de um nível razoável da função colinérgica. Não se pode dizer que todo paciente demente possui um déficit colinérgico. Mas a afirmativa parece correta: uma deficiência colinérgica severa sempre resulta em demência (DAVIES, 1979).

Em comparação a função colinérgica pós-sináptica, representada sobretudo pelo número de receptores, não se encontra consistentemente afetada na DA (PERRY *et al.*, 1986; MASH *et al.*, 1985). Esses resultados são importantes por duas razões:

- 1.) Os elementos que recebem inervação colinérgica no córtex cerebral e no hipocampo estão intactos, evidenciando a especificidade do prejuízo neuronal pré-sináptico.

2.) A presença de receptores pós-sinápticos normais é vital para qualquer tentativa de tratar uma disfunção colinérgica pré-sináptica.

Esses achados levaram ao desenvolvimento da hipótese colinérgica da DA. Apesar da hipótese colinérgica relegar os sinais clássicos da DA a um papel secundário e estabelecer que a disfunção colinérgica causa ou contribui para os prejuízos intelectuais, particularmente a perda da memória, tem implícita ou explicitamente norteado as pesquisas na área de Doença de Alzheimer e sistema colinérgico. Sua popularidade não está apoiada somente na possibilidade terapêutica dentro da investigação experimental, mas também por enfraquecer o niilismo terapêutico que até então predomina nas discussões. Embora haja forte evidência envolvendo a função colinérgica com a memória, não está comprovado que somente este sistema esteja envolvido com a memória, bem como há a participação do sistema colinérgico em outras funções cognitivas (COLLERTON, 1986).

Os neurônios colinérgicos centrais podem ser divididos em 3 grupos:

1- Os neurônios motores da medula espinhal e os núcleos dos nervos cranianos que compreendem o maior sistema de saída colinérgica e estão aparentemente intactos na Doença de Alzheimer.

2- Um segundo grupo encontrado no caudado e putâmen, e uma das funções dessas células é o controle motor extrapiramidal. Esse grupo não é afetado na DA, embora algumas perdas possam ocorrer no caudado tardiamente no curso da doença severa.

3-Os neurônios colinérgicos que se projetam para o córtex e hipocampo. As células do núcleo basal de Meynert com projeções para o neocórtex e amígdala e as células da área septal medial as quais juntamente com as células do núcleo vertical da banda diagonal de Broca, inervam o hipocampo (trajeto fímbria-fornix), estão bastante comprometidos na DA (COLLERTON, 1986).

Sabe-se, portanto, que o sistema colinérgico basal que consiste de um agregado de células colinérgicas grandes ao longo da superfície ventral do globo pálido e anterior a ele incluindo o núcleo basal de Meynert, a banda diagonal de Broca e o núcleo septal medial que sofrem degeneração com o curso gradativo da doença de Alzheimer (RIEKKINEN, 1987). Esses circuitos neuronais que inervam à distância as áreas cerebrais, são denominados extrínsecos e estão precocemente afetados na DA. O sistema colinérgico de neurônios intrínsecos, presentes em circuitos locais como os que são encontrados no estriado e neocórtex podem ser acometidos nos estágios mais avançados da doença (McKINNEY, 1983).

O prejuízo na memória que ocorre no desenvolvimento da DA é decorrente de lesões de células específicas que desconectam o hipocampo das fibras aferentes e eferentes corticais levando a um considerável prejuízo funcional, ou seja, tornando o hipocampo isolado de outras estruturas cruciais para a memória e o aprendizado. O córtex entorhinal (compreende a parte anterior do giro parahipocampal na parte ventromedial do lobo temporal) é uma das áreas mais seriamente afetada na DA. As lesões são específicas e focais envolvendo principalmente as camadas II e IV. Essas camadas contêm células que conectam o hipocampo com os córtices de asso-

ciação e com estruturas límbicas. A camada IV do córtex entorhinal a qual recebe projeções do hipocampo, projeta por sua vez para as áreas corticais de associação. O hipocampo e o córtex entorhinal também possuem conexões com o telencéfalo basal e amígdala, regiões essas que recebem um poderoso input de todas as áreas corticais e de muitas subcorticais (VAN HOESEN, 1985).

Há forte evidência que o hipocampo e o córtex entorhinal desempenham importante papel no aprendizado e memória. O córtex entorhinal recebe informações de aproximadamente todos os estímulos aos quais o organismo responde, tanto internamente quanto externamente. A informação é mediada para o hipocampo que pode ser considerado como uma estação de retransmissão onde há o processamento de episódios recentes na memória. O hipocampo não pode guardar as informações por um período superior talvez a 20 ou 30 minutos. Depois a informação, dependendo do tipo, é transferida através do córtex entorhinal para as várias áreas de associação. Nessas áreas de associação cortical a informação é guardada no estoque da memória (RIEKKINEN, 1987).

Apesar de sua crucial importância o hipocampo sozinho não é suficiente para assegurar a memória e outras funções cognitivas: Por outro lado, muitas áreas da memória e do aprendizado funcionam apesar da desconexão com o hipocampo, como por exemplo o aprendizado motor que é possível sem a integração com o hipocampo porque requer outras estruturas neuronais, em especial o cerebelo (o aprendizado motor é mantido na DA). Existem evidências de que as estruturas basais do telencéfalo estão envolvidas na ativação do estoque da memória em alguma parte dos córtices senso-



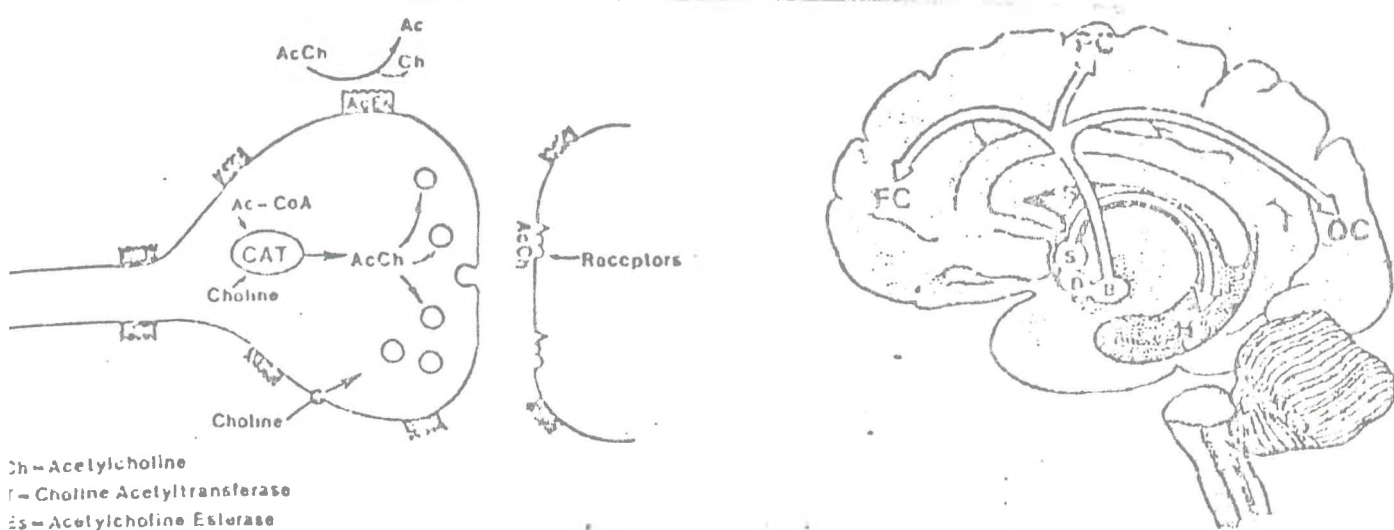
riais. O telencéfalo basal pode ser comparado a uma chave que abre a porta do estoque da memória. Sem essa chave os chamados erros de intrusão podem ocorrer onde as informações previamente aprendidas interferem no aprendizado de coisas novas. Na DA os erros de intrusão já acontecem nos estágios iniciais da doença resultante da disfunção colinérgica (RIEKKINEN, 1987). A comprovação do envolvimento do sistema colinérgico no processo da memória pode ser efetuada com a administração de drogas anticolinérgicas as quais reproduzem prejuízos de memória semelhantes aos que ocorrem no envelhecimento (BARTUS *et al.*, 1982). ROSSOR *et al.*, (1984) descartaram a possibilidade da DA ser uma exacerbação do processo normal de envelhecimento, demonstrando que a perda de noradrenalina e somatostatina que ocorre na DA não são características do envelhecimento fisiológico e há relativamente pouca alteração no sistema colinérgico com a idade. Além disso, a atividade da CAT em pessoas jovens que morreram com DA era significativamente diferente do grupo controle de velhos. Portanto, o perfil neuroquímico da DA não se assemelha ao do cérebro de pessoas idosas, não podendo ser considerada como resultado de um envelhecimento precoce.

Vale a pena mencionar o papel do glutamato no estoque da memória. Muitos neurônios glutaminérgicos parecem estar localizados nas camadas corticais III e IV. Essas camadas são as mesmas que contêm a maior quantidade de placas senis e degeneração neurofibrilar. Há alguma evidência preliminar que os níveis de glutamato estão reduzidos nessas duas camadas. Como mencionado anteriormente as projeções do input e output do córtex entorhinal são

destruídas com o desenvolvimento da Doença de Alzheimer (RIEKKINEN *et al.*, 1987); além disso essas conexões são também glutaminérgicas. Isso significa que o glutamato é também indispensável para os mecanismos da memória (LYNCH & BAUDRY, 1984).

### 1.7 MODELOS EXPERIMENTAIS DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Com a descoberta de que a transmissão colinérgica estava acentuadamente reduzida na DA, foi crucial a caracterização da inervação colinérgica cerebral, para a compreensão da possível fisiopatologia da DA. Estudos anteriores demonstraram que cortando-se a região subcortical havia redução na atividade da CAT por toda a extensão cortical. Esses achados são consistentes com a conclusão de que a inervação colinérgica cortical origina-se de neurônios localizados fora do córtex, entretanto, uma outra explicação seria que a redução da atividade enzimática seria reflexo de uma degeneração retrógrada dos neurônios colinérgicos corticais cujos axônios projetam-se para fora do córtex. Mais recentemente estudos imunocitoquímicos foram utilizados para localizar neurônios que inervam o córtex e que continham CAT. Os corpos celulares transmissores-específicos localizam-se na região basal do telencéfalo; mais precisamente, as células nervosas do núcleo basal de Meynert projetam-se basicamente para o córtex pré-frontal, frontal e parietal, enquanto o hipocampo e o córtex occipital são inervados pelos neurônios do septo medial e da banda diagonal de Broca (COYLE *et al.*, 1983)



O esquema da esquerda representa uma sinapse colinérgica. Acetilcolina (AcCh) é sintetizada a partir da colina e acetil coenzima A (Ac-CoA) pela enzima colina acetiltransferase (CAT). Acetilcolina é estocada em vesículas no terminal nervoso e é liberada na fenda sináptica após a despolarização. Difunde-se pela fenda e ativa os receptores. O término de sua ação é devido a hidrólise enzimática pela acetilcolinesterase (AcEs) localizada na superfície de neurônios colinérgicos como nos neurônios receptores da inervação colinérgica. À direita está ilustrada a inervação colinérgica cerebral. Os corpos celulares dos neurônios colinérgicos do telencéfalo basal estão localizados no núcleo basal de Meynert (B), banda diagonal de Broca (D) e núcleo septal medial (S) cujos axônios inervam o córtex cerebral incluindo o frontal (FC), parietal (PC) e occipital (OC), como também o hipocampo (H).

Fonte: Coyle, J.T., Price, D.L., DeLong, M.R. Alzheimer's disease: A Disorder of Cortical cholinergic Innervation. *Science*, v. 219, p. 1187, 1983.

A destruição do núcleo basal em ratos adultos jovens causou redução de 70% da atividade da CAT no córtex e no hipocampo, os restantes 30% da atividade enzimática representam os neurônios corticais intrínsecos (COYLE et al, 1983).

Uma abordagem útil na tentativa de reproduzir experimentalmente a DA seria lesionando regiões cerebrais envolvidas na

DA. Para evitar problemas de interpretação associados a lesões destrutivas não seletivas, análogos excitotóxicos ao glutamato (ácido kaínico e ácido ibotênico) foram injetados por métodos de estereotaxia dentro de regiões específicas do cérebro. Excitotoxinas causam destruição altamente seletiva dos corpos neuronais próximos ao sítio da injeção, poupando os axônios de passagem (COYLE *et al.*, 1983). A dificuldade experimental está na ausência de uma neurotoxina específica para neurônios colinérgicos. A descoberta da droga AF64A (íon azirídio etilcolina), uma neurotoxina colinérgica que interfere na recaptação de colina de alta afinidade, trouxe nova possibilidade de reprodução da DA. A administração do AF64A produz déficits mnésicos semelhantes à lesão do nbM, com disfunção colinérgica cortical e hipocampal. Os déficits causados por essa droga são resistentes a reversão farmacológica, podendo significar um modelo mais apropriado da DA. RIEKKINEN *et al.* (1987) também demonstraram que o tratamento por períodos prolongados com AF64A em animais experimentais causava alteração na memória. Há muita diferença entre a DA e o prejuízo causado pela lesão do nbM em relação a resposta ao tratamento farmacológico com agonistas colinérgicos e/ou inibidores da aChE. Animais com lesão no nbM respondem à manipulação farmacológica, enquanto na DA esse efeito é pouco consistente. Esses achados reforçam que a desnervação colinérgica é parte da complexa sintomatologia da DA, ressaltando a importância da influência da deficiência de fatores tróficos, resposta reduzida dos sistemas de neurotransmissores e a consequência funcional das anormalidades do citoesqueleto (SMITH, 1988).

Segundo COLLERTON(1986),os estudos a partir de lesões de células colinérgicas sobre o comportamento animal são de grande importância,dentre os motivos podemos apontar:

1.) A depressão crônica colinérgica produzida pela destruição desses neurônios transmissor-específico assemelha-se a Doença de Alzheimer.

2.)É um meio de se examinar o papel dos trajetos colinérgicos no comportamento.

3.)Nos permite estudar a função colinérgica sem os efeitos colaterais provenientes das drogas

Uma limitação do modelo experimental em roedores é que as células do nbM(fonte da inervação colinérgica cortical) não formam um núcleo como acontece nos primatas, mas ao contrário encontram-se espalhadas ao longo do globo pálido(região ventral). Portanto,a destruição de células suficientes para causar efeito na função colinérgica cortical pode incluir áreas do globo pálido.Os efeitos comportamentais observados após lesão no nbM podem ser parcialmente decorrentes da lesão colateral do globo pálido ou dependendo da técnica utilizada para lesionar a área,um rompimento das fibras de passagem(FLICKER et al,1983). FINE et al (1985), reportaram que a lesão do nbM causa tanto déficit na aquisição quanto na retenção do teste de rejeição passiva e que somente o déficit de retenção é revertido pelo enxerto de células colinérgicas no neocórtex. Então é possível que o déficit na

aquisição seja devido a fatores não colinérgicos ou pela lesão no globo pálido. Problema semelhante acontece na lesão da inervação colinérgica para o hipocampo. Se todas as vias colinérgicas são interrompidas pela lesão da fimbria-fornix, outras fibras do hipocampo também são afetadas. De outro modo, se pequenas lesões são feitas na área septal medial (asm) somente parte da inervação colinérgica é destruída. Embora os efeitos dessas lesões estejam bem caracterizados, o papel específico da inervação colinérgica para o hipocampo permanece controverso (GRAY, 1982; RAWLINS, 1985) estando claramente envolvido o sistema colinérgico hipocampal na execução de tarefas complexas (DANILOFF *et al.*, 1985; DUNNETT, 1985; GAGE *et al.*, 1984).

A supressão colinérgica também pode ser obtida utilizando-se drogas anticolinérgicas - estudos feitos em animais (DUNNETT, 1985; STEVENS, 1981; RICK *et al.*, 1981; BARTUS *et al.*, 1983) e no homem (LORIAUX *et al.*, 1985; DUNNE & HARTHEY, 1985). a grande maioria dos estudos comportamentais tem sido feita com o antagonista direto do receptor muscarínico, a escopolamina. Outras drogas anticolinérgicas usadas são: a atropina - antagonista colinérgico direto, o hemicolínio - inibidor da recaptação de colina e inibidores da CAT (COLLERTON, 1986).

Um dado curioso é a ausência de efeitos comportamentais com o uso de bloqueadores de receptores nicotínicos. Embora antagonistas nicotínicos tenham sido usados centralmente (CLARKE, 1984), seus efeitos sobre testes complexos de comportamento não são conhecidos. Tanto receptores nicotínicos quanto muscarínicos são encontrados no cérebro, contudo os receptores nicotíni-

cos são em número bastante inferior aos muscarínicos. Uma vez que o déficit colinérgico na DA é mais de natureza pré-sináptica, os sinais comportamentais da DA podem resultar da falta do input colinérgico para os receptores nicotínicos e muscarínicos (COLLERTON, 1986). Em trabalho recente (SHIMOHAMA *et al*, 1986) foi relatada uma redução por volta de 50% de receptores nicotínicos corticais, enquanto os receptores muscarínicos estavam inalterados. Os resultados experimentais com antagonistas colinérgicos mostraram que essas drogas caracteristicamente prejudicam a performance nos testes aplicados tanto no homem como nos animais.

#### 1.8 POSSIBILIDADES TERAPÊUTICAS PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA é um complexo patofisiológico que produz uma deterioração generalizada no cérebro e a deficiência colinérgica não é a única anormalidade nos cérebros portadores dessa doença. Pela definição, as características clássicas como placas senis e degeneração neurofibrilar estão sempre presentes, amiloidose cerebrovascular e degeneração granulovacuolar são geralmente encontradas e há perda celular e outras anormalidades bioquímicas em grau de extensão variável (TOMLINSON *et al*, 1984; HARDY *et al*, 1985).

A concentração de alguns neurotransmissores, dopamina, por exemplo, está variavelmente alterada (ROSSOR *et al*, 1984; HARDY *et al*, 1985). A noradrenalina está reduzida num grupo de pacientes severamente afetados pela DA e tem sido implicada nos processos cognitivos (EVERITT *et al*, 1983); enquanto outros que também estão quantitativamente reduzidos não têm papel conhecido na aprendiza-

gem, como é o caso da 5-hidroxitriptamina (BOWEN & DAVISON, 1986). De outro lado a concentração de neuropeptídeos (colecistoquinina, polipeetídeo intestinal vasoativo - VIP), GABA, encefalinas, hormônio de liberação da tireotropina estão inalterados (CANDY *et al*, 1983). Redução nos níveis de somatostatina tem sido encontrada com frequência (DAVIES *et al*, 1980; ROSSOR *et al*, 1984) e pode estar associada segundo ROBERTS *et al* (1985) com os sinais clássicos da DA. DAVIES *et al* (1982) também encontraram redução nos níveis de substância P em cérebros de pacientes portadores de DA.

ROSSOR *et al* (1984) distinguiram as alterações neuroquímicas que ocorrem na doença de Alzheimer de início precoce e tardio. Todos os déficits são mais severos nos pacientes mais jovens, enquanto os dementes com idade mais avançada (acima de 79 anos) mostram um déficit colinérgico relativamente puro, principalmente no lobo temporal e com perda adicional de somatostatina também no córtex temporal.

Na pesquisa por um tratamento efetivo da DA, a estratégia colinérgica ainda tem sido largamente empregada, uma vez que a deficiência colinérgica decorrente da degeneração nervosa parece ser crucial no déficit de memória visto na DA. Então tem sido sugerido uma terapia para a DA baseada no aumento da transmissão colinérgica (CORKIN *et al* 1981; ETIENNE *et al*, 1979; ROSSOR, 1981). Sobre isto temos o exemplo da Doença de Parkinson na qual a reposição de dopamina ameniza os sinais motores causados pela deficiência desse neurotransmissor no cérebro. Entretanto não está claro se a Doença de Parkinson seria um modelo para a Doença de Alzheimer. Enquanto a falta de dopamina cerebral é sabidamente o



ponto crítico na DP, a importância funcional da deficiência colinérgica na DA é ainda matéria de debate. Várias estratégias farmacológicas têm sido exploradas na DA incluindo a administração de precursores da acetilcolina (colina ou lecitina) (FISMAN *et al.*, 1981), inibidores da acetilcolinesterase (THAL *et al.*, 1983) para prolongar a ação da ACh na sinapse ou o tratamento com drogas colinérgicas que estimulam diretamente o receptor pós-sináptico muscarínico (HARBAUGH *et al.*, 1984). Os resultados têm sido bastante inconclusivos, embora alguns relatos indiquem pouca melhora nas funções cognitivas de pacientes no estágio inicial da doença. Uma possível explicação para a relativa falta de resposta ao tratamento farmacológico da DA em comparação com a Doença de Parkinson pode ser devido a diferenças na organização sináptica e na fisiologia desses dois sistemas neuronais.

Testes clínicos mostraram que o uso de precursores como colina ou lecitina na terapia eram praticamente ineficientes (MOSS & RODRIGUEZ, 1984). Os resultados obtidos com agonistas de receptores colinérgicos também foram igualmente desapontadores. Entretanto, uma pequena melhora na performance da memória dos pacientes portadores de DA tem sido obtida em testes clínicos com fisostigmina, um inibidor da acetilcolinesterase de curta ação que atravessa a barreira hemato-encefálica e que possui tanto efeitos centrais quanto periféricos, inviabilizando o emprego de doses mais elevadas e por períodos mais prolongados (MOSS & RODRIGUEZ, 1984).

DAVIES (1985) sugeriu que uma maior eficiência no tratamento da DA seria o aumento da transmissão colinérgica no núcleo

basal-sistema cortical sem influência sobre a transmissão normal em outras áreas. Uma área prioritária para pesquisa seria a descoberta de agentes muscarínicos seletivos para receptores da região cortical e hipocampal ou o aumento da sensibilidade desses receptores a acetilcolina. Outra possibilidade inclui a ativação dos neurônios colinérgicos do núcleo basal de Meynert na tentativa de direcionar essas células a uma liberação aumentada de acetilcolina para as regiões deficientes.

Resultados animadores têm sido conseguidos com o emprego de tetrahydroaminoacridine (THA), um ativo inibidor da colinesterase a nível central e com efeito reversível e é administrado oralmente. Os pacientes tiveram uma melhora significativa com sustentação na performance cognitiva. No presente momento, a terapia com inibidores da colinesterase parece ser o mais promissor tratamento da DA. A redução dos efeitos colaterais poderia ser alcançada com a utilização de inibidores com especificidade para o SNC. Uma outra possibilidade seria o desenvolvimento de um sistema que liberasse a droga diretamente ao SNC. Um grande avanço seria o desenvolvimento de um anticolinesterásico de longa duração e com seletividade para o SNC podendo ser utilizado na DA e em outras doenças com prejuízo na função colinérgica.

Alguns sulfonilfluoretos apresentam longa duração e são seletivos para o SNC com reduzida toxicidade, sendo, devido às suas características agentes potenciais para o tratamento da DA. Os sulfonilfluoretos são inibidores irreversíveis da enzima acetilcolinesterase ligando-se a ela covalentemente de modo semelhante aos organofosforados, sendo menos reativos e causando me-

nos efeitos colaterais.

Os dois inibidores estudados mais detalhadamente são: fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) e metanosulfonil fluoreto (MSF). Ambos produzem 90% de inibição da acetilcolinesterase cerebral com menos de 30 a 35% de inibição da enzima nos tecidos periféricos. Nos organismos vivos existe um substancial excesso da enzima. Uma inibição menor que 50% não é farmacologicamente significativa. A notável diferença na potência de inibição da acetilcolinesterase central e periférica por essas drogas é devida a alta seletividade do MSF e do PMSF pelo SNC e a velocidade relativamente baixa de síntese da enzima no SNC (MOSS & RODRIGUEZ, 1984).

Entretanto, devido a DA ser uma doença complexa a terapia anticolinesterásica por si só não seria suficiente. Um melhor resultado com agentes anticolinesterásicos poderia ser obtido quando usado com antagonistas de receptores muscarínicos M2 os quais previnem a liberação da ACh por mecanismo de feedback negativo. Similarmente os efeitos terapêuticos podem ser melhorados com agonistas de receptores muscarínicos M1 (NORDSTROM et al, 1983).

A combinação de um inibidor da acetilcolinesterase com precursores da ACh como colina ou lecitina, ou com agentes nootrópicos podem agir sinergisticamente para um significativo aumento da função cognitiva. Enfim, os agentes anticolinesterásicos teriam um efeito desejado se utilizados como adjuvantes de outros tratamentos que efetivamente bloqueassem a progressão da doença.

Contudo, não há um consenso sobre os efeitos comportamentais das drogas colinérgicas. Variações nos experimentos in-

cluindo o tipo de animal utilizado, faixa etária (no homem ou no animal), testes empregados e dose da droga, bem como a comparação dos efeitos da administração aguda das drogas com os efeitos da perda crônica da função colinérgica na DA pode de certo modo limitar as conclusões. Outra possibilidade para a falha na reposição terapêutica seria a não responsividade do sistema colinérgico às manipulações farmacológicas (DAVIS *et al*, 1982; BOWEN, 1986).

O uso de colinérgicos diretos no tratamento da DA não trouxe bons resultados. Mesmo se tivesse obtido bons resultados, essa terapia de substituição simplesmente seria capaz de reduzir os sintomas da doença e não de preveni-la. A melhor terapia seria aquela que promovesse a sobrevivência dos neurônios colinérgicos degenerados na Doença de Alzheimer.

Dentre as possibilidades terapêuticas mais promissoras estão os gangliosídeos e fatores relacionados, os quais podem facilitar a recuperação cerebral de lesões e talvez desordens neurodegenerativas. Eles elevam a plasticidade das membranas neuronais e estão funcionalmente associados com receptores do fator de crescimento. Administrado parenteralmente o gangliosídeo GM1 tem possibilitado a prevenção da degeneração e promovido a recuperação de lesões colinérgicas em animais experimentais (SOFRONIEW *et al*, 1986).

Nos últimos anos, evidências indicam que a sobrevivência de neurônios durante o desenvolvimento é influenciada por proteínas chamadas fatores neurotróficos.

O NGF (fator de crescimento neuronal) afeta a sobrevivência e a função de neurônios simpáticos e sensoriais periféri-

cos (GREENE & SHOOTER, 1980). Outros fatores neurotróficos têm sido caracterizados os quais influenciam a sobrevivência e função de neurônios parassimpáticos, neurônios colinérgicos motores, células da retina e uma subpopulação de neurônios sensitivos. Esses achados sugerem que grupos de neurônios requerem a presença de fatores neurotróficos específicos para a sobrevivência e manutenção de suas funções (HEFTI & WEINER, 1986).

Baseado nesse conceito, Appel (1981) formulou uma hipótese geral propondo que a falta dos fatores neurotróficos é responsável pela degeneração de população específica de neurônios observada na Doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e Doença de Alzheimer e que a aplicação do correspondente fator neurotrófico preveniria a degeneração neuronal (HEFTI & WEINER, 1986).

Evidências apontam que o fator neurotrófico mais bem caracterizado, o NGF está envolvido na função de neurônios colinérgicos do telencéfalo basal. Essa hipótese do envolvimento da falta do NGF na patogênese da DA levou a um rápido progresso na elucidação do papel do NGF nas funções colinérgicas centrais.

O NGF é uma proteína cuja sequência de aminoácidos é conhecida - B-NGF é a molécula ativa contida num grande complexo proteico. O gene codificador do NGF foi recentemente sequenciado e clonado e sua organização elucidada.

O NGF tem sido extensivamente caracterizado como fator neurotrófico específico para neurônios periféricos simpáticos (GREENER & SHOOTER, 1980). Ele é essencial para o desenvolvimento e função dessas células. O NGF é sintetizado pelos tecidos-alvo

dos neurônios simpáticos e age em receptores específicos localizados nesses neurônios. Esses receptores são mediadores de ações locais do NGF e a internalização dos mesmos inicia um transporte retrógrado para o corpo celular do neurônio simpático. No corpo celular estimula a síntese de proteínas essenciais.

Além de ser um fator neurotrófico para neurônios periféricos catecolaminérgicos, o NGF também influi em neurônios peptidérgicos do sistema sensorial periférico. Outros neurônios do sistema nervoso periférico parecem não ser influenciados. Os achados de vários estudos demonstraram que o NGF não afeta os neurônios catecolaminérgicos centrais (THOENEN & BARDE, 1980).

HEFTI & WEINER (1986) relacionaram algumas evidências que confirmam a influência do NGF sobre os neurônios colinérgicos centrais:

- O NGF e seu RNAm codificador estão presentes em cérebro de ratos e ambos se correlacionam com a distribuição dos neurônios colinérgicos.
- O RNAm é somente detectável no hipocampo e no córtex, sugerindo que o NGF no cérebro é produzido pelas células alvo dos neurônios de modo semelhante ao sistema periférico simpático.
- Os neurônios colinérgicos centrais contêm receptores para o NGF pois quando o NGF é injetado nas áreas-alvo dos neurônios colinérgicos (hipocampo e córtex) é recaptado pelo terminal nervoso e transportado para os corpos celulares localizados no telencéfalo basal e não para outros corpos celulares que projetam para essas áreas.

- O emprego de anticorpos monoclonais em cérebro de rato causou precipitação da proteína receptora de NGF com localização no septo e núcleo basal.
- O NGF tem influência trófica nas células colinérgicas.
- Em estudos com animais vivos ou em culturas de células, o NGF provoca elevação da atividade da colina acetiltransferase (CAT).
- Anticorpos contra NGF claramente reduziram o número de células colinérgicas e a densidade de suas fibras.

Quando os neurônios colinérgicos que inervam o hipocampo são destruídos e partes de gânglio simpático embrionário implantadas no local da lesão, as fibras simpáticas inervam o hipocampo ocupando o mesmo local anatômico previamente ocupado pelas fibras colinérgicas. Na ausência do implante do gânglio simpático, as fibras simpáticas associadas com os vasos sanguíneos do cérebro crescem em direção ao hipocampo no trajeto das fibras colinérgicas, enquanto lesões de outros sistemas neuronais não causam esse tipo de resposta. Esses fenômenos sugerem que tanto os neurônios simpáticos periféricos quanto os neurônios do telencéfalo basal respondem ao mesmo fator neurotrófico.

Em experimentos com ratos lesionando as fibras do septo que inervam o hipocampo resultaram na perda do transporte retrógrado do NGF e portanto, na degeneração neuronal a qual pode ser prevenida pelo fornecimento exógeno de NGF exógeno que então se ligaria aos receptores localizados nos corpos celulares ou nos processos remanescentes. O NGF é capaz de promover a sobrevivência de neurônios colinérgicos em animais com lesão do trajeto colinérgico ascendente similar a DA em humanos, e esse efeito na

sobrevivência dessas células está associado com a melhora na habilidade do animal em executar uma tarefa.

#### IMPLICAÇÕES DO NGF NA DOENÇA DE ALZHEIMER

Dada a importância do papel do NGF na função das células colinérgicas, parece que a falta do NGF ou uma resposta reduzida a ele possam causar a degeneração nervosa. Esses achados suportam a possibilidade do NGF estar envolvido na patogênese da DA. Outras possíveis causas além da falta do NGF incluem a toxicidade química seletiva aos neurônios colinérgicos ou a carência de nutrientes essenciais para a sobrevivência desses neurônios. Outros fatores neurotróficos também podem influenciar as células colinérgicas. Além do mais a perda de neurônios colinérgicos pode refletir uma degeneração secundária à atrofia das áreas-alvo-o córtex cerebral e o hipocampo(HEFTI & WEINER,1986).

Apesar de não existir tratamento específico para a DA a utilização do NGF apresenta limitações como sua administração intracerebral e a pouca disponibilidade desse composto. Efeitos benéficos do NGF podem ser obtidos nos estágios iniciais da DA pela possibilidade de retardo da degeneração dos neurônios colinérgicos remanescentes, fortalecendo sua estrutura morfológica e aumentando a síntese do neurotransmissor e, portanto prevenindo a progressão da doença. Nos estágios avançados quando os sistemas colinérgicos estão quase completamente degenerados o emprego do NGF é ineficiente(HEFTI & WEINER,1986). Tentativas devem ser feitas no sentido de desenvolver drogas que mimetizam a ação do NGF nos seus receptores ou que potencializam os efeitos do NGF endó-



geno. Porém deve ser lembrado que terapia dessa natureza somente terá efeito se a hipótese colinérgica da DA for provada correta.

## OBJETIVOS

### GERAL:

- Fazer um estudo comparativo das alterações no sistema colinérgico central em cérebros de pacientes dementes e controles.

### ESPECÍFICOS:

- Determinar a densidade de receptores colinérgicos muscarínicos em seis áreas cerebrais (giro pré-central, giro pós-central, hipocampo, núcleo caudado, núcleo lentiforme e substância inominada), empregando como ligante 3H-NMS.
- Dosar a atividade acetilcolinesterásica nas áreas cerebrais estudadas.
- Quantificar a concentração proteica das regiões cerebrais estudadas.
- Detectar alterações (placas senis e degeneração neurifibrilar) através do estudo histopatológico do tecido cerebral.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. PACIENTES

Os pacientes incluídos neste estudo foram oriundos de um asilo de idosos na cidade de Fortaleza - Ce, cujo período de internamento variava de poucos meses a vários anos, geralmente pertencentes a classe social baixa, com estado de hidratação e nutrição deficientes. O uso de medicamentos por esses pacientes era feito de modo esporádico, consistindo de antibióticos, analgésicos, vitaminas e tranquilizantes. Os pacientes em uso de neurolépticos ou drogas com propriedades anticolinérgicas além daqueles com patologias manifestas do SNC foram excluídos do presente estudo.

Os pacientes dementes (n=6) eram de ambos os sexos com faixa etária de 65 a 95 anos ( $81.6 \pm 7.7$ ). O tempo médio para retirada dos cérebros após a morte foi de  $12 \pm 6.4$  horas. Os 15 pacientes controles de faixa etária semelhante aos dementes (69-102 anos) foram originários do Hospital Universitário cuja causa mortis não envolvia o SNC. Alguns controles eram do asilo pois não apresentavam alterações em suas funções cognitivas.

Os cérebros autopsiados foram estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , transcorrendo um tempo máximo para utilização nos ensaios de 14 meses após a autópsia. O peso dos cérebros dos pacientes dementes variou de 880 a 1100 g.

Foram estudadas seis áreas cerebrais (giro pré-central, giro pós-central, hipocampo, núcleo caudado, núcleo lenti-

forme e substância inominada) a fim de se determinar a densidade de receptores muscarínicos colinérgicos, sua afinidade pelo ligante utilizado e a atividade da enzima de degradação da acetilcolina, a acetilcolinesterase.

### 3.2. TESTES DE "SCREENING"

O diagnóstico de demência foi baseado na aplicação do teste IMC- Informação, Memória e Concentração, adaptado por Viana et al, 1988 e do Set test (ISAACS & KENNIE, 1973)

O teste IMC (HACHINSKI et al, 1975) comumente utilizado em países desenvolvidos, foi por nós modificado a fim de atender a algumas características sócio-econômicas e culturais de ordem local. O IMC modificado se constitui de uma série de questões, adaptadas às condições locais, a serem inquiridas ao idoso. São 30 questões com somatória final de pontos igual a 37; sendo 14 pontos sobre informações pessoais e ambientais, 8 pontos sobre memória remota, 9 pontos sobre memória recente e 6 pontos referentes à concentração. Escores variando de 1 a 5 são atribuídos às questões corretamente respondidas. Quanto mais alto o escore, menor o grau de demência. Pacientes com escore inferior a 17 pontos eram considerados dementes para efeito de computação dos dados.

O Set test é composto de quatro itens onde o paciente deverá citar 10 nomes de cores, frutas animais e de cidades. Cada resposta corresponde a um ponto, com somatório final de 40 pontos. Valores inferiores a 15 são 90% coincidentes com o diagnós-

tico clínico de demência. Valores entre 15 e 24 pontos apresentam baixa correlação com o estado demencial e valores acima de 24 pontos são considerados normais.

Além dos testes citados a avaliação neurológica dos pacientes e o estudo histológico e bioquímico de regiões cerebrais nos permitiram, com segurança, o diagnóstico de demência.

Para o exame neurológico foram considerados parâmetros como alterações na memória recente, orientação no tempo e no espaço, linguagem (compreensão e expressão), capacidade de abstração e humor. Para o diagnóstico clínico de demência foi dada ênfase às alterações de memória e capacidade de abstração.

### 3.3. ANÁLISE HISTOLÓGICA

O estudo histológico de algumas áreas cerebrais (córtex frontal, temporal e parietal) foi feito pelo método de Cajal (1908) baseado na impregnação pela prata para visualização a nível de microscópico óptico de alterações neurofibrilares do tecido nervoso.

Técnica de Cajal De-Castro modificada (Bruno, José Afonso - Tese de doutorado - USP, 1979):

1. O tecido cerebral era fixado durante 24 horas e depois lavado em água corrente por 12 horas.

FIXADOR - solução estoque:

álcool 95%.....200 ml

água destilada.....200 ml

hidrato de cloral.....12 g

ácido nítrico.....6 ml

2. Em seguida era transferido para uma solução álcool-amoniaca, permanecendo durante 12 horas. (Álcool absoluto 50 ml - Amoniaco 2 gotas).

3. Lavagem em água destilada, agitando levemente, por aproximadamente 5 minutos.

4. O tecido era transferido para um novo frasco com solução aquosa de AgNO3 a 2% onde permanecia de 3 a 5 dias, em estufa a 37°C.

5. Lavagem em água destilada, agitando levemente durante 1 a 2 minutos, para retirar o excesso de sais de prata.

6. Depois, deixava-se o tecido em solução redutora à temperatura ambiente por 12 horas.

Solução redutora:

- ácido pirogálico.....0.5 g
- formol p.a. neutro.....5 ml
- água destilada q.s.p.....50 ml

7. Desidratação normal em série de álcoois, benzol e inclusão em parafina.

3.4 DISSECÇÃO DAS ÁREAS CEREBRAIS

Com o encefalótomo faz-se a separação dos hemisférios cerebrais e logo em seguida, procede-se uma incisão na face medial em direção a face lateral, a partir de uma linha imaginária que passe através da base da lâmina terminal, dos dois terços in

feriores da adesão intertalâmica, do esplenium do corpo caloso e do sulco inferior do pré-cuneos. As partes são separadas após incisão e toma-se a que está relacionada com a base do hemisfério, efetuando a dissecação da SUBSTÂNCIA INOMINADA localizada ventralmente ao globo pálido, posteriormente à substância perfurada anterior, lateralmente a área olfatória e medialmente à comissura anterior.

Aproveitando a incisão foi feita a abordagem pela face inferior do corte do NÚCLEO LENTIFORME (GLOBO PÁLIDO E PUTÂMEN) e pela face superior, do NÚCLEO CAUDADO cuja cabeça algumas vezes era acompanhada da cauda que era visualizada através da abertura da luz do ventrículo lateral.

A dissecação do HIPOCAMPO foi feita penetrando-se através do sulco do hipocampo e afastando o giro parahipocampal. A estrutura era retirada na sua totalidade. Os GIROS PRÉ e PÓS-CENTRAL foram retirados após sua identificação na face convexa (lateral) do hemisfério cerebral, localizados, respectivamente, na região anterior e posterior ao sulco central

### 3.5. DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS

A densidade de receptores muscarínicos foi obtida pela técnica de BINDING (DOMBROWSKY *et al.*, 1983), utilizando-se como ligante a 3H-NMS (N-metil-escopolamina tritiada) na concentração de 23.52nM, um antagonista colinérgico específico.

O tecido cerebral humano foi homogeneizado manualmente, numa concentração final de 10% (p/v) em solução tampão de fosfato de sódio 150mM, pH 7.4.

Às alíquotas de 10ul do homogenato adicionou-se a 3H-NMS, na concentração final de 4.704nM e a ligação inespecífica foi determinada na presença de 12.5uM de sulfato de atropina. O volume final do ensaio foi completado para 200 ul com tampão fosfato de sódio. A ligação específica era obtida da subtração da ligação total do branco (ligação inespecífica). A atropina empregada em concentração elevada é capaz de deslocar a 3H-NMS dos sítios de ligação dos receptores muscarínicos, sendo a radioatividade lida no cintilador referente às ligações inespecíficas. Os homogenatos na presença dos dois ligantes realizados em triplicatas e duplicatas respectivamente foram incubados em banho-maria durante 30 minutos a 37°C e depois filtrados em microfiltros de fibra de vidro (Whatman GF/B, 2.5 cm de diâmetro) sob vácuo, foram lavados 3 vezes com 3 ml de solução de cloreto de sódio a 0,9% gelada, secos em estufa a 60°C por duas horas e então colocados em frascos contendo 3 ml de coquetel de cintilação. Em seguida, foram deixados em repouso por 2 horas e levados para determinação da radioatividade em um contador de cintilação líquida com eficiência média de 25.5%.

A densidade máxima de receptores (Bmax) foi expressa em fmoles/mg de proteína da área cerebral estudada e o Kd em nM representa a constante de dissociação no equilíbrio. Ambos os dados foram obtidos pelo método de Eadie Hofstee, dito Scatchard reverso (BURT, 1981), que transforma a hipérbole retangular, dada pela curva de saturação dos receptores em função da concentração do ligante, em uma linha reta, onde a intersecção no eixo da abcissa fornece o valor de Bmax e o inverso da inclinação da reta



correponde ao  $K_d$ . As concentrações de ligante utilizadas para calcular esses dados variavam de 0,118 nM a 9,408 nM.

### 3.6.DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ACETILCOLINESTERÁSICA

Foi utilizado o método de ELLMAN *et al*(1960) com grande sensibilidade a pequenas quantidades da enzima. Esse método baseia-se na velocidade de degradação da acetiltiocolina utilizada como substrato a enzima acetilcolinesterase contida no homogenato de tecido cerebral, dando como produtos a tiocolina e acetato. A tiocolina ao reagir com ditiobisnitrobenzoato (DTNB) produz uma reação de cor amarela cuja intensidade é proporcional a concentração da enzima. A leitura da absorvância é realizada em espectrofotômetro num comprimento de onda de 412 nm.

A atividade enzimática foi expressa em nmoles de acetiltiocolina hidrolizada/mg de proteína/minuto. O branco consistiu do homogenato a 10%, tampão fosfato de sódio pH 8.0 e o DTNB utilizados para zerar o aparelho. Quando da adição do substrato (acetiltiocolina) fazia-se o registro dos valores da absorvância utilizados para calcular a atividade da enzima.

### 3.7.DOSAGEM DE PROTEÍNA

Foi empregado o método de LOWRY *et al*,1951 para determinação da concentração proteica. Este método emprega duas reações de cor para analisar a concentração proteica fotometricamente num comprimento de onda de 750nm. Inicialmente é feita uma reação biureto de baixa eficiência na qual os íons de cobre alcalino produzem uma reação azulada na presença de ligações peptídicas.

cas. Esta cor biureto é característica de todas proteínas e fornece uma cor básica de fundo para a próxima etapa do ensaio. Depois, o método emprega uma mistura complexa de sais inorgânicos, o reagente Folin-Ciocateau que produz uma cor verde azulada intensa na presença de tirosina e triptófano livres ou ligados a proteína. A intensidade da cor da reação é proporcional a concentração de proteína. A determinação da concentração proteica (expressa em mg/g de tecido) dos homogenatos cerebrais a 10% foi feita em triplicata e o branco correspondeu a leitura dos reagentes na ausência de proteína. Utilizou-se como padrão a albumina sérica bovina.

### 3.8. SOLUÇÕES E APARELHOS UTILIZADOS

#### SOLUÇÕES:

- . N-metil-escopolamina (3H-NMS) 85Ci/nmol, New England Nuclear, Boston, MA, EUA.
- . Sulfato de atropina, Sigma, St. Louis, MO, EUA.
- . Tampão Fosfato de Sódio:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ , Reagen, Rio de Janeiro, Brasil.
- . Coquetel de cintilação: 0.5g de p-bis-2-(5-feniloxazolil)benzeno, POFOP. Sigma, St. Louis, Mo, EUA. O volume foi completado para 1000ml de tolueno p.a. (Beckman, Fullerton, Ca, EUA).
- . Solução iodeto de acetiltiocolina (ATC), Sigma, St. Louis, MO, EUA.
- . Solução do ácido 5:5 ditiobis-2-nitrobenzoato (DTNB), Sigma, St. Louis, MO, EUA.
- . Reagente A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Reagen, Rio de Janeiro, Brasil a 2% em 0.1 N NaOH, Reagen, Rio de Janeiro, Brasil.

. Reagente B:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a 0.5% em  $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , Grupo Química, Rio de Janeiro, Brasil a 1%.

. Reagente C: solução de cobre alcalina (24ml do reagente A com 1ml do reagente B, misturados no momento de usar)

. Reagente Folin-Ciocalteu-fenol (Laborclin, Piraquara, PR, Brasil; 1:1 em água bidestilada).

#### APARELHOS

. Banho-maria, FANEM, São Paulo, SP, Brasil.

. Aparelho de Millipore para filtração à vácuo, Bedford, MA, EUA.

. Contador de cintilação líquida (LS-100, Beckman), Fullerton, CA, EUA.

. Balança analítica (modelo H5), Metler, Suíça.

. Espectrofotômetro (modelo DU Beckman), Fullerton, CA, EUA.

#### 3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos empregados para comparação dos dados foram o Teste t de Studente correlação, com o auxílio do microcomputador da RadioSchack, USA.

TESTE DE INFORMAÇÃO-MEMÓRIA E CONCENTRAÇÃO

	Grau
Nome.....	1
Hora.....	1
Dia.....	1
Dia da semana.....	1
Data.....	1
Mês.....	1
Estação(Chuvvas).....	1
Ano.....	1
Local.....	1
Nome.....	1
Rua.....	1
Cidade.....	1
Tipo de Lugar.....	Residência ou Hospital 1
Reconhecimento das Pessoas.....	2
<b>Memória</b>	
Data de Nascimento.....	1
Lugar de Nascimento.....	1
Escola que frequentou(Grau de aprendizado).....	1
Ocupação.....	1
Nome dos irmãos.....	1
Nome da esposa(o).....	1
Nome de qualquer cidade em que viveu ou trabalhou.....	1
Nome de patrões.....	1
<b>Impessoais</b>	
Cidade do Pe. Cícero.....	1
Nome do dinheiro(cruzeiro ou cruzado) ou data da grande seca do Ceará(1915).....	1
Nome da médica.....	1
Nome da cozinheira.....	1
Nome e endereço-José da Silva - Rua das Rosas n. 4 (relembra após cinco minutos).....	5
<b>Concentração</b>	
Meses do ano que já passaram.....	2
Contar de um a vinte.....	2
Contar de vinte a um.....	2

SET TEST

---

SETS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

---

CORES

ANIMAIS

FRUTAS

CIDADES

---

#### 4. RESULTADOS

Na tabela 1 estão relacionados os pacientes submetidos aos testes de screening (IMC e SET test), todos pertencentes a mesma faixa etária e internos em um asilo na cidade de Fortaleza-Ce. O valor máximo para o teste de Informação, Memória e Concentração é de 37 pontos e para o SET test 40 pontos. Valores abaixo de 17 pontos para o teste IMC ou de 15 pontos para o SET test são fortemente indicativos de déficit cognitivo. Os pacientes investigados foram avaliados neurologicamente com diagnóstico provável de demência do tipo Alzheimer. Dos pacientes entrevistados, 100% tiveram seus escores para o teste IMC (média 12.6 pontos) sugestivos de demência enquanto para o SET test (média 16.7 pontos) somente 42.8% dos pacientes seriam considerados dementes. Diante deste fato consideramos que o teste IMC apresenta maior consonância com o quadro clínico do paciente.

Em um estudo anterior Viana *et al* (1988), analisaram a eficiência dos testes de screening em 71 idosos de um asilo na cidade de Fortaleza-Ce, determinando a especificidade e seletividade dos respectivos testes. Os resultados obtidos foram então, confrontados com o exame clínico e neurológico desses pacientes. O teste IMC mostrou ser bastante válido e preciso, com os menores índices de falso-positividade e/ou falso-negatividade. Os valores mostraram grande concordância entre o diagnóstico de demência detectado pelo teste IMC (52.1%) e aquele obtido pelo exame neurológico (50.7%).

As figuras 1 e 2 mostram, respectivamente, o número de

TABELA 1

Resultados dos testes de screening aplicados aos idosos de um asilo em Fortaleza - CE, diagnosticados clinicamente como dementes.

Paciente	idade	sexo	testes de screening	
			IMC	SET
1	81	F	15	06
2	80	F	11	18
3	73	F	04	30
4	94	F	13	10
5	87	F	13	11
6	85	F	17	17
7	83	F	17	13
8	69	M	10	08
9	85	F	07	00
10	87	F	14	32
11	87	F	18	27
12	95	F	13	22
13	86	F	10	17
14	77	F	15	23

Valores máximos IMC=37 pontos  
SET=40 pontos

receptores muscarínicos e a atividade acetilcolinesterásica em função da idade em hipocampo de pacientes incluídos nesse estudo. Não houve correlação em ambos os casos. Também não encontramos correlação no número de receptores e atividade enzimática versus a idade nas demais áreas analisadas: giro pré-central, giro pós-central, núcleo caudado, núcleo lentiforme e substância inominada (dados não apresentados).

Os valores comparativos da densidade de receptores muscarínicos em seis áreas cerebrais de pacientes dementes e controles estão na tabela 2. Foi empregado como ligante o antagonista muscarínico 3H-NMS. Os resultados foram significativos apenas em duas áreas: hipocampo e substância inominada. O aumento de receptores muscarínicos foi da ordem de 28.8% e de 93% no hipocampo e na substância inominada respectivamente no grupo demente em relação ao controle.

Nas demais áreas estudadas (giro pré-central, giro pós-central, núcleo caudado e núcleo lentiforme) houve nítida tendência de aumento nos receptores muscarínicos do grupo demente em relação ao controle, embora esses dados não tenham sido significantes do ponto de vista estatístico.

O núcleo caudado foi a área mais rica em receptores colinérgicos muscarínicos, seguido do núcleo lentiforme no grupo controle e da substância inominada no grupo demente. No grupo controle a menor densidade de receptores foi encontrada no hipocampo, a seguir nos giros pré e pós-central; enquanto que no grupo demente o menor valor correspondeu ao giro pré-central seguido do hipocampo e do giro pós-central. A relação do número



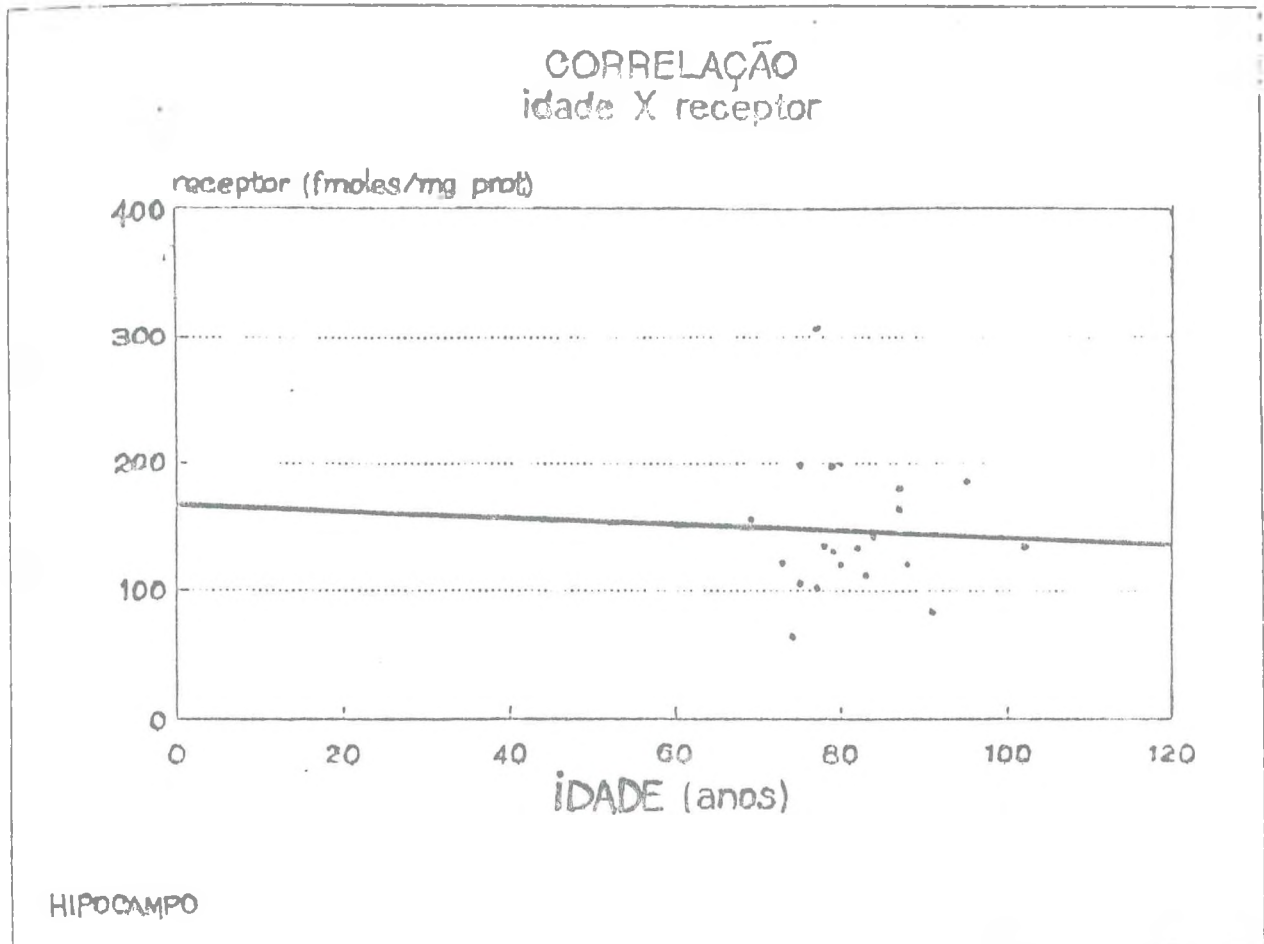
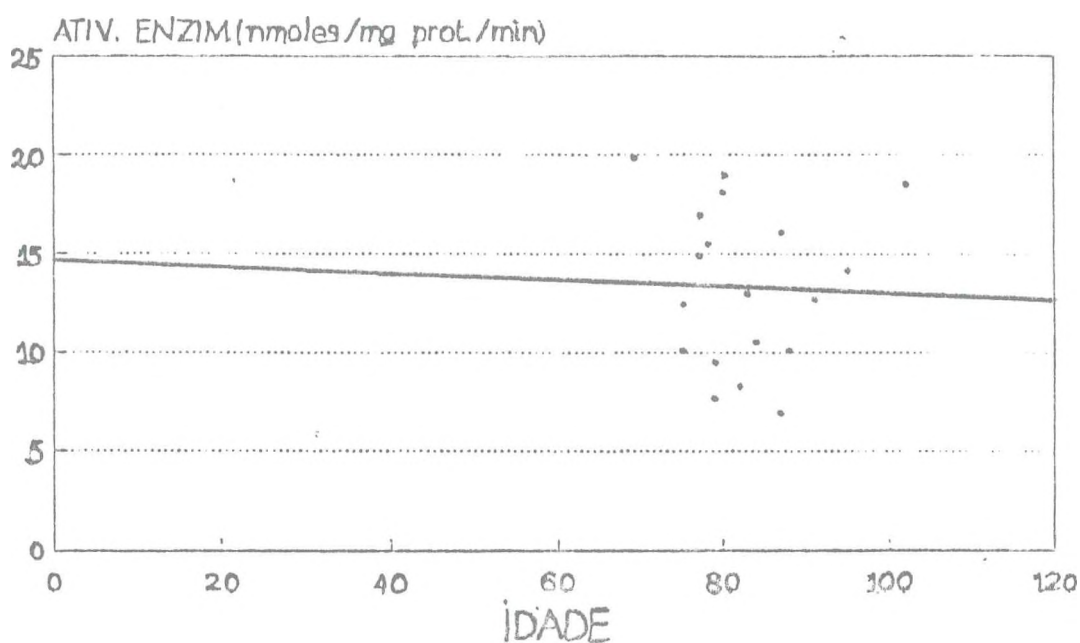


Fig 1: Correlação entre idade e número de receptores muscarínicos em hipocampo de pacientes (n=21) com idade variando de 69 a 102 anos. Observa-se que não houve correlação ( $r=0.03$ ) entre essas duas variáveis.

## CORRELAÇÃO IDADE x ATIVIDADE ENZIMÁTICA



HIPOCAMPO

Fig 2: Correlação entre idade e atividade acetilcolinesterásica em hipocampo de pacientes (n=19) com idade variando de 67 a 102 anos. Observa-se que não houve correlação ( $r=0.04$ ) entre essas duas variáveis.

TABELA 2

Densidade de receptores muscarínicos colinérgicos marcados com  $H^3$ -NMS em seis áreas cerebrais de pacientes dementes e controles.

GRUPOS	Binding com $H^3$ -NMS (fmoles/mg proteína)					
	A	B	C	D	E	F
controle	152.6 +11.61 (15)	152.8 +12.55 (15)	127.8 +9.66 (15)	381.3 +40.48 (12)	228.3 +27.57 (15)	186.1 +23.54 (12)
demente	158.1 +17.60 (6)	171.0 +10.50 (6)	164.7* +12.89 (5)	366.4 +26.69 (6)	261.9 +13.02 (6)	359.4** +35.95 (5)

Os valores representam média  $\pm$  EPM do número de pacientes entre parênteses. \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ .

A - giro pré-central

B - giro pós-central

C - hipocampo

D - núcleo caudado

E - núcleo lentiforme

F - substância inominada

de receptores encontrados no núcleo caudado e no hipocampo foi 3.0 vezes maior no grupo controle e 2.2 vezes no grupo demente.

A figura 3 mostra as alterações percentuais no número de receptores muscarínicos do grupo demente em relação ao controle, considerado 100%. Houve aumento significativo nos receptores muscarínicos do hipocampo(28.8%) e da substância inominada(93%), e um pequeno aumento de 14.7% no núcleo lentiforme. As demais áreas não diferiram do controle.

Nas figuras 4 e 5 estão representadas as curvas de saturação em hipocampo de paciente controle e demente respectivamente. Foram utilizadas concentrações crescentes do ligante até a saturação com 4.704nM. Os valores do binding em CPM(cintilações por minuto) são proporcionais ao número de receptores e encontram-se mais elevados no paciente demente, traduzindo assim, uma maior densidade de receptores muscarínicos. De modo semelhante ao hipocampo, na substância inominada a saturação foi obtida com 4.704 nM do ligante e os valores no paciente demente foram superiores ao do paciente controle(fig. 6 e 7).

A figura 8 representa o Scatchard plot utilizando a substância inominada de paciente demente e controle. A intercepção no eixo da abscissa representa o B<sub>máx</sub>(densidade de receptores muscarínicos). O B<sub>máx</sub> do paciente demente foi de 396 fmoles/mg de proteína enquanto do controle foi de 255 fmoles/mg de proteína, evidenciando aumento consistente de receptores na substância inominada do paciente demente em relação ao controle.

## RECEPTORES MUSCARÍNICOS fmols/mg proteína

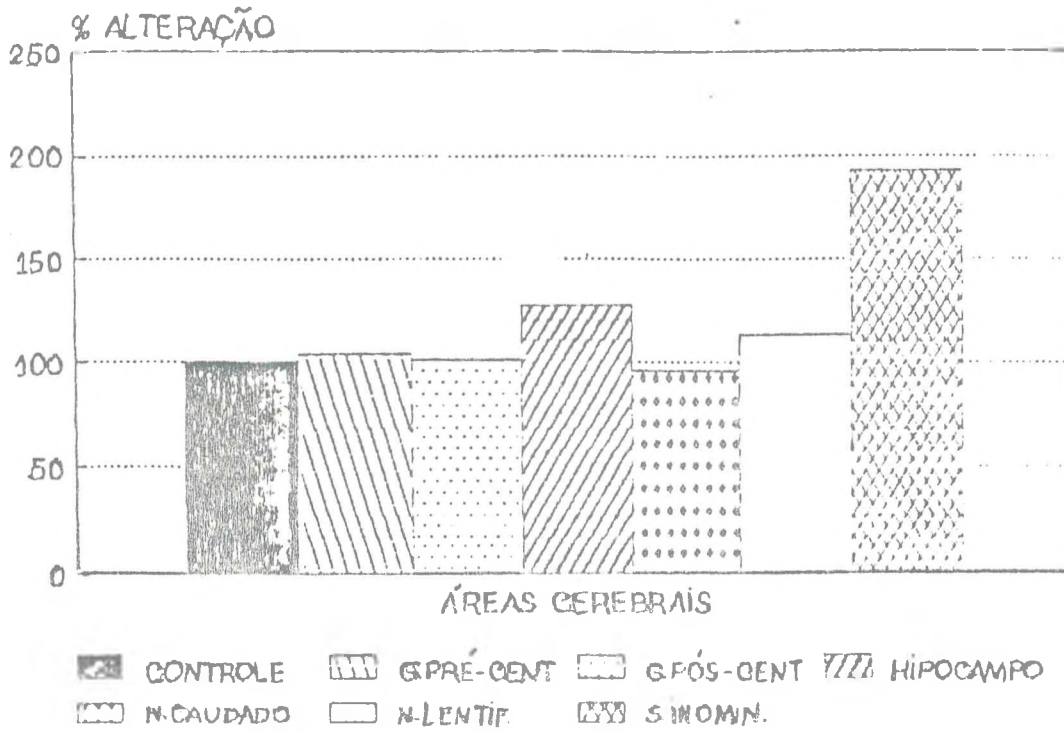


Fig. 3: Histograma representativo das alterações percentuais ocorridas no número de receptores muscarínicos nas seis áreas cerebrais estudadas do grupo demente em relação ao controle.

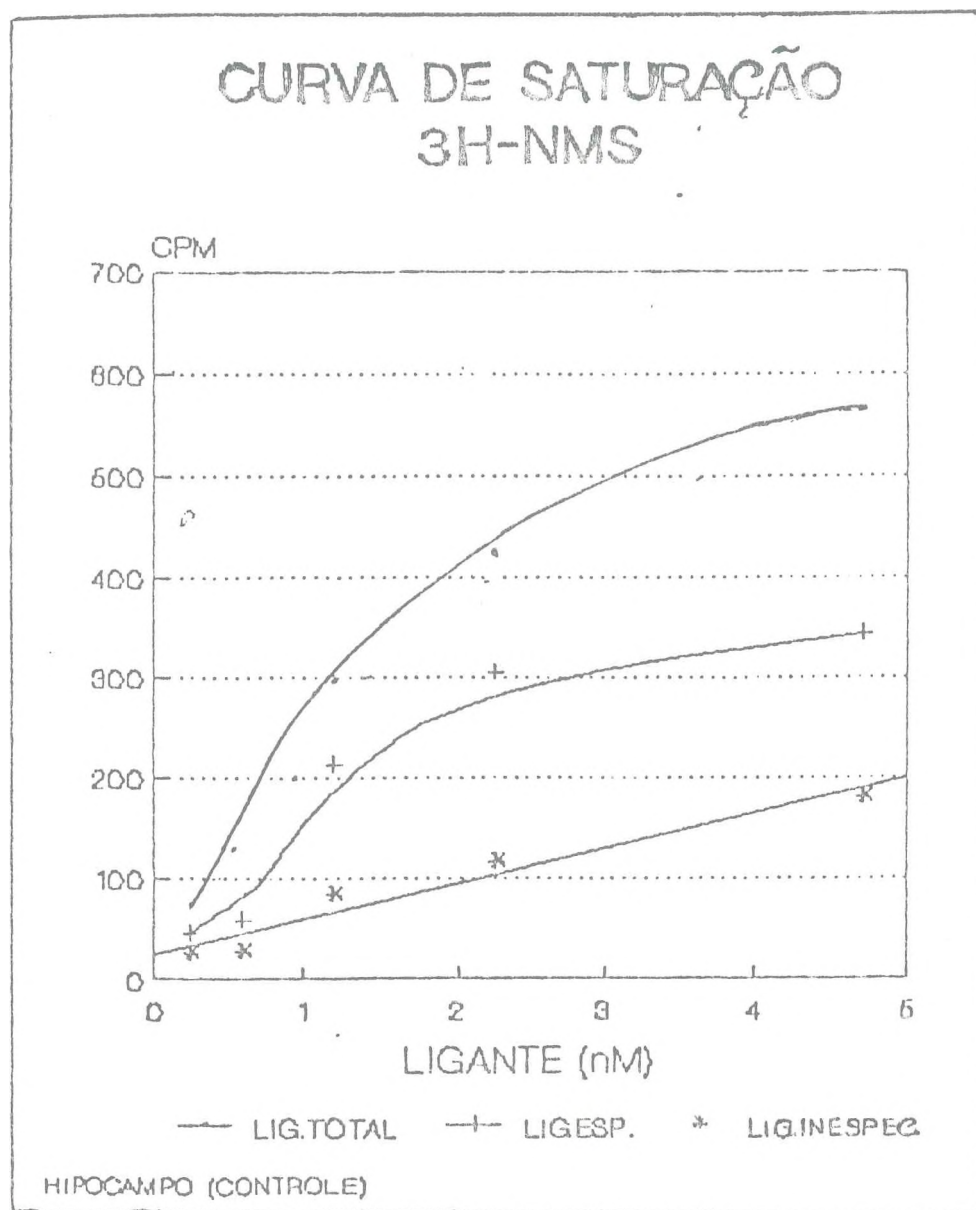


Fig 9: Scatchard plot utilizando-se  $^3\text{H-NMS}$  com concentração variando de 0.118 a 4.704 nM em hipocampo de paciente demente e controle.

$B_{\text{máx}}(\text{demente}) = 258.9$  fmoles/mg de proteína e  $K_d = 0.80$  nM

$B_{\text{máx}}(\text{controle}) = 174.15$  fmoles/mg de proteína e  $K_d = 1.69$  nM.

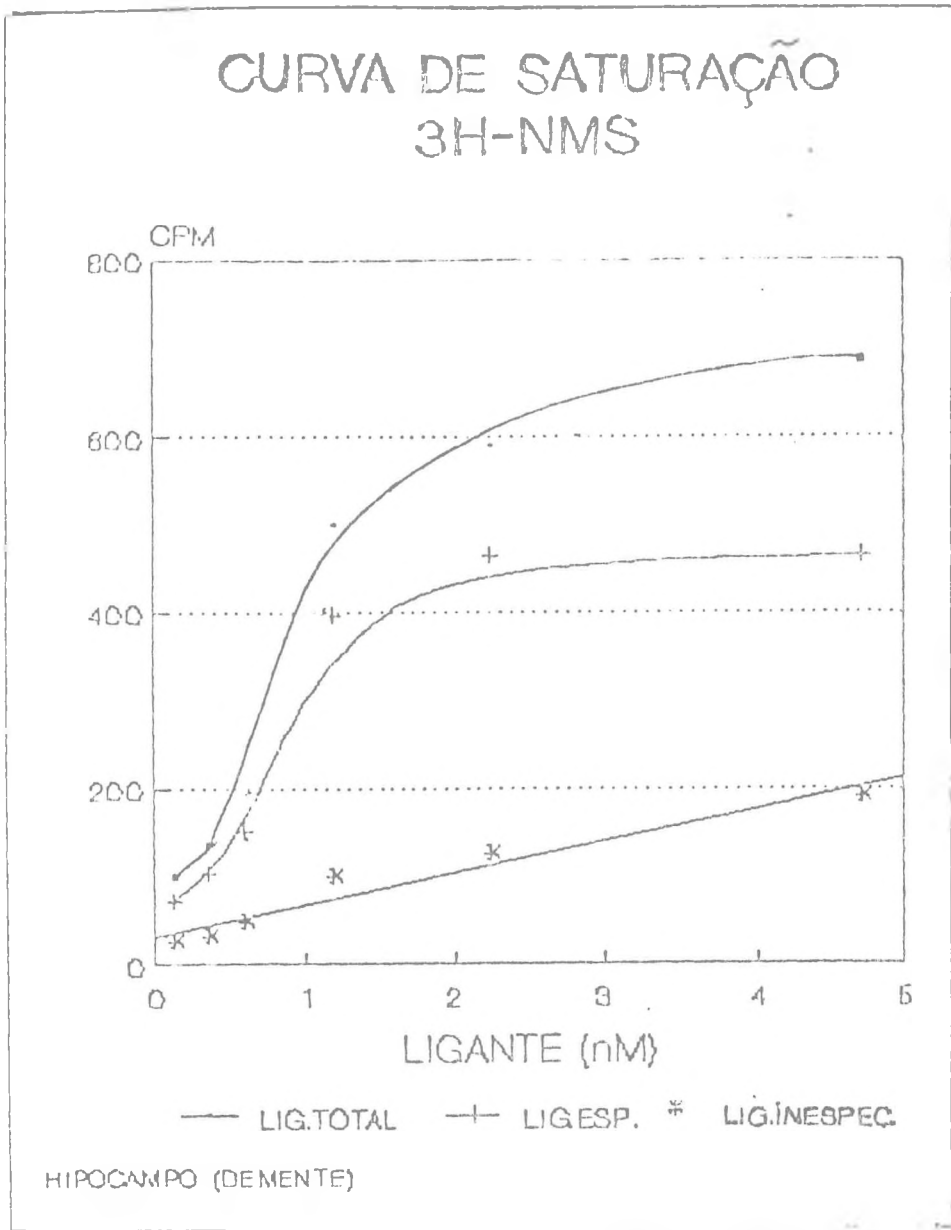


Fig 5: Curva de saturação empregando-se 5 concentrações de 3H-NMS (0.118 a 4.704nM) em hipocampo de paciente demente. A ligação específica representa o número de receptores muscarínicos, obtida pela subtração da ligação total pela ligação inespecífica.

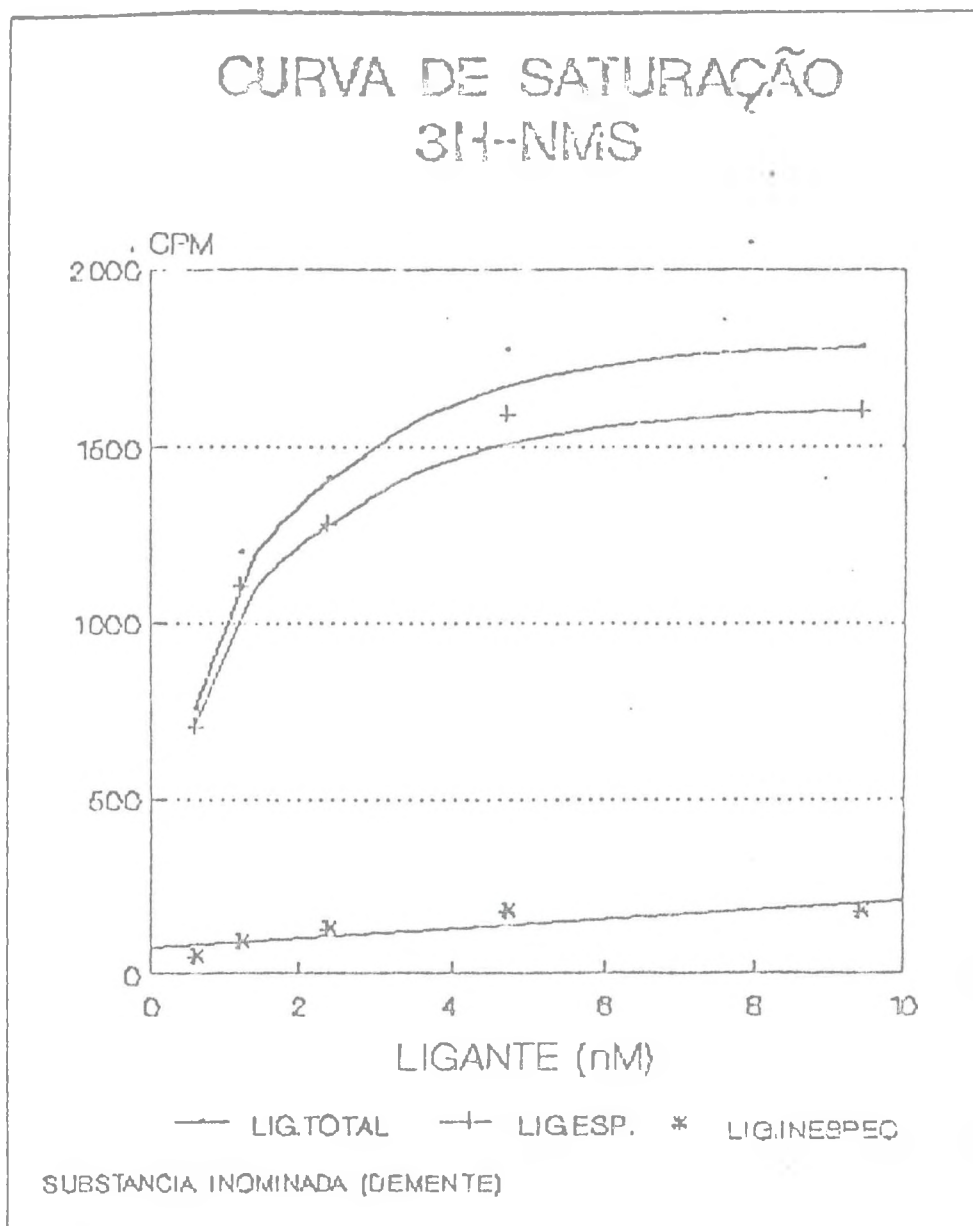


Fig 6: Curva de saturação da substância inominada de paciente demente, utilizando-se concentrações crescentes de 3H-NMS (0.588 a 9.408 nM).



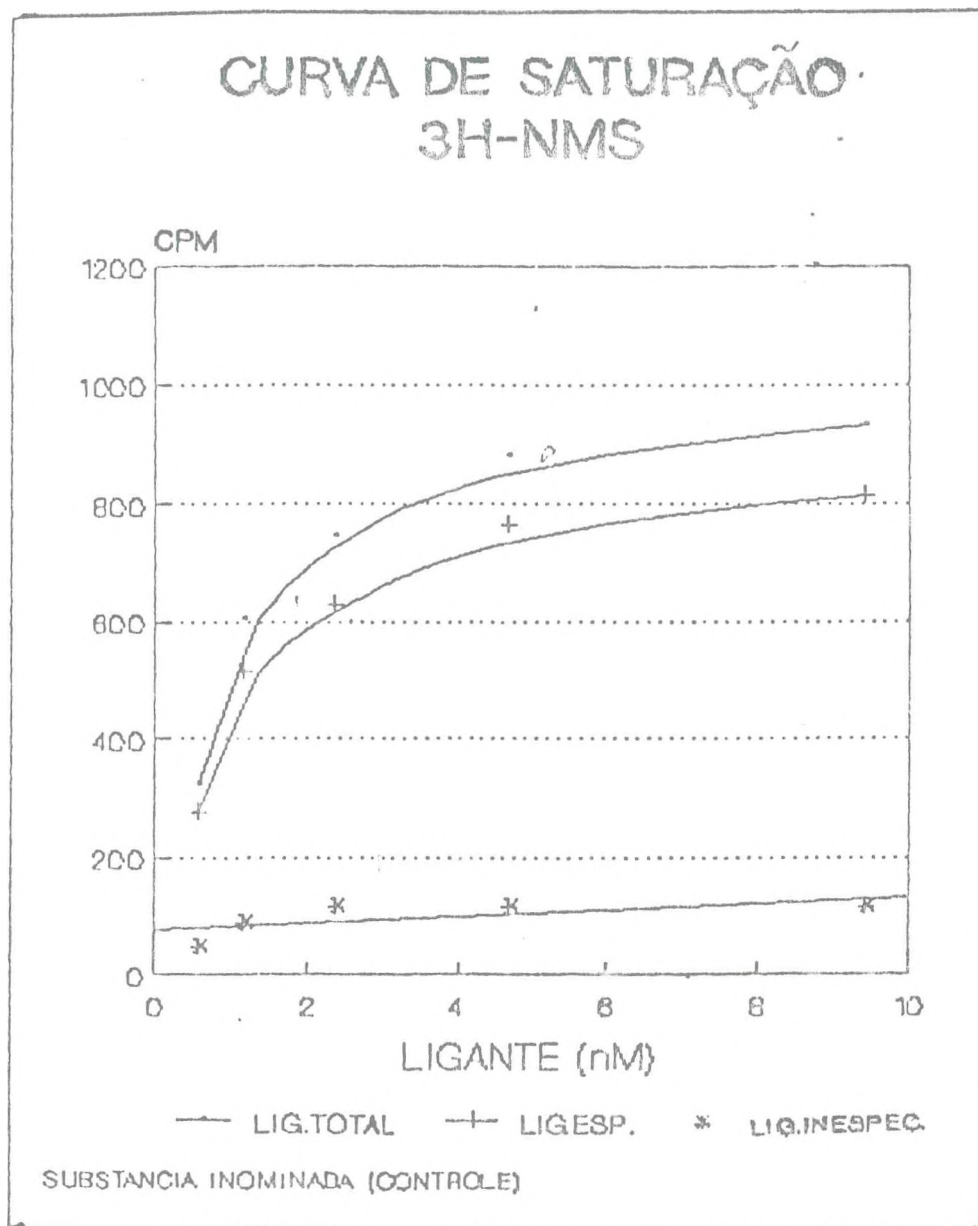


Fig 7: Curva de saturação da substância inominada de paciente controle, utilizando-se concentrações crescentes de 3H-NMS (0.588 a 9.408). A ligação inespecífica foi obtida na presença de atropina (12.5  $\mu$ M).

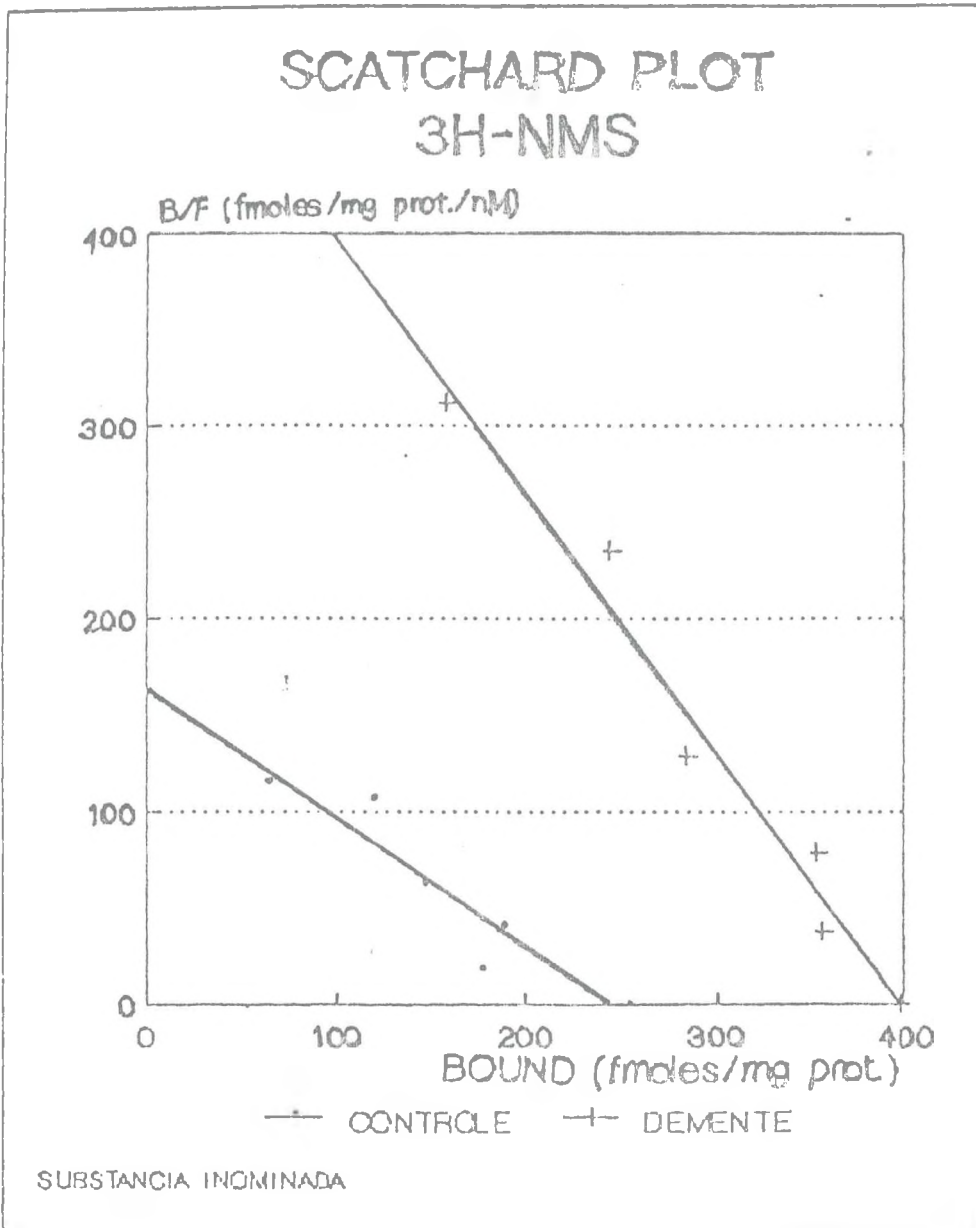


Fig 8: Scatchard plot - O homogenato foi incubado com  $^3\text{H-NMS}$  em concentrações variáveis de  $0.588\text{nM}$  a  $9.408\text{nM}$ . A área utilizada foi a substância inominada de pacinete demente e controle.  
 $B_{\text{máx}}(\text{demente}) = 396 \text{ fmoles/mg de proteína}$  e  $K_d = 0.75\text{nM}$   
 $B_{\text{máx}}(\text{controle}) = 255 \text{ fmoles/mg de proteína}$  e  $K_d = 1.27\text{nM}$ .

Em relação ao  $K_d$ (constante de dissociação) os valores foram  $0.75\text{nM}$  para o demente e  $1.27\text{ nM}$  para o paciente controle. A demonstração do Scatchard plot com o hipocampo de paciente demente e controle está na figura 9. O  $B_{\text{máx}}$  também foi maior no paciente demente( $258.9\text{ fmoles/mg}$  de proteína) do que no controle( $174.15\text{ fmoles/mg}$  de proteína). O  $K_d$  no paciente demente foi  $0.80\text{ nM}$  e no controle de  $1.69\text{ nM}$ .

A tabela 3 contém os valores relativos a atividade acetilcolinesterásica das áreas cerebrais estudadas do grupo controle e demente. A redução da atividade enzimática foi estatisticamente significativa no núcleo caudado( $P<0.01$ ) e no hipocampo( $P<0.05$ ), mostrando redução desse parâmetro colinérgico no grupo demente em relação ao controle. As proporções de redução foram semelhantes, ou seja, a atividade enzimática do núcleo caudado no grupo demente foi  $74.7\%$  do valor encontrado no grupo controle e em relação ao hipocampo o valor foi de  $77.6\%$ (fig.10). A redução da atividade enzimática na substância inominada foi de apenas  $8.7\%$ , ou seja, representa  $91.3\%$  da atividade acetilcolinesterásica do grupo controle(fig. 10).

Nas outras áreas observamos uma tendência para redução da atividade enzimática no grupo demente em relação ao controle. A confirmação dessa redução poderia ser obtida talvez pelo aumento da amostragem.

A maior atividade da enzima acetilcolinesterase foi detectada no núcleo caudado, de modo semelhante a elevada densidade de receptores muscarínicos nessa região. Sendo os giros pré e pós-central onde encontramos os menores índices da ativida-

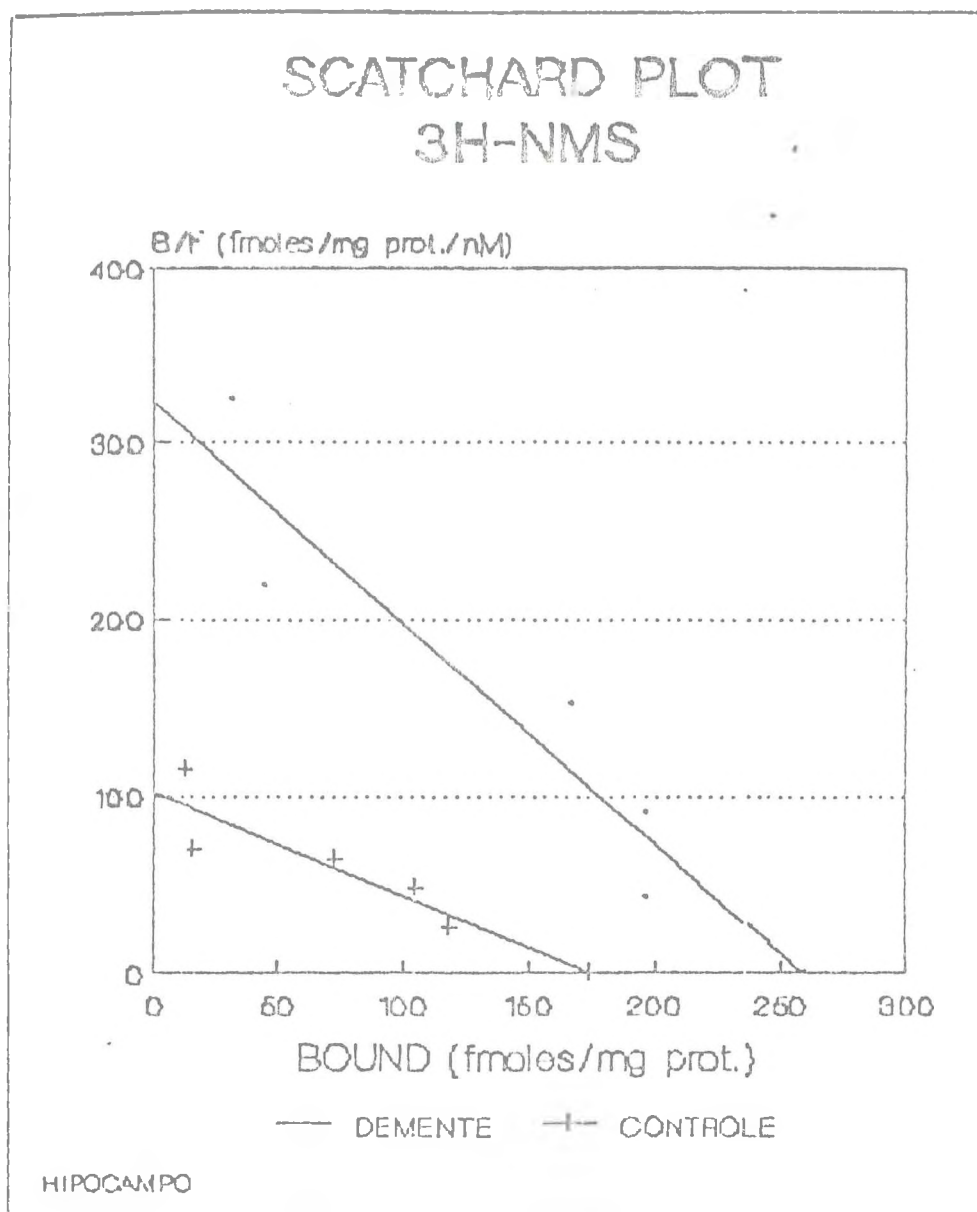


Fig 9: Scatchard plot utilizando-se  $^3\text{H-NMS}$  com concentração variando de 0.118 a 4.704 nM em hipocampo de paciente demente e controle.

$B_{\text{máx}}(\text{demente})=258.9$  fmoles/mg de proteína e  $K_d=0.80$  nM

$B_{\text{máx}}(\text{controle})=174.15$  fmoles/mg de proteína e  $K_d=1.69$  nM.

TABELA 3

Atividade acetilcolinesterásica em seis áreas cerebrais de pacientes dementes e controles.

grupos	Atividade acetilcolinesterásica (nmoles/mg prot/min)					
	A	B	C	D	E	F
controle	3.60	3.91	14.30	239.76	180.4	150.4
	+0.52	+0.51	+1.14	+13.67	+21.27	+22.86
	(13)	(14)	(13)	(14)	(14)	(11)
demente	3.80	3.80	11.10*	179.0**	173.9	131.1
	+0.50	+0.60	+1.31	+17.28	+20.35	+18.08
	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(5)

Os valores representam média  $\pm$ EPM do número de pacientes entre parênteses. \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ . A atividade enzimática foi determinada através do método de Ellman et al (1950).

- A - giro pré-central
- B - giro pós-central
- C - hipocampo
- D - núcleo caudado
- E - núcleo lentiforme
- F - substância inominada

## ATIVIDADE ENZIMÁTICA ACETILCOLINESTERASE

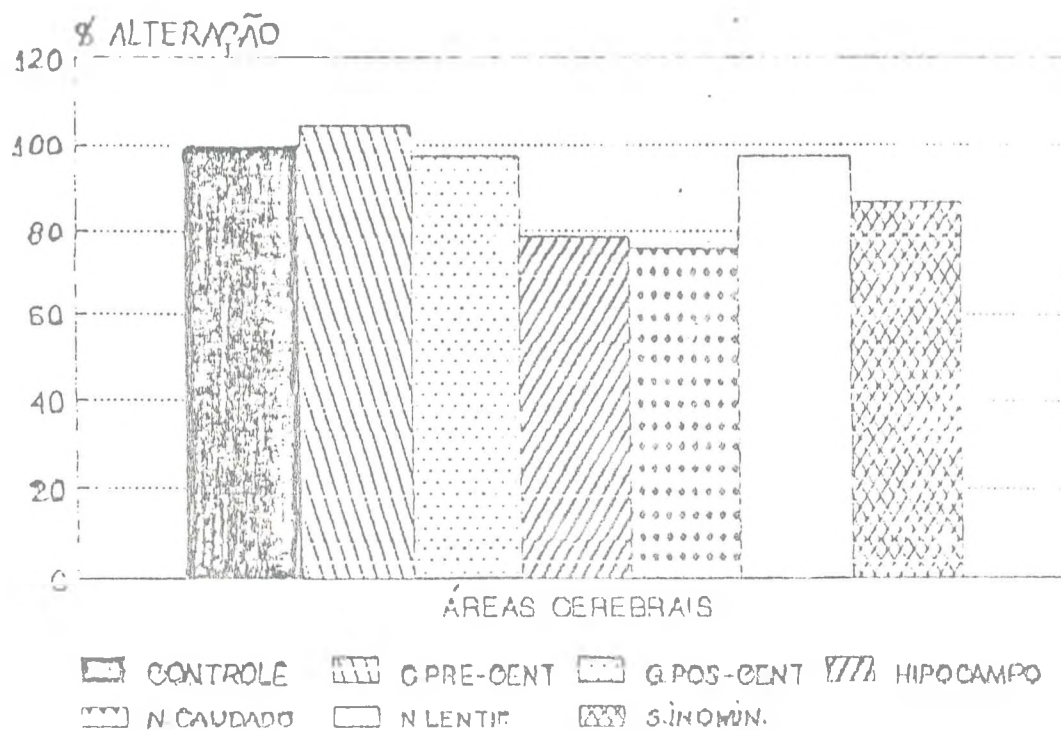


Fig 10: Histograma representativo das alterações percentuais na atividade enzimática da acetilcolinesterase em seis áreas cerebrais do grupo demente em relação ao controle considerado 100%.

de enzimática (em ambos os grupos).

A concentração proteica das áreas cerebrais estudadas, expressa por miligrama de proteína/grama de tecido apresentou-se mais elevada no grupo demente em relação ao controle. Sendo os resultados significativos em todas as áreas com exceção da substância inominada cuja diferença não foi significativa (tabela 4). O índice de significância pelo teste t de Student foi de  $P < 0.01$  para a região do giro pré-central, pós-central, núcleo caudado e núcleo lentiforme e de  $P < 0.05$  para o hipocampo.

Os índices percentuais das alterações na concentração proteica em todas as áreas estudadas foram em torno de 20% a mais no grupo demente em relação ao controle (fig. 11).

A demonstração das características histológicas normais do córtex frontal (fig. 12) e as alterações encontradas na Doença de Alzheimer em córtex cerebral como a degeneração neurofibrilar e perda neuronal podem ser observadas na figura 13.

TABELA 4

Dosagem de proteína em seis áreas cerebrais de pacientes dementes e controles.

Grupos	concentração proteica (mg de prot/g de tecido)					
	A	B	C	D	E	F
controle	117.7 +4.79 (15)	120.2 +5.03 (15)	105.1 +3.51 (15)	110.1 +5.31 (15)	114.2 +4.26 (15)	93.6 +4.58 (14)
demente	140.9** +7.52 (6)	147.6** +9.14 (6)	123.6* +8.04 (6)	130.0** +5.65 (6)	135.4** +5.35 (6)	109.4 <sup>ns</sup> +10.84 (5)

Os números representam média + EPM da quantidade de pacientes entre parênteses. \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ .

- A - giro pré-central
- B - giro pós-central
- C - hipocampo
- D - núcleo caudado
- E - núcleo lentiforme
- F - substância inominada



## CONCENTRAÇÃO PROTEICA mg/g de tecido.

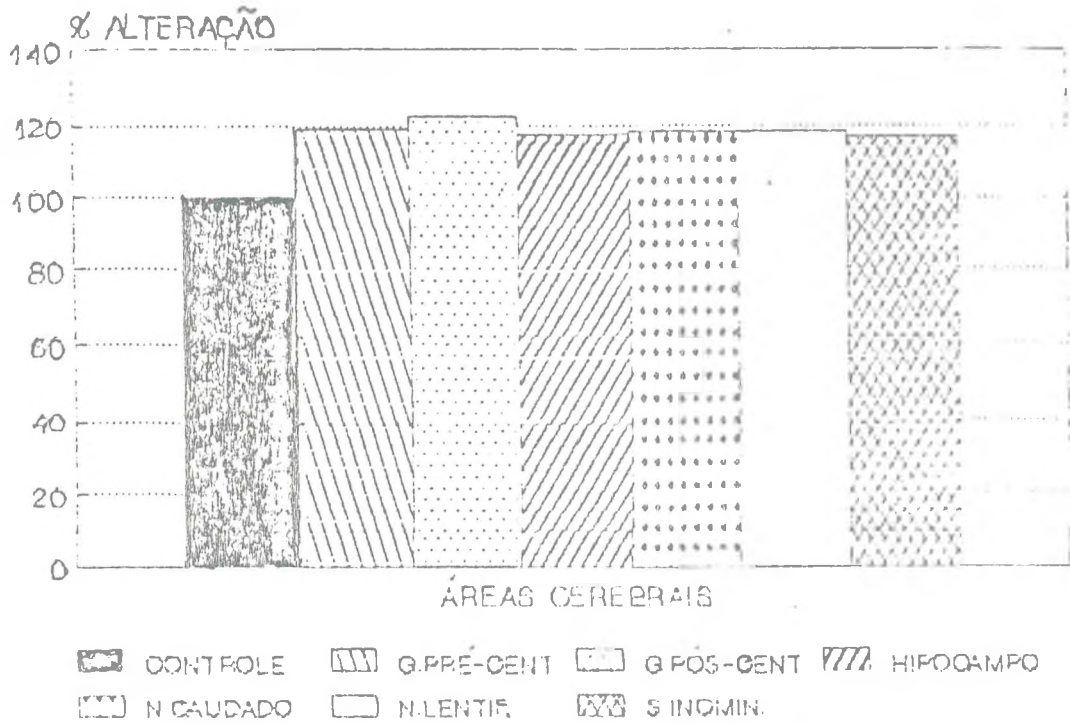


Fig 11: Histograma representativo das alterações percentuais na concentração proteica em seis áreas cerebrais do grupo demente em relação ao controle considerado 100%.

## 5. DISCUSSÃO

Com o acelerado envelhecimento da população mundial, sobretudo nos países tidos de população jovem como o Brasil, emergem os problemas de saúde característicos da senescência, representados principalmente por doenças crônico-degenerativas, dentre elas as que afetam o SNC, com implicações sociais e financeiras consideráveis. Chamamos a atenção para a demência do tipo Alzheimer onde o curso progressivo e incurável da doença bem como sua grande prevalência - em torno de 50% das doenças de caráter demencial - tem levado inúmeros pesquisadores em todo o mundo a investigarem sua fisiopatologia no intuito de descobrirem possível prevenção, tratamento ou até mesmo cura para essa doença.

Os estudos neuroquímicos de doenças do SNC têm se concentrado na quantificação dos neurotransmissores, seus metabólitos ou enzimas envolvidas na sua síntese e metabolismo. Mais recentemente tem-se determinado a densidade de receptores para determinados neurotransmissores empregando-se agonistas ou antagonistas marcados radioativamente, utilizando-se homogenatos de tecido cerebral, cujas partículas ligadas (receptores) são então, saturadas com o ligante empregado.

O envolvimento do sistema colinérgico na DA com redução acentuada da atividade da CAT no córtex cerebral (KUHAR *et al.*, 1976), redução na captação de colina de alta afinidade em aproximadamente 20% do que nas condições basais (SHERMAN *et al.*, 1981) como também redução da atividade da acetilcolinesterase nas áreas estudadas mostram a degeneração pré-sináptica do siste

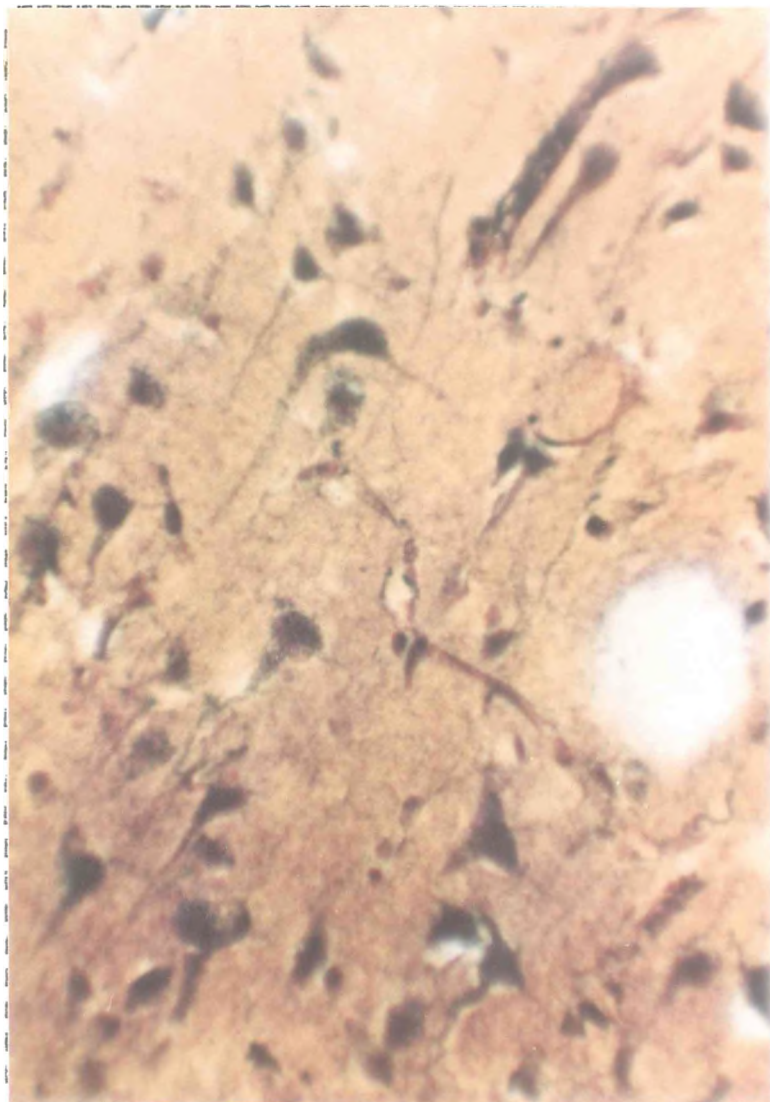


Fig 13: Córtex temporal (aumento 350x).  
Paciente Demente. Mostrando perda neuronal e degeneração neurofibrilar.

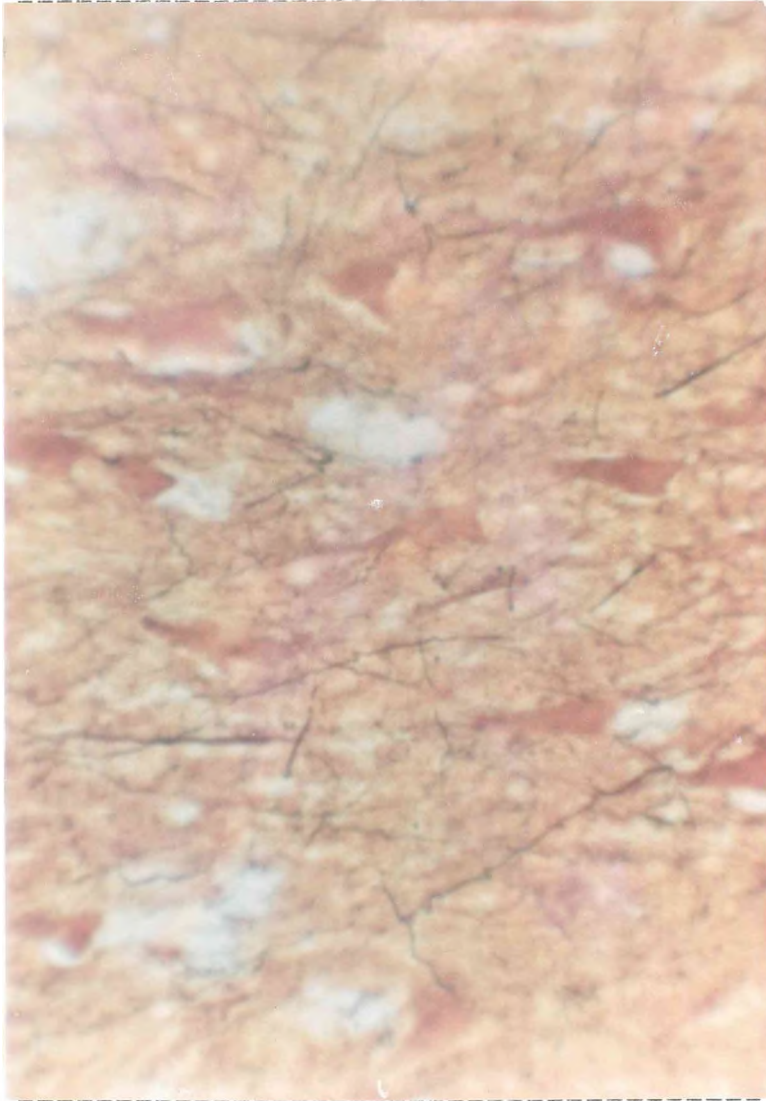


Fig 12: Córtex frontal (aumento 350x).  
Paciente Controle

ma colinérgico que ocorre na DA. Alterações semelhantes podem ser encontradas no envelhecimento normal, embora sejam de intensidade menor em relação a DA (PERRY et al 1980)

A densidade de receptores muscarínicos, marcação pós-sináptica, também foi incluída em inúmeros estudos e os resultados são bastante conflitantes apontando redução, aumento ou inalteração desses receptores em áreas cerebrais de pacientes com DA em relação aos controles de faixa etária semelhante (WHITEHOUSE et al, 1986).

Uma melhor compreensão das alterações nos receptores colinérgicos no envelhecimento e na DA é importante. Primeiro, um conhecimento mais aprofundado da disfunção do sistema colinérgico no envelhecimento e na Doença de Alzheimer inclui o reconhecimento das alterações nos receptores. A identificação das características dos neurônios corticais colinoceptivos inervados pelo sistema colinérgico possibilitará um entendimento mais efetivo sobre a disfunção colinérgica nessas duas condições. Segundo, a avaliação de modelos animais com disfunção colinérgica pode ser baseada, em parte, nas comparações das alterações nos receptores que ocorrem nesses modelos e na DA. Finalmente as tentativas terapêuticas para aumentar o aporte colinérgico para o SNC poderão ser mais adequadas através de um entendimento mais pormenorizado das possíveis alterações nos receptores colinérgicos.

Tanto em animais quanto no homem, a natureza das alterações do sistema colinérgico no envelhecimento normal ainda não está totalmente esclarecida.

No homem perda neuronal do sistema colinérgico em indivíduos idosos intelectualmente normais tem sido relatada por alguns grupos (MacGEER *et al*, 1984). WHITEHOUSE *et al*, 1983 não encontraram perda significativa com a idade, embora uma tendência para redução na densidade neuronal tenha sido observada.

DAVIES e VERTH (1978) examinaram 19 regiões cerebrais e não encontraram alteração significativa no número de receptores muscarínicos com a idade. ALLEN *et al* (1983) também não encontraram alteração significativa no binding utilizando córtex temporal e caudado de indivíduos de 50 a 97 anos, embora houvesse tendência para um decréscimo no número de receptores muscarínicos. WHITE *et al* (1977) demonstraram redução significativa na densidade de receptores muscarínicos no córtex frontal com a idade, o que foi confirmado por PERRY *et al* (1980) que também encontraram redução nos receptores de outras áreas cerebrais. NORDBERG e WINBLAD (1981) estudaram cérebros de indivíduos desde o nascimento até 100 anos e encontraram redução significativa na densidade de receptores muscarínicos no hipocampo com a idade.

Em nosso trabalho não encontramos correlação entre idade e número de receptores muscarínicos nas áreas estudadas, fato que pode ser justificado pela uniformidade das idades dos pacientes incluídos nesse estudo; pois embora variando de 69 a 102 anos, 85.7% dos pacientes situavam-se entre 70 e 90 anos.

Em suma, os estudos disponíveis sobre as alterações nos receptores muscarínicos colinérgicos (RMC) no envelhecimento normal do homem e em roedores são inconclusivos, na maior parte, os RMC das regiões corticais encontram-se inalterados ou diminuídos.



Parece não haver perda de receptores muscarínicos nos pacientes portadores de Doença de Alzheimer além do que ocorre em controles de faixa etária semelhante (LIPPA,1982). Se o decréscimo de receptores muscarínicos é realmente relevante para a redução da função colinérgica no envelhecimento normal, a persistência desse decréscimo na DA exerce igualmente um importante papel(BARTUS et al,1982).

Embora a importância funcional desse decréscimo (às vezes inconsistente) na densidade de receptores mereça maiores investigações, foi demonstrado recentemente distúrbios funcionais nos mecanismos pós-sinápticos em animais velhos com perda de receptores e déficit de memória( LIPPA et al,1981).

LIPPA et al,1981 utilizando técnicas microiontoforéticas estudaram a resposta dos receptores muscarínicos hipocâmpais em ratos jovens e velhos. A acetilcolina e o ácido glutâmico aplicados iontoforéticamente estimularam as células piramidais proporcionalmente à ejeção da corrente. Entretanto, em cérebros de ratos velhos a resposta é significativamente reduzida a acetilcolina e não ao ácido glutâmico e a resposta inibitória ao GABA é suavemente maior. Essa capacidade do ácido glutâmico em estimular as células, descarta que há uma redução generalizada da sensibilidade neuronal com o envelhecimento. Ao contrário, esses resultados são evidências diretas de um seletivo prejuízo da função colinérgica em células hipocâmpais de cérebros velhos(não humanos). Ainda está por ser confirmada a extensão dessa baixa responsividade a acetilcolina; se reflete diretamente a perda de receptores muscarínicos ou envolve outros fatores como alterações

na membrana, acoplamento com o receptor e subsequente sinal transmembrana e se eles estão relacionados com alterações do envelhecimento do cérebro humano(LIPPA et al,1981).

RINNE et al(1984) encontraram redução de receptores muscarínicos em estruturas límbicas(hipocampo, amígdala e núcleo acubens) de pacientes com DA, sugerindo que as estruturas límbicas são de grande importância para o aprendizado, no processamento e resgate da memória, comportamentos esses severamente atingidos pela DA.

REISINE et al(1978) também já haviam relatado redução em torno de 50% de receptores muscarínicos marcados com 3H-NMS em hipocampo de pacientes com DA. BALL(1977) demonstrou que a perda neuronal no hipocampo pode ser até 5 vezes maior na DA do que no envelhecimento normal.

SHIMOHAMA et al (1986) encontraram redução nos receptores marcados com 3H-QNB em hipocampo e nbM em cérebro de pacientes com DA.

KATAYAMA et al(1990) após lesarem o nbM de ratos com ácido kaínico encontraram, com relação ao binding com 3H-QNB, um aumento de 25% nas camadas I a IV(substância cinzenta) no número de receptores muscarínicos nos córtices frontal e parietal em cérebros de ratos lesados em relação aos controles. O aumento verificado através de autoradiografia só foi encontrado nas camadas superficiais(I a IV), tornando esse reconhecimento pela técnica de binding bastante dificultoso, visto que o homogenato do tecido inclui todas as camadas do córtex cerebral. Recentemente, REED e DeBELLEROUCHE(1988) demonstraram elevação da produção de 3H-IP1 em



córtex cerebral de ratos após lesão do nbM com ác. kaínico. Esses achados reforçam a possível supersensibilidade de desnervação dos receptores muscarínicos em córtex de ratos com carência do input colinérgico.

Estudos recentes relatam aumento da densidade de receptores muscarínicos na DA. LONDON e WALLER (in press) encontraram elevação no binding com 3H-QNB no hipocampo e em diversas regiões do neocórtex. JENNI-EIERMANN et al (1984) encontraram um pequeno aumento nos receptores muscarínicos hipocampais. NORDBERG et al(1983) descreveram uma correlação negativa entre a atividade da CAT e o binding com QNB em córtex, fato esse interpretado pelos autores como evidência de uma "up-regulation" dos receptores pós-sinápticos. Esse tipo de resposta foi observada claramente na Doença de Parkinson na qual a deficiência do neurotransmissor, a dopamina, causa elevação no número de receptores pós-sinápticos dopaminérgicos como uma forma de compensar o déficit dopaminérgico e manter a resposta.

Nossos resultados evidenciaram aumento de receptores muscarínicos, utilizando a técnica de binding com 3H-NMS como ligante, no hipocampo e na substância inominada de pacientes dementes em relação aos controles. Como se sabe são essas áreas as mais afetadas na DA e acreditamos que a degeneração nervosa com deficiência do neurotransmissor possa causar o aumento dos receptores muscarínicos pós-sinápticos como um mecanismo de compensação para tal déficit.

Um estudo mais detalhado dos receptores na DA seria em relação aos subtipos de receptores colinérgicos. MASH et al, 1985

encontraram redução de receptores M2 (pré-sináptico) em homogenato de córtex de pacientes com DA. WHITEHOUSE *et al.*, 1985 encontraram redução de receptores do tipo M2 somente em córtex frontal, mas não no temporal e na amígdala. Dois outros grupos (CAUFIELD *et al.*, 1982; WHITEHOUSE *et al.*, 1985) não encontraram alteração no binding com pirenzepina (marcador para receptores M1, pós-sinápticos) nas regiões corticais de pacientes portadores de DA. Enfim, o padrão de alteração dos receptores muscarínicos colinérgicos na DA não está definido. Estudos anteriores nos quais não havia distinção dos subtipos de receptores, relataram alterações não significativas nos receptores.

Entretanto parece provável que o receptor pré-sináptico M2 esteja seletivamente reduzido na DA. Uma vez que esse subtipo de receptor representa somente 20% do número total de receptores colinérgicos do córtex (MASH *et al.*, 1985; WHITEHOUSE *et al.*, 1985) reduções nos receptores M2 podem não ser detectadas através da técnica de binding para mensuração total dos receptores. Evidência de uma possível "up-regulation" dos receptores pós-sinápticos M1 permanece duvidosa.

Dois tipos de alterações em receptores hipocâmpais foram observadas em pacientes com DA, por PROBST *et al.*, 1988. Primeiro, é a perda de receptores associada a severa degeneração nervosa. A simultânea queda no número de receptores muscarínicos e a redução das células piramidais em alguns casos de DA, parece indicar que a perda neuronal por ela própria é responsável pela diminuição dos receptores. Segundo, há um significativo aumento na proporção de receptores por célula piramidal da área CA1 do hipocampo em

pacientes com moderada a severa alteração no número de neurônios.

Os resultados de PROBST et al(1988), ao estudarem regiões do hipocampo através de autorradiografia, indicam que o decréscimo dos receptores muscarínicos colinérgicos foi encontrado onde a perda neuronal foi de grau intermediário em relação ao grupo ao controle. O aumento dos receptores em relação ao número de células piramidais em pacientes com DA, indica que os neurônios hipocámpais intactos têm a habilidade de compensar a perda neuronal. Essa compensação, entretanto, não é mais possível se a perda neuronal exceder um certo limite, implicando em um grau severo de perda neuronal. Esse aumento compensatório pode explicar a densidade normal de receptores em pacientes com DA, frente a um acentuado decréscimo da atividade da CAT (NORDBERG et al,1982). Em outro estudo, NORDBERG et al(1980), utilizando homogenato de cérebro não encontraram diferença no número de receptores muscarínicos entre os pacientes portadores de DA e controles, no entanto uma correlação negativa foi encontrada entre a atividade da CAT e a densidade de receptores muscarínicos na DA e não nos controles.

Em relação aos receptores nicotínicos na doença de Alzheimer alguns trabalhos recentes demonstraram redução estatisticamente significativa dos receptores corticais nicotínicos em relação aos controles, redução essa correlacionada com a redução da atividade da CAT(WHITEHOUSE et al, in press).

SHIMOHAMA et al (1986) demonstraram redução nos sítios de binding para 3H-nicotina em regiões nas quais existe uma alta densidade de receptores nicotínicos em pessoas normais. Esses au-

tores não encontraram redução de receptores nicotínicos em córtex, embora MASH et al (1985) relataram redução desses receptores em algumas regiões corticais de pacientes portadores da DA.

Enfim, podemos concluir que as alterações nos subtipos de receptores colinérgicos na DA podem, em parte, serem devidas a um envolvimento diferencial desses receptores nessa patologia.

Outro fator que poderia influenciar a variabilidade entre os estudos sobre receptores colinérgicos na DA, seria a existência de subtipos da doença. Por exemplo, vários estudos neuropatológicos e neuroquímicos demonstraram que alterações nos marcadores pré-sinápticos são mais intensas nos pacientes mais jovens (ROSSOR et al, 1982; TAGLIAVINI e PELLERI, 1983). Portanto, alterações nos receptores muscarínicos colinérgicos podem variar em função da idade do paciente. Pacientes com um curso mais benigno da doença podem ter alterações diferentes daqueles com um curso mais rápido (MAYEUX et al, 1985). Finalmente, alguns pacientes com DA podem apresentar proeminentes sintomas psiquiátricos e neurológicos como depressão, psicose e desordens do movimento (MAYEUX et al, 1985). Ingestão de drogas diferentes, como tratamento com drogas colinérgicas e anticolinérgicas pode ser responsável pelas grande variabilidade nos estudos sobre receptores colinérgicos.

Outras possíveis causas dos resultados contraditórios em relação aos receptores muscarínicos na DA podem ser a variação da amostra (área dissecada e utilização de pooling heterogêneo de subregiões de áreas definidas), aos diferentes estágios da doença e a metodologia empregada

Outro aspecto a ser considerado, seria a redução nos valores do  $K_d$  (constante de dissociação) encontrada nas duas áreas por nós analisadas - hipocampo e substância inominada - no paciente demente em relação ao controle. Os valores do  $K_d$  no hipocampo e na substância inominada corresponderam a 50% e a 60% do controle, respectivamente. De modo semelhante ao nosso, SHIMOHAMA et al (1985) utilizando 3H-QNB, encontraram redução bastante acentuada nos valores de  $K_d$  no paciente demente ( 27% e 41% dos valores controles para o hipocampo e núcleo basal de Meynert, respectivamente).

VANDERHEYDEN et al (1987) encontraram redução significativa no  $K_d$  no córtex frontal de pacientes com DA ( $0.084nM$ ) em relação aos controles ( $0.119nM$ ), embora considerem que as características de ligação do agonista não estejam alteradas na DA.

NORDBERG & WINBLAD (1981), embora tenham encontrado declínio no número de receptores muscarínicos no hipocampo com a idade, a proporção de ligação de alta e baixa afinidade permaneceu inalterada.

Diante dos dados apresentados consideramos que há forte indicação para que ocorra alterações nos receptores a nível molecular. A redução nos valores de  $K_d$ , traduzindo uma maior afinidade do receptor pelo ligante pode ser responsável pelo prejuízo funcional do receptor com baixa responsividade ao agonista. A comprovação de tal fato requer maiores investigações. Segundo BIRDSALL et al (1978), a ligação do agonista com baixa afinidade tem sido sugerida como sítio funcionalmente ativo. Quanto maior o  $K_d$ , menor a afinidade.

Encontramos também redução na atividade acetilcolinesterásica em hipocampo e núcleo caudado de pacientes dementes, tendendo a uma redução na substância inominada e inalteração nas regiões do giro pré-central, pós-central e núcleo lentiforme. Redução na atividade enzimática tanto a AChE quanto CAT é relatada em inúmeros trabalhos com pacientes portadores da Doença de Alzheimer. Acreditamos que a redução da atividade enzimática (AChE) poderia ser significativa nas demais áreas, quando do aumento do número de casos dementes.

KATAYAMA *et al.*, 1990, após lesarem o núcleo basal de Meynert de ratos com ácido kaínico encontraram uma redução severa da atividade acetilcolinesterásica nas camadas IV, V e VI do córtex frontal e parietal, enquanto não houve alteração enzimática nas porções basais do cíngulo, lobo temporal e no hipocampo.

Em relação a concentração proteica houve um aumento em todas as áreas estudadas (giro pré-central, giro pós-central, hipocampo, núcleo caudado e núcleo lentiforme) com excessão da substância inominada que não foi estatisticamente significativa. Esse aumento na concentração proteica não representa aumento do número de receptores posto que representam parcela insignificante do conteúdo proteico total. Talvez possa representar proliferação de células gliais em resposta a perda neuronal que ocorre naturalmente com a idade e de modo mais pronunciado na Doença de Alzheimer. De outro lado a ampliação da amostragem do grupo demente seria uma forma de confirmar ou não tal elevação na concentração proteica.

## 6. CONCLUSÕES

- O aumento na densidade de receptores muscarínicos colinérgicos encontrado no hipocampo e na substância inominada de pacientes dementes, parece refletir uma resposta de supersensibilidade de desnervação, visto serem essas regiões as que estão mais seriamente comprometidas na Doença de Alzheimer.
- A determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase é um método simplificado de quantificar a função colinérgica e demonstra ser confiável, pois apesar dos resultados terem sido significativos em apenas duas das áreas cerebrais estudadas (hipocampo e núcleo caudado), nas demais áreas observou-se nítida tendência de redução desse marcador colinérgico.
- As alterações encontradas na concentração proteica com aumento no grupo demente em relação ao controle não são consideradas fundamentais uma vez que não refletem direta ou indiretamente qualquer alteração funcional de relevância do tecido nervoso.
- Os pacientes dementes foram diagnosticados como portadores de doença de Alzheimer através da avaliação clínica e estudo histológico do tecido cerebral, embora com menos rigor do que defende o Instituto Americano de Doenças Neurológicas, não descartando por definitivo a possibilidade de intrusão no grupo demente de pacientes não portadores dessa doença.

- As discrepâncias entre os pesquisadores a respeito dos parâmetros colinérgicos, sobretudo densidade de receptores, nos pacientes com Doença de Alzheimer, podem ser decorrentes da falta de padronização nos experimentos efetuados, por exemplo: delimitação da subárea utilizada em relação a área total, camadas cerebrais envolvidas, métodos empregados em relação aos parâmetros analisados, etc.; ou a existência de subtipos de DA.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, C.R., SELKOE, D.J. and POTTER, H. Immunochemical identification of the serine protease inhibitor alfa<sub>1</sub>-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. Cell, v.52, p.487-501, 1988.
- ADOLFSSON, R., GOTTFRIES, C.G., NYSTROM, L. and WINBLAD, B. Prevalence of dementia in institutionalized Swedish old people. Acta Psychiat. Scand., v.63, p.225-244, 1981.
- ALLEN, S.J., BENTON, J.S., GOODHARDT, M.J. et al. Biochemical evidence of selective nerve cell changes in the normal ageing human and rat brain. J. Neurochem., v.41, p.256-265, 1983.
- AMADUCCI, L.A., ROCCA, W.A. and SCHOENBERG, B.S. Origin the distinction between Alzheimer's disease and senile dementia: how history can clarify nosology. Neurology, v.36, p.1497-1499, 1986.
- ANDRADE, L.A.F. Alguns aspectos neurobiológicos do envelhecimento. Ciência e Cultura, v.40, n.7, p.665-672, 1988.
- BALL, M.J. Limbic predilection in Alzheimer dementia is reactivated herpes virus involved? Can. J. Neurol. Sci., v.9, p.303-306, 1982.

- BARTUS, R.T., DEAN, R.L. and BEER, B. An evaluation of drugs for improving memory in aged monkeys. Implications for clinical trials in humans. *Psychopharmacol. Bull.*, v.19, p.168-184, 1983.
- BARTUS, R.T., DEAN, R.L., BEER, B. and LIPPA, A.S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, v.217, p.408-417, 1982.
- BENSON, D.F. Neuroimaging and dementia. *Neurol. Clin.*, v.4, p.341-353, 1986.
- BIRDSALL, N.J., BURGEN, A.S. and HULME, E.C. The binding of agonists to brain muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.*, v.14, p.723-736, 1978.
- BIZZI, A., GAMBETTI, P. Phosphorylation of neurofilaments is altered in aluminum intoxication. *Acta Neuropathol.*, v.71, p.154-158, 1986.
- BLESSED, G., TOMLINSON, B.E. and ROTH, M. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br. J. Psychiatry*, v.114, p.797-811, 1968.
- BOLLER, F., MIZUTANI, T., ROESSMANN, U. and GAMBETTI, P. Parkinson's disease, dementia and Alzheimer's disease:

- clinicopathological correlations. *Ann. Neurol.*, v.7, p.329-355, 1980.
- BOWEN, D.M., DAVISON, A.N. Biochemical studies of nerve cells and energy metabolism in Alzheimer's disease. *Br. Med. Bull.*, v.42, p.75-80, 1986.
- BRODY, H. An examination of cerebral and brain stem in aging. In: TERRY, R.D., GERSHON, S. *Neurobiol. Aging*. New York, 1976, v.3, p.171-181.
- BRUNO, J.A. Diferenciação neurofibrilar relacionada aos movimentos espontâneos e primeiros reflexos por estímulos evocados no embrião do *Gallus domesticus*. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Anatomia, Universidade de São Paulo, 1979.
- BULBENA, A., BERRIOS, G.E. Pseudodementia: facts and figures. *Br. J. Psychiatry*, v.148, p.87-94, 1986.
- CAMBIER, J., MASSON, M. & DEHEN, H. Demências orgânicas do adulto, cap.21, p.467-473. In: *Manual de Neurologia*, Editora Santos, São Paulo, 1988.
- CANDY, J.M., DACLEY, A.E., KLINOWSKI, J. et al. Aluminosilicates and senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Lancet*, v.1, p.354-356, 1986.

- CARLSSON, A. Neurotransmitter changes in the aging brain. Danish Med. Bull., v.32, p.40-43, february, 1985.
- CHAPMAN, J., BACHAN, O., KORCZYN, A.M. et al. Antibodies to cholinergic neurons in Alzheimer's disease. J. Neurochem., p.479-485, 1988.
- CHUI, H.C., MORTIMER, J.A., SLAGER, U. et al. Pathologic correlates of dementia in Parkinson's disease. Arch. Neurol., v.43, p.991-995, 1986.
- CLARK, A.W., PARHAD, I.M. and FOLSTEIN, S.E. The nucleus basalis in Huntington's disease. Neurology, v.33, p.1262-1267, 1983.
- COLLERTON, D. Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer's disease. Neuroscience, v.19, p.1-28, 1986.
- CRAPPER, D.R., KRISHNAN, S.S. and DALTON, A.J. Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration. Science, v.180, p.511-513, 1973.
- CRAPPER, D.R., KRISHNAN, S.S. and QUITTKAT, S. Aluminium, neurofibrillary degeneration and Alzheimer's disease. Brain, v.99, p.67-80, 1976.
- CUMMINGS, J.L., BENSON, D.F. Dementia: a clinical approach. Butterworths. Boston, 1983.

- DANILOFF, J.K., BODONY, R.P., LOW, W.C. and WELLS, J. Cross species embryonic septal transplants: restoration of conditioned learned behavior. Brain Res., v.346, p.176-180, 1985.
- DAVIES, P. It is possible to design rational treatment for symptoms of Alzheimer's disease? Drug Dev. Res., v.5, p.69-75, 1985.
- DAVIES, P. Neurochemical aspects of Alzheimer's disease. Brain Res., v.171, p.319, 1979.
- DAVIES, P., MALONEY, A.J.F. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. Lancet, v.2, p.1403, 1976.
- DAVIES, P., VERTH, A.H. Regional distribution of muscarinic acetylcholine receptor in normal and Alzheimer's type dementia brains. Brain Res., v.138, p.385-392, 1978.
- DAVIS, K.L., MOHRS, R.C., DAVIS, R.M. et al. Cholinergic treatment in Alzheimer's disease: implications for future research. In: CORKIN, S., DAVIS, K., CROWDON, J.H. and WURTMAN, R.J. Alzheimer's disease = a report of progress in research. Raven Press, New York, 1982, p.124-131.

- DAVISON, A.N. Pathophysiology of ageing brain. *Gerontology*, v.33 (3-4), p. 129-135, 1987.
- DITTER, S.M., MIRRA, S.S. Neuropathologic and clinical features of Parkinson's disease in Alzheimer's disease patients. *Neurology*, v.37, p.754-760, 1987.
- DOMBROWSKI, A.M., JERKINS, A.A. and KAUFFMAN, F.C. Muscarinic receptor binding and oxidative activities in the adult rat superior cervical ganglion: effects of 6-hydroxydopamine and nerve growth factor. *J. Neurosci.*, v.3, n.10, p.1963-1970, 1983.
- DRACHMAN, D.A. Neurobiologic basis of CNS changes in aging. In: American Academy of Neurology Meeting: *Recent advances in dementia*. april, 1984, p.8-14.
- DUNNETT, S.B. Comparative effects of cholinergic drugs and lesions of nucleus basalis or fimbria fornix on delayed matching in rats. *Psychopharmacology*, v.87, p.357-363, 1985.
- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, J. and FEATHERSTONE, R.M. A new colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, v.7, p.88-95, 1961.
- ESIRI, M.M., WILCOCK, G.K. Cerebral amyloid angiopathy in dementia and old age. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, v.49,

- p.1221-1226, 1986.
- FIELDS, W.S. Multi infarct dementia. *Neurol. Clin.*, v.4, p.405-4136, 1986.
- FINE, A., DUNNETT, S.B., BJORKLUND, A. and IVERSEN, S.D. Cholinergic ventral forebrain grafts improve passive avoidance memory in a rat model of Alzheimer's disease. *Proc. Nation. Acad. Sci. USA*, v.82, p.5227-5230, 1985.
- FISMAN, M. Pseudodementia. *Proc. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.*, v.9, p.481-484, 1985.
- FISMAN, M., MERSKEY, H., HELMES, E. et al. Double blind study of lecithin in patients with Alzheimer's disease. *Can. J. Psych.*, v.26, p.426-428, 1981.
- FLICKER, C., DEAN, R.L., WATKINS, D.L. et al. Behavioural and neurochemical effects following neurotoxic lesions of a major cholinergic input to the neocortex in the rat. *Pharmac. Biochem. Behav.*, v.18, p.973-981, 1983.
- GADO, M., HUGHES, C.F., DANZIGER, W. and CHI, D. Aging, dementia and brain atrophy: a longitudinal computed tomography study. *Am. J. Neuroradiol.*, v.4, p.699-702, 1983.

- GAGE, F.H., BJORKLUND, A., STENEVI, U. et al. Intrahippocampal septal grafts ameliorate learning impairments in aged rats. *Science*, v.225, p.533-536, 1984.
- GIBSON, P.H., TOMLINSON, B.E. Numbers of Hirano bodies in the hippocampus of normal and demented people with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.*, v.33, p.199-206, 1977.
- GLENNER, G.G., WONG, C.W. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.122, p.1131-1135, 1984.
- GOLDMAN, J.E. The association of actin with Hirano bodies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, v.42, p.146-152, 1983.
- GOTTFRIES, C.G. Neurotransmitters in the brains of patients with dementia disorders. *Danish Med. Bull.*, v.32, p.44-47, february, 1985.
- GRAY, J.A. Multiple book review of the neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. *Behav. Brain Sci.*, v.5, p.469-534, 1982.
- HACHINSKI, V.C., ILIFF, L.D., ZILHKA, E. et al. Cerebral blood flow in dementia. *Arch. Neurol.*, v.32, p.632-637, 1975.



- HALL, J.C., McLENNAN, H. and WHEAL, H.V. The actions of certain amino acids as neuronal excitants. J. Physiol., v.272, p.52-53, 1977.
- HANIN, I., REYNOLDS, C.F., KUPFER, D.J. et al. Elevated red blood cell/plasma choline ratio in dementia of Alzheimer type: clinical and polysomnographic correlates. Psych. Res., v.13, p.167-173, 1984.
- HARBAUGH, R.E., ROBERTS, D.W., COOMBS, D.W. et al. Preliminary report: intracranial cholinergic drug infusion in patients with Alzheimer's disease. Neurosurgery, v.15, p.514-518, 1984.
- HEFTI, F., WEINER, W.J. Nerve growth factor: biochemistry, synthesis, and mechanism of action. Ann. Neurol., v.20, p.275-281, 1986.
- HENDERSON, V.W. Ambiguities in Alzheimer's disease diagnosis: implications for genetic research. Neurobiol. Aging, v.7, p.469-471, 1986.
- HENDERSON, V.W., FINCH, C.E. The neurobiology of Alzheimer's disease. J. Neurosurg., v.70, p.335-353, 1989.
- HESTON, L.L. Alzheimer's disease, trisomy 21 and myeloproliferative disorders: associations suggesting a genetic diathesis. Science, v.196, p.322-323, 1977.

- HONORÉ, T., DAVIES, S.N., DREJER, J. et al. Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists. *Science*, v.241, p.701-703, 1988.
- HORN, G.V. Dementia. *Am. J. Med.*, v.83, p.101-110, july, 1987.
- INGVAR, D.H., LASSEN, N.A. Activity distribution in the cerebral cortex in organic dementia as revealed by measurements of regional cerebral blood flow. In: Bayer Symposium VII: HOFFMEISTER, F., MULLER, C. Brain function in old age. evaluation of changes and disorders. Springer-Verlag, Berlin, 1979, p.268-277.
- JENNI-EIERMANN, S., VONHAHN, H.P., HONEGGER, C.G. and ULRICH, J. Studies on neurotransmitter binding in senile dementia. *Gerontology*, v.30, p.350-358, 1984.
- KALACHE, A., VERAS, R.P. & RAMOS, L.R. O envelhecimento da população mundial. Um desafio novo. *Revista de Saúde Pública*, v.21, p.200-201, 1987.
- KATAYAMA, S., KITO, S. and YAMAMURA, Y. Increase of muscarinic receptor following kainic acid lesions of the nucleus basalis magnocellularis in rat brain: an autoradiographic study. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, v.68, p.391-394, 1990.

- KATZMAN, R. The prevalence and malignancy of Alzheimer's disease. A major killer. Arch. Neurol., v.33, p.217-218, 1976.
- KESSLER, J.A. Deficiency of cholinergic differentiating factor in fibroblasts of patients with Alzheimer's disease. Neurology, v.36, p.226, 1986.
- KHACHATURIAN, Z.S. Diagnosis of Alzheimer's disease. Arch. Neurol., v.42, p.1097-1105, 1985.
- KREMZNER, L.T., CÔTE, L.J. Biochemical changes in normal aging in human brain. In: MAYEUX, R., ROSEN, W.G. The Dementias. Raven Press, 1983.
- LIPPA, A.S., CRITCHETT, D.J., EHLERT, F. et al. Age-related alterations in neurotransmitter receptors: an electrophysiological and biochemical analysis. Neurobiol. Aging, v.2, p.3-8, 1981.
- LORIAUX, S.M., DEIJEN, J.B., ORLEBEKE, J.F. and DeSWART, J.H. The effects of nicotinic acid and xanthinol nicotinate on human memory in different categories of age. A double-blind study. Psychopharmacology, v.87, p.390-395, 1985.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., v.193, p.265-275, 1951.

- LYNCH, G., BAUDRY, M. The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science*, v.224, p.1057-1063, 1984.
- MANN, D.M.A. The neuropathology of Alzheimer's disease: a review with pathogenetic, aetiological and therapeutic considerations *Arch. Aging Dev.*, v.31, p.213-255, 1985.
- MANN, D.M.A., NEARY, D., YATES, P.O. et al. Alterations in protein synthetic capability of nerve cells in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, v.44, p.97-103, 1981.
- MARTIN, J.B. Huntington's disease: new approaches to an old problem. *Neurology*, v.34, p.1059-1072, 1984.
- MASH, D.C. FLYNN, D.D. and POTTER, L.T. Loss of M<sub>2</sub> muscarinic receptors in the cerebral cortex in Alzheimer's disease and  
118  
experimental cholinergic denervation. *Science*. v.228, p.1115-1117, 1985.
- MASTERS, C.L., MULTHAUF, G., SIMMS, G. et al. Neuronal origin of cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J.*, v.4, p.2757-2763, 1985.

- MAYEUX, R., STERN, Y. and SPANTON, S. Heterogeneity in dementia of Alzheimer type: evidence of subgroups. *Neurology*, v.35, p.453-461, 1985.
- McGEER, P.L., McGEER, E.G., SUZUKY, J. et al. Aging, Alzheimer's disease, and the cholinergic system of the basal forebrain. *Neurology*, v.34, p.741-745, 1984.
- McKINNEY, M., COYLE, J.T. and HEDREEN, J.C. Topographic analysis of the innervation of the rat neocortex and hippocampus by the basal forebrain cholinergic system. *J. Neurol.*, v.217, p.103-121, 1983.
- MILLER, A.E., NEIGHBOUR, P.A., KATZMAN, R. et al. Immunological studies in senile dementia of the Alzheimer type: evidence for enhanced suppressor cell activity. *Ann. Neurol.*, v.10, p.506-510, 1981.
- MOLDÉUS, P., NORDENSKJOLD, M., BOLCSFOLDI, C. et al. Genetic toxicity of dopamine. *Mut. Res.*, v. 124, p.9-24, 1983.
- MOLSA, P.K., PALJARVI, L., RINNE, J.O. et al: Validity of clinical diagnosis in dementia: a prospective clinopathological study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, v.48, p.1085-1090, 1985.

- MORTIMER, J.A., FRENCH, L.R., HUTTON, J.T. et al. Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease. Neurology, v.35, p.264-267, 1985.
- MOSS, D., RODRIGUEZ, L. Alzheimer's dementia: recent developments in cholinergic pharmacology. Texas Med., v.83, p.32-33, january, 1984.
- NAVIA, B.A., CHO, E.S., PETITO, C.K. and PRICE, R.W. The AIDS dementia complex. Neuropathology, v.19, p.525-535, 1986.
- NORDBERG, A., ADOLFSSON, R., MARCUSSON, J. and WINBLAD, B. Cholinergic receptors in the hippocampus in normal aging and dementia of Alzheimer type. In: GIACOBINI, E., FILOGRAM, G., GIACOBINI, G. and VERNADAKIS, A. The aging brain. Cellular mechanisms of aging in the nervous system. Raven Press, New York, 1982, Ageing, v.20, p.231-245.
- NORDBERG, A., LARSSON, C. Studies on muscarinic and nicotinic binding sites in brain. Acta Physiol. Scand., Suppl.479, p.19-23, 1980.
- NORDBERG, A., LARSSON, C., ADOLFSSON, R. et al. Muscarinic receptor compensation in hippocampus of Alzheimer patients. J. Neural. Transm., v.56, p. 13-19, 1983.

- NORDBERG, A., WINBLAD, B. Cholinergic receptors in human hippocampus - regional distribution and variance with age. Life Science, v.29, p.1937-1944, 1981.
- NORDSTROM, O., ALBERTS, P., WESTLIND, A. et al. Presynaptic antagonist, postsynaptic agonist at muscarinic cholinergic synapses. Mol. Pharmacol., v.24, p.1-5, 1983.
- OLNEY, J.W. Excitotoxic aminoacids and neuropsychiatric disorders. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., v.30, p.47-71, 1990.
- \_\_\_\_\_. Glutamate induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus: an electron microscopic study. J. Neurol., v.30, p.75-90, 1971.
- OLNEY, J.W., PRICE, M.T., LABRUYERE, J., et al. Anti-parkinsonian agents are phencyclidine agonists and N-methyl-aspartate antagonists. Eur. J. Pharmacol., v.142, p.319-320, 1987.
- OLNEY, J.W., PRICE, M.T., LABRUYERE, J. et al. Comparative efficacy of various agents in preventing glutamate induced or ischemic neuronal degeneration in chick retina. Neurosci. Abstr., v.13, p.1030, 1987.
- PERRY, E.K. The cholinergic hypothesis - 10 years on. Br. Med. Bull., v.42, p.63-69, 1986.

- PERRY, G., MULVIHILL, P., MANETTO, V. et al. Immunocytochemical properties of Alzheimer straight filaments. J. Neuroscience, v.7, p.3736-3738, 1987.
- PERRY, R.H., BLESSED, G., FERRY, E.K. and TOMLINSON, B.E. Histochemical observations on the cholinesterase activities in the brains of normal and demented (Alzheimer type) patients. Age Ageing, v.9, p.9-16, 1980.
- PLUM, F., POSNER, J.B. The diagnosis of stupor and coma. 3rd ed. Philadelphia-FA. Davis, 1980, p. 240-241.
- PRICE, D.L., ALTSCHULER, R.J., STRUBLE, R.G. et al. Sequestration of tubulin in neurons in Alzheimer's disease. Brain Res., v.385, p.305-310, 1986.
- PRICE, D.L., STRUBLE, R.G., WHITEHOUSE, P.J. et al. Neuropathological processes in Alzheimer's disease. Drug Dev. Res., v.5, p.59-67, 1985.
- PROBST, A., CORTÉS, R., ULRICH, J. and PALÁCIOS, J.M. Differential modification of muscarinic cholinergic receptors in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease: an autoradiographic study. Brain Res., v.450, p.190-201, 1988.
- PRUSINER, S.B. Prions and neurodegenerative diseases. N. Engl. J. Med., v.317, p.1571-1581, 1987.



- RAWLINS, J.N.P. Associations across time: the hippocampus as a temporary memory store. Behav. Brain Sci., v.8, p.479-496, 1985.
- REED, L. J., De BELLEROCHE. J. Neurochem., v.50, p.1566-1571, 1988.
- REISINE, T.D., YAMAMURA, H.I., BIRD, E.D. et al. Pre and postsynaptic neurochemical alterations in Alzheimer's disease. Brain Res., v.159, p.477-481, 1978.
- RICK, J.T., WHITTLE, K.L. and CROSS, S.H. Disruption and facilitation of cue discrimination in the rat by cholinergic agents. Neuropharmacology, v.20, p.747-752, 1981.
- 123
- RIEKKINEN, P.J., LAULUMAA, V., SOININEN, H. et al. Recent progress in the research of Alzheimer's disease. Med. Biol, v.65, p.83-88, 1987.
- RINNE, J.O., RINNE, J.K., LAAKSO, K. et al. Reduction in muscarinic receptor binding in limbic areas of Alzheimer brain. J. Neurol. Neurosurg. Psych., v.47, p.651-653, 1984.
- ROGER, J.D., BROGAN, D. and MIRRA, S.S. The nucleus basalis of Meynert in neurological disease: a quantitative morphological study. Ann. Neurol., v.17, p.163-170, 1986.

- ROSSOR, M.N., IVERSEN, L.L., REYNOLDS, G.P. et al.  
Neurochemical characteristics of early and late onset types of  
Alzheimer's disease. *Br. J. Med.*, v.288, p.961-964, 1984.
- ROTH, M. Aging of the brain and dementia - an overview. In:  
AMADUCCI, L. et al. *Aging of the brain and dementia*. v.13,  
Raven Press, 1980.
- ROTHSCHILD, H. The biology of aging. In:ROTHSCHILD, H., CHAPMAN,  
C.F., eds. *Risk factors for senility*. New York: Oxford  
University Press, p.3-17, 1984.
- SHIMOHAMA, S., TANIGUCHI, T., FUJIWARA, M. and KAMEYAMA, M.  
Changes in nicotinic and muscarinic receptor in Alzheimer type  
dementia. *J. Neurochem.*, v.46, p.288-293, 1986.
- \_\_\_\_\_. Biochemical characterization of the nicotinic cholinergic  
receptors in human brain: binding of 3H-nicotine. *J.  
Neurochem.*, v.45, p.604-610, 1985.
- SIESJO, B. Mechanisms of cellular damage in the brain. In: Bayer  
Symposium VII: HOFFMEISTER, F., MULLER, C. *Brain function in  
old age*. 1979, p.381-384.
- SMITH, G. Animal models of Alzheimer's disease: experimental  
cholinergic deservation. *Brain Res. Rev.*, v.13, p.103-118,  
1988.

- SOFRONIEW, M.V., PEARSON, R.C.A., CUELLO, A.C. et al. Parenterally administered GM1 ganglioside prevents retrograde degeneration of cholinergic cells of the rat basal forebrain. Brain Res., v.398, p.393-396, 1986.
- STEVENS, R. Scopolamine impairs spatial maze performance in rats. Physiol. Behav., v.27, p.285-286, 1981.
- STREHLER, B.L. Introduction: aging and the human brain. In: GERSHON, S., RASKIN, A. Raven Press, 1985, Aging, v.3.
- STRUBLE, R.G., CORK, L.C., WHITEHOUSE, P.J. et al. Cholinergic innervation in neuritic plaques. Science, v.216, p.413-415, 1982.
- STUDENT. A.K., EDWARDS, D.J. Subcellular localization of types A and B monoamineoxidase in rat brain. Biochem. Pharmacol., v.26, p.2337-2342, 1977.
- TAGLIAVINI, F., FILLERI, G. Neuronal counts in basal nucleus of Meynert in Alzheimer's disease and in simple senile dementia. Lancet, v.1, p. 459-470, 1983.
- THAL, L., MASUR, D., FIELD, P. et al. Memory improvement with oral physostigmine and lecithin in Alzheimer's disease. In:

- KATZMAN, R. Biological aspects of Alzheimer's disease. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1983, p.461-469.
- TANAHASHI, N., MEYER, J.S. and ISHILKAWA, Y. Cerebral blood flow and cognitive testing correlate in Huntington's disease. Arch. Neurol., v.42, p.1169-1175, 1985.
- THOENEN, H., BARDE, Y.A. Physiology of nerve growth factor. Physiol. Rev., v.60, p.1284-1334, 1980.
- TOMLINSON, B.E., KITCHENER, D. Granulovacuolar degeneration of hippocampal pyramidal cells. J. Pathol., v.106, p.165-185, 1972.
- TRIMBLE, M.R., THOMPSON, P.J. Anticonvulsant drugs, cognitive function and behavior. Epilepsia, v. 24, suppl.1, p.555-563, 1983.
- VAN HOESEN, G.W. Neural systems of the non-human primate forebrain implicated in memory. Ann. N. Y. Acad. Sci., v.444, p.97-112, 1985.
- VANDERHEYDEN, P., EBINGER, G., DIERCKX, R. and VAUQUELIN, G. Muscarinic cholinergic receptor subtypes in normal human brain and Alzheimer's presenile dementia. J. Neurologic. Sci., v.87, p.257-269, 1987.

- VIANA, G.S.B., BRUM, V.M.S., LEITÃO, M.C.A. & ROUQUAYROL, M.Z.  
Screening tests for the evaluation of dementia. A preliminary study at a northeast Brazil nursing home. J. Bras. Psiqu., v.37, n.1, p.29-31, 1988.
- WALOSIN, B.L., PRUCHNICKI, A., DICKSON, D.W. and DAVIES, P. A neuronal antigen in the brains of Alzheimer's patients. Science, v.232, p.648-650, 1986.
- WALSH, T.J., TILSON, H.A., DeHAVEN, D.L. et al. AF64A a cholinergic neurotoxin, selectively depletes acetylcholine in hippocampus and cortex, and produces long-term passive avoidance and radial arm maze deficits in the rat. Brain Res., v.321, p.91-102, 1984.
- WATKINS, J.C., EVANS, R.H. Excitatory amino acids transmitters. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., v.21, p.165-204, 1981.
- WATSON, C.P. Clinical similarity of Alzheimer and Creutzfeldt-Jacob disease. Ann. Neurol., v.6, p.368-369, 1979.
- WHITE, P., HILEY, C.R., GOODHARDT, M.J. et al. Neocortical cholinergic neurons in elderly people. Lancet, v.1, p.668-670, 1977.
- WHITEHOUSE, P.J., AU, K.S. Cholinergic receptors in aging and Alzheimer's disease. Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol.

Psychiat., v.10, p.665-676, 1986.

-WHITEHOUSE, P.J., KOPAJTIC, T., JONES, B.E. et al. An in vitro receptor autoradiographic study of muscarinic cholinergic receptor subtypes in the amigdala and neocortex of patients with Alzheimer's disease. Neurology, v.35, suppl.1, p.217, 1985.

-WISNIEWSKI, K., JERVIS, G.A., MORETZ, R.C. et al. Alzheimer neurofibrillary tangles in diseases other than senile and presenile dementia. Ann. Neurol., v.5, p.288-294, 1979.

-YAGISHITA, S., ITOH, Y., NAN, W. et al. Reappraisal of the fine structure of Alzheimer's neurofibrillary tangles. Acta Neuropathol., v.54, p.239-246, 1981.