

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA - DOUTORADO

REINALDO BARRETO ORIÁ

GENOTIPAGEM DA APOLIPOPROTEÍNA E E SUA ASSOCIAÇÃO COM DÉFICITS
COGNITIVOS EM CRIANÇAS COM DIARRÉIA E DESNUTRIÇÃO NO NORDESTE DO
BRASIL

FORTALEZA – CEARÁ

2004

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA - DOUTORADO**

**GENOTIPAGEM DA APOLIPOPROTEÍNA E E SUA ASSOCIAÇÃO COM DÉFICITS
COGNITIVOS EM CRIANÇAS COM DIARRÉIA E DESNUTRIÇÃO NO NORDESTE DO
BRASIL**

REINALDO BARRETO ORIÁ

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – Doutorado, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro Costa
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

FORTALEZA – CEARÁ

2004

**GENOTIPAGEM DA APOLIPOPROTEÍNA E E SUA ASSOCIAÇÃO COM DÉFICITS
COGNITIVOS EM CRIANÇAS COM DIARRÉIA E DESNUTRIÇÃO NO NORDESTE DO
BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – Doutorado, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

Data da Aprovação: 25. 11. 2004

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro Costa

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

Prof^a. Dr^a. Gerly Anne de Castro Brito

Prof^a. Dr^a. Vanda Maria Gimenes Gonçalves

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha



**"A great person is one who has
not lost the heart of a child."**

Petronius

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Humberto e Noélia, que sempre foram exemplos de pai e mãe, além de serem os maiores incentivadores do meu crescimento humano e profissional.

À minha esposa, Mônica, que estando sempre ao meu lado, soube ser compreensiva e dedicada durante essa trajetória.

Aos meus irmãos, Humberto Filho e Maurício, pelo apoio, carinho e amizade.

AGRADECIMENTOS

Agradecer significa demonstrar reconhecimento e gratidão a todos que colaboraram não só com minha vitória ao final de um processo de trabalho, mas com a vitória da parceria no mundo da pesquisa científica, pois ao término deste estudo todos nós crescemos um pouco. Portanto, gostaria de registrar meus sinceros agradecimentos...

Ao **Prof Dr. Richard L. Guerrant**, por ter me acolhido de braços abertos em seu laboratório, para me conceder as primeiras orientações, amizade e por compartilhar um sonho de uma sociedade mais justa, fraterna e mais humana, com a saúde como ponte para liberdade.

Ao meu orientador **Prof Dr. Carlos Maurício Castro Costa**, por ter me conduzido ao mundo da pesquisa em Neurociência e, ao longo da nossa amizade, por estar sempre presente, incentivando minhas realizações profissionais e pessoais.

Ao meu co-orientador **Prof Dr. Aldo A.M. Lima**, por suas valiosas contribuições, não só por ocasião da qualificação do meu projeto, mas também durante todo o seu processo de execução nos diversos e ricos encontros que tivemos.

À **Profª Dra. Gerly A.C. Brito**, não só por acreditar no meu potencial durante a trajetória desta investigação, mas também pela orientação segura e compreensão nos momentos difíceis. Essa tese também representa uma sincera homenagem a toda sua amizade e desprendimento.

Ao **Dr. Peter D. Patrick** e **Dr. James Blackman** do Centro de Reabilitação para Crianças (Kluge) do Departamento de Pediatria, Universidade de Virginia, pela orientação, apoio e preciosa amizade.

Aos novos amigos **Bené** e **Raquel**, que me acolheram no meu exílio em terra estranha, sempre incentivando meu crescimento pessoal e profissional.

À **Leah J. Barret**, pela sua disponibilidade e contribuição valiosa por ocasião da execução desse trabalho.

A todos do **Centro para Saúde Global** da Universidade de Virginia, incluindo funcionários, pesquisadores e colaboradores pela invulgar amizade e prestigiosa ajuda durante todas as etapas da pesquisa de laboratório.

Ao **Departamento de Fisiologia e Farmacologia**, por me conceder a oportunidade de contribuir e crescer junto com a sua Pós-graduação *stricto sensu*.

Ao corpo de **docentes** e **funcionários** do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e Morfologia, especialmente da Pós-graduação pela colaboração na minha trajetória.

À minha **turma**, pelo convívio harmônico, perseverança e troca de experiências, especialmente por estarem sempre presentes me apoiando nas dificuldades.

Ao **Grant ABC (Action Building Capacity) dos Institutos de Saúde Americanos (NIH)**, pela concessão da bolsa que possibilitou a realização deste trabalho e pela constante valorização da pesquisa médica no Brasil para melhorar os nossos graves problemas sociais e fomentar o desenvolvimento da pesquisa local e formação de novos pesquisadores.

À **Universidade de Fortaleza**, por conceder incentivo de pós-graduação para o desenvolvimento desse estudo.

Ao **Prof. Antônio David Morano** e à **Profª Fátima Veras**, pelo incentivo e apoio e pela liberação das minhas atividades da Universidade de Fortaleza, para completar esse doutoramento.

Aos meus **ex-alunos** que colaboraram com a minha formação e com o despertar da docência na minha vida profissional.

Em especial, às crianças e familiares que participaram desse estudo e possibilitaram o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos agentes de saúde e todos os funcionários do **Instituto de Biomedicina** que colaboraram diretamente com esse trabalho, na coleta dos dados e atendimento das crianças.

Ao **Prof. Dr. Alberto Soares** pela grande humanidade, e exemplo de amizade.

Ao **Prof. Danúbio Bezerra**, Aila Fontenele e aos **Drs. Laise e Hélio Vieira** do Laboratório de Biologia Molecular – UFC, pelo primeiro treinamento com PCR e biologia molecular.

À **Addya e Debra Leonard** da Universidade da Pensilvânia por cederem controles para o nosso estudo genético e por importantes informações e conselhos sobre a metodologia desse trabalho.

À **Dra. Beatriz Lopes** pela grande amizade e apoio durante minha estadia na Universidade de Virgínia.

A todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente comigo neste caminhar e ao longo de todo o meu processo de crescimento humano e profissional, o meu muito obrigado!

RESUMO

Os polimorfismos da apolipoproteína E (APOE) têm se constituído no principal método para identificar grupos de risco para desenvolver a doença de Alzheimer de início tardio e para servir de prognóstico da recuperação da função cognitiva após traumatismo craniano. Entretanto, o impacto da APOE no desenvolvimento cognitivo de crianças de áreas pobres do Brasil, onde nós já temos encontrado associações profundas e significativas entre os eventos de diarreia infantil precoce (aos 0-2 anos de idade) com o comprometimento duradouro do crescimento, cognição e performance escolar, não é ainda conhecido. Portanto, nós conduzimos um estudo da genotipagem da APOE em 72 crianças da Comunidade Gonçalves Dias, em Fortaleza, Nordeste do Brasil, acompanhadas por um projeto coorte desde o nascimento, utilizando DNA extraído de amostras de células bucais. Nesse trabalho, encontramos uma elevada frequência dos alelos da APO ϵ 4 (18% vs 9-11% esperada) em crianças com baixa morbidade de diarreia. Quando avaliamos as crianças que apresentaram elevada morbidade de diarreia (\geq mediana de 7 episódios nos primeiros 2 anos de vida), àquelas portadores do alelo APO ϵ 4 mostraram uma melhor performance cognitiva no subteste de coding ($39 \pm 9,9$; $n=7$, $p=0,01$), quando comparadas com crianças negativas para o alelo APO ϵ 4 com similar morbidade de diarreia ($25 \pm 12,7$; $n=27$). Correlações positivas entre a ocorrência do alelo APO ϵ 4 e os escores de coding permaneceram, mesmo após controlar para renda familiar, educação materna e aleitamento materno ($p<0,05$). Além disso, o grupo positivo para APO ϵ 4, com elevada morbidade de diarreia, preservou a fluência semântica e a diferença média dos escores de fluência semântica (DIFF), $n=73$, $p=0,025$, um coeficiente padrão para avaliar o impedimento desproporcional da fluência verbal. Nossos achados, portanto, mostram que o alelo APO ϵ 4 é relativamente comum em crianças da Comunidade Gonçalves Dias, no Nordeste do Brasil, e sugerem um papel protetor do alelo APO ϵ 4 em crianças com história de alta morbidade de diarreia nos primeiros dois anos de idade.

Palavras-chave: *apolipoproteína E, cognição, crianças, diarreia, DNA de células bucais, fluência semântica*

ABSTRACT

Polymorphisms in the apolipoprotein E (APOE) have constituted the major rationale to identify potential risk groups for developing late-onset Alzheimer's disease and help to predict recovery of cognitive function after brain injury. However, the APOE impact on cognitive development in children living in poor areas of the developing world, where we have discovered profound significant associations of early childhood diarrhea (at 0-2 yo) with lasting impairments of growth, cognition and school performance, is not known. Therefore, we conducted APOE genotyping in 72 Brazilian shantytown children under active surveillance since birth, using purified DNA extracted from buccal cell samples. We found a high frequency of APOE4 alleles (18% vs 9-11% expected) in children with lower diarrhea burdens. When we examined the children who experienced the heavier diarrhea burdens (\geq median of 7 illnesses in the first 2 years of life), those with APOE4 did significantly better in the coding subtest (39 ± 9.9 ; $n=7$, $p=0.01$), when compared with APOE4 negative children with similar diarrhea burdens (25 ± 12.7 ; $n=27$). Positive correlations between the APOE4 occurrence and coding scores remained even after adjusting for family income, maternal education and breast-feeding ($p<0.05$). Moreover, the APOE4 positive group, under heavy burdens of diarrhea, preserved semantic fluency and the mean difference in fluency scores (DIFF), $n=73$, $p=0.025$, a standardized coefficient for disproportional verbal fluency impairment. Our findings show that APOE4 is relatively common in children from the Gonçalves Dias Community in the Northeast Brazil and suggest a protective role of APOE4 allele in children with a history of heavy burdens of diarrhea in their first 2 years of life.

Key words: *apolipoprotein E, cognition, children, diarrhea, buccal cell DNA, semantic fluency.*

LISTA DE ABREVIATURAS

β -VLDLs	lipoproteínas ricas em colesterol no plasma com alto conteúdo de apoE
ABCA1	transportador ligado a adenosina A1
Ach	acetilcolina
AMPA	ácido propiônico α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol
ARP	<i>argenin-riched protein</i> , proteína rica em argenina
CETP	proteína de transferência do estér de colesteril
cm	centímetro
CNTF	fator neurotrófico ciliar
DA	Doença de Alzheimer
DALYs	<i>Disability Adjusted Life Years</i> = Anos de Vida Perdidos por Incapacitação
DC	doença coronariana
DiA	diarréia aguda
DIFF	diferença dos escores de fluência verbal
DMPC	dimetil fosfatidilcolina
DP	diarréia persistente
EEG	eletroencefalográfico
g	grama

GPS	<i>Global Position System</i>
GSF	fator sinaptogênico derivado da glia
HAZ	altura por idade
HDL	lipoproteínas de alta densidade
HDL ₁	HDL-contendo apoE
HL	lipase hepática
HLP	hiperlipoproteinemia
HLP III	hiperlipoproteinemia tipo III
HSPG	heparano-sulfato proteoglicanas
IRM	imagem por ressonância magnética
LCAT	lecitina-éster-colesterol-acetil-transferase
LCE	lesão do córtex entorrinal
LCR	líquido céfalo-raquidiano
LDL	lipoproteínas de baixa densidade
LDLR	receptor de lipoproteína de baixa densidade
LPL	lipase lipoprotéica
LRP	proteína relacionada com o receptor LDL
LTM	<i>Long term memory</i> = memória de duração longa
LTP	<i>Long Term Potentiation</i> = potenciação de longo prazo
ml	mililitro
NCHS	Centro Nacional de Estatística em Saúde

Neuro-2a	células de neuroblastoma
NMDA	N-metil-D-Aspartato
NPC1	proteína Niemann-Pick 1 tipo C
°C	graus celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação da cadeia de polimerase
PCR-RFLP	Polimorfismo por fragmento de restrição por PCR
QI	quociente de Inteligência
RGCs	células ganglionares da retina
RNA _m	RNA mensageiro
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
STM	<i>Short term memory</i> = memória de duração curta
TONI III	Teste de Inteligência Não Verbal III
VLDL	lipoproteínas de muito baixa densidade
WAZ	peso-por-idade
WHZ	peso-altura-por-idade
WISC-III	Escala de Inteligência de Wechsler para crianças III

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura tridimensional da apoE, mostrando as diferenças entre as suas isoformas.	32
Figura 2: Representação esquemática das pontes iônicas que diferenciam as isoformas APOE3 e APOE4 e influenciam na configuração estrutural e propriedades biológicas.	33
Figura 3: Separação isoelétrica do VLDL, após extração lipídica, mostrando três fenótipos homozigotos da apoE, E2/2, E3/3 e E4/4.	35
Figura 4: Eliminação das lipoproteínas remanescentes no fígado.	38
Figure 5: Vias principais para o movimento do colesterol no corpo.	41
Figura 6: (A) Efeito dos alelos da apoE nos parâmetros de lipídios. (B) Efeitos dos fenótipos da apoE nos níveis plasmáticos da apoE e apoB.	46
Figura 7: Ciclo vicioso da diarreia e desnutrição.	76
Figura 8: Vista área do Gonçalves Dias onde se encontra a população do estudo.	83
Figura 9: Genotipagem da Apolipoproteína E pela enzima de restrição <i>HhaI</i>	91
Figura 10: Área utilizada para genotipagem da APOE no laboratório do Centro para Saúde Global da Universidade de Virgínia	97
Figura 11: Seqüências de DNA e da proteína de regiões amplificadas, codificando isoformas comuns da apoE e localização dos sítios de clivagem da <i>HhaI</i> .	98
Figura 12: Diagrama dos mapas de clivagem pela enzima <i>HhaI</i> e separação eletroforética dos fragmentos de restrição, depois do	99

processo de amplificação a partir de PCR.	
Figura 13: Genotipagem da apolipoproteína E a partir de digestão pela enzima de restrição <i>HhaI</i> , usando DNA purificado de amostras de células bucais.	100
Figura 14: Indicadores de desnutrição ao nascimento (0) e aos 2 anos (24) de idade, ilustrados em z escores em 77 crianças coortes do Gonçalves Dias.	112
Figura 15: Escores dos testes cognitivos (exceto fluência verbal), aplicados nas crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarreicas nos primeiros dois anos de idade.	113
Figura 16: Correlação entre os escores de QI (TONI-III) aos 6-12 anos de idade e o número de episódios de diarreia nos 2 primeiros anos em 64 crianças coortes do Gonçalves Dias.	114
Figura 17: Escores dos testes cognitivos (exceto fluência verbal), aplicados nas crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarreicas nos primeiros dois anos de idade.	115
Figura 18: Correlação entre os escores de fluência verbal aos 6-12 anos de idade e o número de episódios de diarreia nos 2 primeiros anos em 73 crianças coortes do Gonçalves Dias.	116
Figura 19: Escores de fluência verbal, incluindo fluências Semântica e Fonética, em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarreicas nos primeiros dois anos de idade.	119
Figura 20: Escores de fluência verbal de acordo com a faixa etária em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarreicas (diarreia persistente e não persistente) nos primeiros dois anos de idade.	121

Figura 21: Escores de fluência verbal, incluindo fluências Semântica e Fonética, em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarréias nos primeiros dois anos de idade.	122
Figura 22: Escores de fluência verbal em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarréicas (em quartis) nos primeiros dois anos de idade.	123
Figura 23: Correlação entre os escores de fluência fonética com o número de episódios e dias de diarréia nos 2 primeiros anos em 73 crianças coortes do Gonçalves Dias.	126
Figura 24: Correlação entre os escores fluência semântica com número de episódios e dias de diarréia nos 2 primeiros anos em 73 crianças coortes do Gonçalves Dias.	127
Figura 25: Escores de fluência semântica de acordo com a faixa etária em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarréicas (diarréia persistente e não persistente) nos primeiros dois anos de idade.	128
Figura 26: Escores de fluência semântica de acordo com a faixa etária em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarréicas nos primeiros dois anos de idade.	129
Figura 27: Escores de fluência fonética de acordo com a faixa etária em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarréicas nos primeiros dois anos de idade.	130
Figura 28: Escores de Coding de acordo com a faixa etária em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarréicas nos primeiros dois anos de idade.	131

Figura 29: Produtos de amplificação (270 bp), resolvidos em 2% agarose gel, após protocolo de PCR.	136
Figura 30: Genotipagem da apolipoproteína E a partir de digestão pela enzima de restrição <i>HhaI</i> , usando DNA purificado de amostras de células bucais.	137
Figura 31: Seqüenciamento do gene da APOE após purificação do produto de PCR ao nível do motif 112 em quatro diferentes amostras. Notar a seqüência TGC, em destaque (presente nos alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 3$, mas não no alelo $\epsilon 4$).	138
Figura 32: Seqüenciamento do gene da APOE após purificação do produto de PCR ao nível do motif 158 em quatro diferentes amostras. Notar a seqüência CGC em destaque (presente nos alelos $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$, mas não no alelo $\epsilon 4$).	139
Figura 33: Crianças APO $\epsilon 4$ negativas não apresentaram uma melhor performance em todos os testes cognitivos avaliados, quando comparadas com as crianças APO $\epsilon 4$ positivas.	142
Figura 34: Escores de Coding em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarréicas nos primeiros dois anos de idade.	143
Figura 35: Escores de Fluência Semântica em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarréicas nos primeiros dois anos de idade.	144
Figura 36: Diferença Média dos Escores de Fluência (DIFF) em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade das doenças diarréicas nos primeiros dois anos de idade.	145
Figura 37: A. Aumento de sinaptogênese e extensão dendrítica ao longo dos dois primeiros anos de vida, no córtex frontal humano, representando um período crítico de plasticidade neuronal. B.	151

<p>Crescimento do cérebro humano no período pós-natal, comparado com outras espécies animais.</p>	
<p>Figura 38: Diagrama esquemático do controle da função executiva e memória semântica. Notar que o córtex frontal e áreas subcorticais são necessários para o acesso da memória semântica (memória conceitual), incluída no substrato do lobo temporal.</p>	163
<p>Figura 39: Diagrama das áreas neuroanatômicas envolvidas no armazenamento e acesso da memória semântica, requeridas durante os testes de fluência verbal e um modelo proposto para o efeito da diarreia e desnutrição.</p>	164
<p>Figura 40: Latência de respostas idealizadas em um teste de fluência semântica em pacientes com doença de Alzheimer (DA), doença de Huntington (HD) e seus controles (CI=controle idoso; CA= controle adulto).</p>	169

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características demográficas e dados antropométricos das 77 crianças do estudo coorte com história de diarreia, aos 6-12 anos de idade, em Fortaleza-CE, Brasil.	111
Tabela 2: Características demográficas, QI e escores de fluência verbal em 73 crianças da comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de diarreia nos dois primeiros anos de idade.	117
Tabela 3: Média e desvios padrões dos escores de fluência verbal e história de diarreia das 73 crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias de acordo com a idade.	118
Tabela 4: Análises de regressão linear dos escores de fluências semântica e fonética nas 73 crianças coortes (faixa etária de 6-12 anos), com história de diarreia infantil (0-2 anos de idade), em relação aos indicadores nutricionais, escores neuropsicológicos, e parasitas intestinais.	120
Tabela 5: Análises de regressão linear em múltiplas etapas dos escores de fluência fonética e semântica em 44 crianças coortes (faixa etária de 6-12 anos), com história de diarreia infantil aos dois anos de idade, levando-se em conta indicadores nutricionais e parasitas intestinais.	124
Tabela 6: Comparação dos grupos de acordo com a história de diarreia infantil nos primeiros 2 anos de vida e escores de fluência verbal em 73 crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias.	125
Tabela 7: Quantidade total e concentração de DNA e coeficientes de pureza em 72 amostras extraídas de células bucais.	135
Tabela 8: Genótipo da ApoE e frequência alélica (f) em crianças coortes (6-12 anos de idade) com diferentes morbidades de diarreia	140

na Comunidade Gonçalves Dias (GD), Fortaleza-CE, Brasil (N=72).	
Tabela 9: Genótipos e frequência alélica, de acordo com a performance nos testes cognitivos em crianças do Gonçalves Dias, Fortaleza-CE, Brasil.	141
Tabela 10: Impacto do alelo APO ϵ 4 na performance cognitiva de acordo com a história de diarreia.	146
Tabela 11: Dados demográficos, antropométricos e nutricionais da população do estudo, de acordo com a distribuição dos alelos APO ϵ 4.	147

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Sumário das características e aplicações dos testes neuropsicológicos utilizados.	89
Quadro 2: Seqüenciamento da região amplificada do gene da APOE humana.	101
Quadro 3: Medidas antropométricas em z escores correspondendo ao número de desvios padrão acima ou abaixo dos valores de mediana do Centro Nacional de Estatística em Saúde (NCHS).	103

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Apolipoproteína E	24
1.1.1. Estrutura e função	24
1.1.2. ApoE e o tecido nervoso	44
1.1.3. Evolução e Distribuição dos alelos APOE no mundo	57
1.1.4. Neuroplasticidade	60
1.1.5. Desnutrição, doenças diarréicas e declínio cognitivo	66
2. JUSTIFICATIVA, HIPÓTESE E OBJETIVOS	74
2.1. Justificativa	75
2.2. Hipótese	77
2.3. Objetivos	78
2.3.1. Objetivos Gerais	78
2.3.2. Objetivos Específicos	78
3. DESENHO EXPERIMENTAL E MÉTODOS	79
3.1. Local e População do Estudo	80
3.1.1. Sujeitos	80
3.2. Projeto Coorte	81
3.2.1. Critério de Diarréia	81

3.3. Critérios de Inclusão e Exclusão do Estudo	82
3.4. Recrutamento dos Sujeitos	84
3.5. Proteção Contra Riscos	84
3.6. Proteção da Confidencialidade	85
3.7. Cronograma Experimental	86
3.8. Procedimentos e Testes Neuropsicológicos	86
3.9. Colheita de Células Bucais	90
3.10. Extração do DNA	92
3.10.1. Protocolo de Extração do DNA a partir de Células Bucais	92
3.10.2. Tratamento pela RNase	93
<i>3.10.3. Precipitação de Proteínas</i>	93
<i>3.10.4. Precipitação do DNA</i>	94
<i>3.10.5. Hidratação do DNA</i>	94
3.11. Protocolo para Genotipagem	95
3.11.1. Protocolo para Seqüenciamento do Gene da APOE	101
3.12. ANTROPOMETRIA E INDICADORES DE NUTRIÇÃO	102
3.13. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	104
4. RESULTADOS	106
4.1. Dados Demográficos em 77 crianças do estudo coorte	107
4.2. Testes cognitivos em 77 crianças do estudo coorte	107
4.3. Purificação do DNA e Genotipagem da APOE	132

4.4. Dados demográficos de acordo com a genotipagem da APOE	132
4.5. Testes cognitivos de acordo com a genotipagem da APOE	133
5. DISCUSSÃO	148
5.1. Comprometimento da fluência semântica	149
5.2. O déficit cognitivo e o polimorfismo da APOE	154
5.3. APOE e doenças parasitárias	157
5.4. Substrato anatômico da memória semântica	160
5.5. Perspectivas	167
5.6. O alelo APOε4 preserva a fluência semântica em crianças com pesada morbidade de diarreia: Um fator de sobrevivência?	170
6. CONCLUSÃO	174
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	177
APÊNDICE	200

1. INTRODUÇÃO

1.1. Apolipoproteína E

1.1.1. Estrutura e função

Lipoproteínas são vesículas transportadoras de lipídios que asseguram a solubilidade dos lipídios em líquidos biológicos. As partículas de lipoproteínas consistem de um núcleo não polar, contendo triglicerídios e ésteres de colesterol, envoltos por uma monocamada de fosfolipídios. A extremidade polar do grupo de fosfolipídios é orientada para a fase aquosa, contribuindo para estabilizar a partícula lipoprotéica e garantindo sua solubilidade. O colesterol não esterificado e as proteínas anfipáticas, apolipoproteínas, também estão presentes na superfície da monocamada, onde ficam disponíveis para interagir com fosfolipídios de outras partículas lipoprotéicas e com as membranas celulares. As apolipoproteínas podem agir como cofatores em reações enzimáticas durante o metabolismo lipídico ou atuarem como ligantes para receptores celulares, os quais medeiam o influxo dessas partículas de lipoproteínas para seu metabolismo subsequente (BASSETT et al, 2000; LADU et al, 2000; MAHLEY& RALL, Jr., 2000).

As apolipoproteínas, o único componente protéico das lipoproteínas, se unem com o colesterol livre, fosfolipídios, colesterol esterificado e alguns triglicerídios para formar lipoproteínas. O plasma humano contém cerca de uma dúzia de diferentes apolipoproteínas agrupadas em cinco tipos principais (A, B, C, D e E), algumas das quais são ainda categorizadas em subtipos (ex. A-I, -II e -IV; C-I, -II e III) (EICHNER et al, 2002).

Dentre as diversas apolipoproteínas plasmáticas, a apolipoproteína E é melhor caracterizada, considerando suas propriedades estruturais e funcionais. Em geral, as apolipoproteínas servem para regular o metabolismo das lipoproteínas e controlar o transporte e redistribuição do colesterol nos tecidos. As apolipoproteínas atuam de três maneiras principais: 1. estabilizam a estrutura pseudomicelar das

partículas lipoprotéicas, devido a sua capacidade de se ligar aos lipídios. 2. podem agir com cofatores ou ativadores de várias enzimas ou proteínas de transferência de lipídios, participando no metabolismo e remodelagem das lipoproteínas que circulam no plasma. 3. Servem de ligantes para receptores de superfície celular para as lipoproteínas. Outras funções atribuídas à apolipoproteína E incluem um papel na imunorregulação, na regeneração de nervos periféricos, na modulação do colesterol durante a esteroidogênese em células adrenais, e como ativadora ou moduladora da lipase hepática (HL), lipase lipoprotéica (LPL) e da lecitina-éster-colesteril-transferase (LCAT) (WEISGRABER, 1990; WEISGRABER, 1994).

A primeira descrição da apolipoproteína E foi publicada em 1973 por Shore & Shore, sendo inicialmente identificada como um dos componentes das lipoproteínas de muito baixa densidade, com alto conteúdo de colesterol, VLDL, sendo, chamada de *argenin-riched protein*, ARP, (proteína rica em arginina), porque ela apresentava um elevado conteúdo de arginina, comparada com outras apolipoproteínas, cuja composição de aminoácidos já era conhecida na época. Em 1975, Utermann sugeriu a designação de "apoE" para esta proteína, de acordo com a nomenclatura alfabética em voga para designar estas proteínas. Entretanto, esta designação não foi universalmente adotada por vários anos. Assim, durante o final da década de 70 (do século XX), esta apolipoproteína continuou sendo chamada tanto de ARP ou apoE (WEISGRABER, 1994).

Utermann, em 1975, foi o primeiro a descrever a técnica de separação isoelétrica da apoE em um gel de poliacrilamida, mostrando sua heterogeneidade fenotípica em múltiplas bandas e foi o pioneiro a reconhecer que o polimorfismo da apoE era geneticamente determinado. A base genética do polimorfismo foi melhor compreendida em 1981 com Zannis & Breslow, que propuseram o modelo de três alelos em um único *locus* gênico, para explicar o padrão de múltiplas bandas (MAHLEY & RALL, Jr., 2000; WEISGRABER, 1994).

Em 1982, a nomenclatura proposta para os produtos (isoformas) dos três alelos, designados como apoE2, apoE3 e apoE4, foi adotada pela comunidade científica. A designação numérica leva em conta o *pI* relativo de cada proteína durante separação isoelétrica em gel, sendo a apoE2 a isoforma mais ácida (*pI* ~

5.7); e a apoE4, a isoforma mais básica ($pI \sim 6.1$), considerando a posição da apoE1 para as isoformas sializadas. Os fenótipos homozigotos, portanto, foram descritos como: E2/2; E3/3 e E4/4 e os fenótipos heterozigotos como: E3/4; E2/4 e E2/3 (WEISGRABER, 1994).

Apolipoproteína E (proteína, apoE; alelo, APOE) é um dos constituintes das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), sintetizadas pelo fígado e uma subclasse de lipoproteínas de alta densidade (HDL), envolvidas no transporte do colesterol entre as células. ApoE medeia a ligação de alta afinidade, entre as partículas de lipoproteína, contendo apoE, ao receptor LDL (receptor de lipoproteína de baixa densidade), portanto sendo responsável pela captação celular dessas partículas (PIEDRAHITA et al, 1992).

Lipoproteínas de muito baixa densidade, VLDL, (densidade $<1,006$ g/ml) são sintetizadas no fígado e participam no transporte de lipídios. Os triglicerídeos nessas partículas são hidrolisados pela lipase lipoprotéica no plasma e no fígado, gerando pequenas lipoproteínas ricas em colesterol, conhecidas como lipoproteínas de densidade intermediária, IDL, (densidade 1,006-1,019 g/ml) e lipoproteínas de baixa densidade, LDL (densidade 1,019-1,063 g/ml). Partículas menores de VLDL e LDL são referidas como VLDL remanescentes e são aterogênicas. Os VLDL e quilomícrons remanescentes são chamados de β -VLDL. Cerca da metade dos remanescentes de VLDL são eliminados diretamente pelo fígado, através de um processo mediado pela apoE. O restante é convertido em LDL, contendo apoB₁₀₀, o produto final do catabolismo do VLDL e a principal lipoproteína transportadora de colesterol no plasma (MAHLEY & HUANG, 1999).

Em modelos animais em cães, porcos e camundongos, alimentados com dieta rica em gorduras, ocorre o acúmulo de HDL-contendo apoE (também chamada de HDL₁ ou HDL_c). O HDL (lipoproteína de alta densidade), em complexo com apoE, representa uma importante classe de lipoproteína nessas espécies animais. Em humanos, o HDL associado com apoE é menos proeminente, transportando cerca de 20% do colesterol plasmático. A distribuição do HDL-contendo apoE, numa dada espécie, está relacionada com a atividade da proteína de transferência do éster de colesteril - *lecitina-éster-colesteril-transferase*

(LCAT). A LCAT transfere os ésteres de colesterol das HDLs para as VLDLs, IDLs e LDLs, pela troca de triglicerídios. Espécies com baixa ou nenhuma atividade de transferência (ratos, camundongos, cães e porcos) transportam a maior parte do colesterol plasmático em HDLs, nos quais o HDL-contendo apoE (HDL₁) é a subclasse principal. Em espécies com moderada ou elevada atividade de transferência pela LCAT (humanos, coelhos e primatas), as partículas de HDLs são menos proeminentes e a maioria do colesterol plasmático é transportado a partir das LDLs. Essa relação de “baixo HDL/alto LDL” é revertido em humanos com deficiência da enzima LCAT (MAHLEY & RALL, Jr., 2000).

A apoE também representa a principal proteína constituinte dos quilomícrons, sintetizados no intestino. Este papel é crítico. Seres humanos e camundongos transgênicos com deficiência da apoE desenvolvem uma grave retenção dos quilomícrons remanescentes no plasma. Um distúrbio na ligação da apoE com seus receptores resulta em acúmulo das partículas de lipoproteínas ricas em colesterol no plasma (β -VLDLs) com alto conteúdo de apoE, e constitui a causa da hiperlipoproteinemia tipo III (disbetalipoproteinemia familiar), uma doença genética caracterizada por elevados níveis de triglicerídios ($> 2\text{mMol/l}$) e colesterol plasmáticos ($>7,5\text{ mMol/l}$), associados a uma doença coronariana adiantada (ZAIYOU et al, 2000). Aproximadamente 90% dos pacientes com hiperlipoproteinemia tipo III (HLP III) são homozigotos para apoE2, mas somente 1-2% dessa população desenvolve a HLP III, sugerindo que outros genes ou fatores ambientais são necessários para a expressão da doença (MAEKAWA et al, 1995).

Os quilomícrons ($d < 0,95\text{ g/ml}$) são sintetizados no intestino e transportam o colesterol e triglicerídeos da dieta. Os triglicerídeos no núcleo dessas partículas são hidrolisados pela lipase lipoprotéica (uma enzima encontrada na superfície endotelial dos capilares, especialmente no tecido adiposo, coração e músculo esquelético), resultando na produção de remanescentes ricos em colesterol. Quando sintetizados e liberados do intestino, os quilomícrons não contêm apoE, mas à medida que circulam e são processados, essas partículas adquirem apoE de outras classes de lipoproteínas. Isso resulta no desvio da distribuição da apoE no plasma para os remanescentes. Os quilomícrons remanescentes, então, são

rapidamente removidos do plasma por um processo mediado pela apoE (WEISGRABER, 1994).

Nas espécies de mamíferos, a apoE é sintetizada e secretada predominantemente pelo fígado e cérebro, mas é também sintetizada nos tecidos periféricos, como nas adrenais, testículos, pulmões, linfonodos mesentéricos e rins. A apoE está associada com as lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) ou com uma subclasse de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e tem um papel no transporte reverso do colesterol (o colesterol dos tecidos periféricos é transportado para o fígado, tanto diretamente através da apoE-contendo HDL, ou pela transferência dos estéres de colesteril para partículas maiores, por ativação da enzima *colesteril-ester-transferase* via lecitinas), imunossupressão e possivelmente a promoção de interações célula-matriz (LADU et al, 2000; MAHLEY& RALL, Jr., 2000; YAMAUCHI et al, 1999).

A apolipoproteína E humana é uma proteína de 299 aminoácidos, com uma massa molecular de ~ 30 KDa, sendo sintetizada primariamente no fígado e no cérebro. O gene da apoE está localizado no braço longo do cromossoma 19q13.2, sendo polimórfico. O gene completo foi seqüenciado, contendo 3597 nucleotídeos em comprimento, com quatro exons e três introns. O gene com 3.6 Kb codifica uma proteína precursora de 317 resíduos de aminoácidos e um prepeptídeo de 18 aminoácidos (que serve de sinal durante a secreção), sendo co-traducionalmente removido. O gene também inclui regiões que codificam a apoC-I, apoC-I' e apoC-II (HOFKER, VAN VLIJMEN, HAVEKES, 1998; MAHLEY& RALL, Jr., 2000).

A digestão da apoE pela trombina, com pontos de clivagem nos resíduos 191 e 215, produz um fragmento de 22 KDa (resíduos 1-191), correspondente ao domínio NH₂-terminal e um fragmento de 10 KDa (resíduos 216-299), correspondente ao domínio COOH-terminal. A extensiva análise cristalográfica da apoE revelou que os domínios estruturais também definem os domínios funcionais. Enquanto a região NH₂-terminal é responsável pela ligação da apoE ao receptor LDL (a qual se liga à fração lipídica apenas fracamente), a região COOH-terminal medeia a ligação com a superfície das lipoproteínas, sem entretanto se ligar ao receptor LDL (WILSON et al, 1991).

A apoE possui, portanto, dois distintos domínios estruturais e funcionais, um domínio hidrofóbico e um domínio de ligação hidrofílico para o receptor. O domínio NH₂-terminal de 22 KDa contém a região de ligação da proteína com o receptor. Essa região foi identificada entre os resíduos 136 e 150 e é essencialmente formada de aminoácidos básicos, especialmente constituída por aminoácidos de lisina e arginina, que são essenciais para ligação ao receptor e à fração de heparina. Na ausência de lipídios, nem o domínio NH₂-terminal, nem a molécula de apoE inteira é reconhecida pelo receptor LDL. O domínio NH₂-terminal possui menor afinidade pelas lipoproteínas plasmáticas em relação ao domínio COOH-terminal, contudo, o domínio NH₂-terminal é capaz de se unir às vesículas fosfolipídicas e de transformá-las em complexos discóides, que se ligam ao receptor LDL, com uma eficiência similar à toda proteína. Os dois domínios estão unidos por uma região sensível à digestão por uma protease (MAHLEY & RALL, Jr., 2000; RAUSSENS et al, 2002).

Interações entre as regiões espacialmente distantes dos dois domínios têm um papel crítico na definição da atividade biológica da apoE; mudanças estruturais em um domínio podem influenciar as propriedades do outro domínio, um fenômeno referido como domínio de interação. Por exemplo, a heterotroca cisteína-arginina na posição 112, que distingue a apoE3 da apoE4, ocorre no domínio amino-terminal da molécula, mas influencia seu domínio de ligação lipídico na extremidade carboxi-terminal, alterando a afinidade por uma determinada classe de lipoproteína. A apolipoproteína E3 possui uma elevada afinidade pelo HDL, assim como a apoE2 (cisteína na posição 112), enquanto a apoE4 tem preferência pelo VLDL (arginina na posição 112). O domínio de interação é responsável pela afinidade de ligação às lipoproteínas pela apoE (WEISGRABER & MAHLEY, 1996).

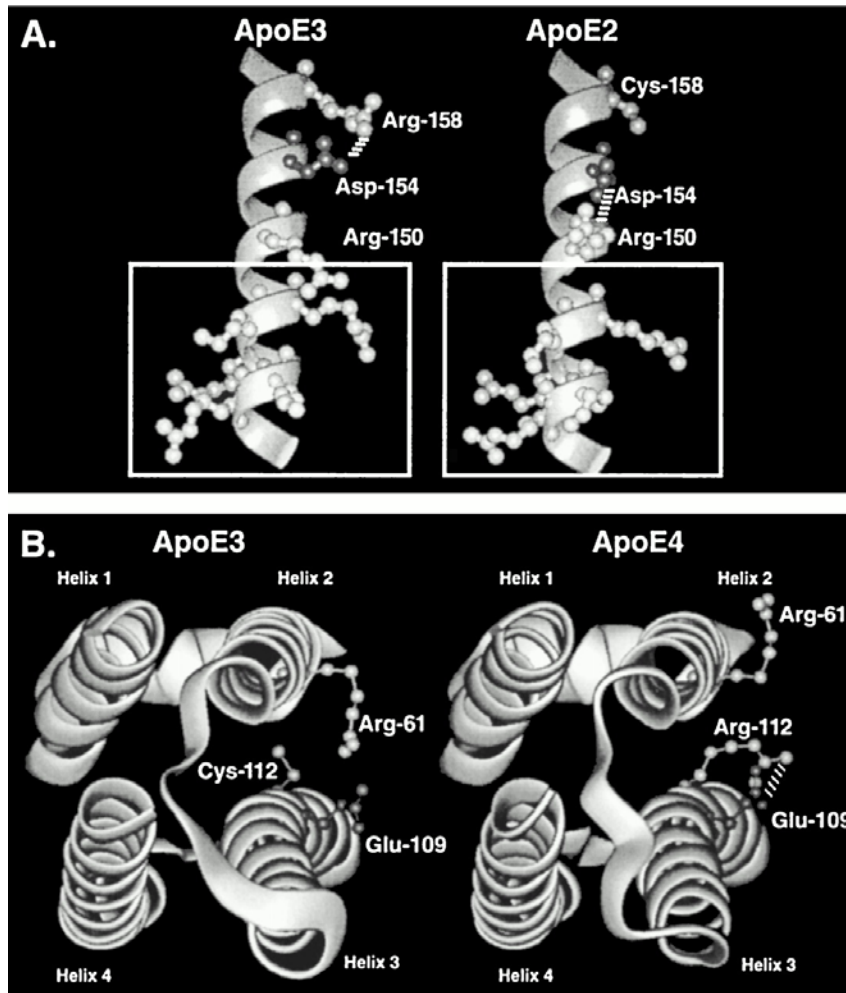
A isoforma E4 possui uma atividade normal de ligação ao receptor LDL mas apresenta uma elevada taxa de *clearance* a partir do plasma em relação à apoE3. Em relação à apoE3, a isoforma apoE4 é mais encontrada em partículas de VLDL do que em partículas de HDL. Remanescentes dos quilomícrons são eliminados mais rapidamente em indivíduos com apoE4 do que naqueles com apoE3. A apoE4 está mais freqüentemente associada com a hiperlipoproteinemia (HLP) tipo V, caracterizada por uma marcante hipertrigliceridemia, devido ao acúmulo de

quilomícrons e VLDL, assim como um maior risco para pancreatite recorrente (MAEKAWA et al, 1995) (WEISGRABER, 1990).

As estruturas terciárias dos domínios amino-terminal das apoE4, apoE3 e apoE2 foram reconhecidas através de cristalografia por raios X de alta resolução, **Figura 1**. O domínio aminoterminal da apoE exibe uma hélice quádrupla, com os seguintes limites: hélix 1, resíduos 24-42; hélix 2, resíduos 54-81; hélix 3, resíduos 87-122; hélix 4, resíduos 130-164. Uma hélice acessória curta (resíduos 44-53) conecta as hélices 1 e 2. As quatro hélices estão dispostas num arranjo anti-paralelo. Os sítios de ligação à heparina e ao receptor, que são essencialmente coincidentes, se dispõem ao longo da hélice 4. As estruturas das três isoformas possuem uma variação sutil, porém importante. A substituição da cisteína por arginina no resíduo 158 na apoE2, quando comparada com a apoE3, altera drasticamente as pontes iônicas ao longo da hélice 4 e entre as hélices 3 e 4, além disso, reduz o potencial iônico positivo do sítio de ligação com o receptor (resíduos 140-150). A substituição da arginina por cisteína no resíduo 112 na apoE4 (comparado com a apoE3) causa uma apreciável mudança da orientação na cadeia molecular de resíduos específicos, assim como, novos rearranjos de algumas pontes iônicas. A presença da arginina no resíduo 112 na apoE4 leva a formação de novas pontes iônicas entre o ácido glutâmico 109 e o resíduo 112 na hélice 3, e mais importante, causa a mudança da arginina 61, que adota uma posição diferente e mais exposta na hélice 2 (MAHLEY & RALL, Jr., 2000; WILSON et al, 1991), **Figuras 1 e 2**.

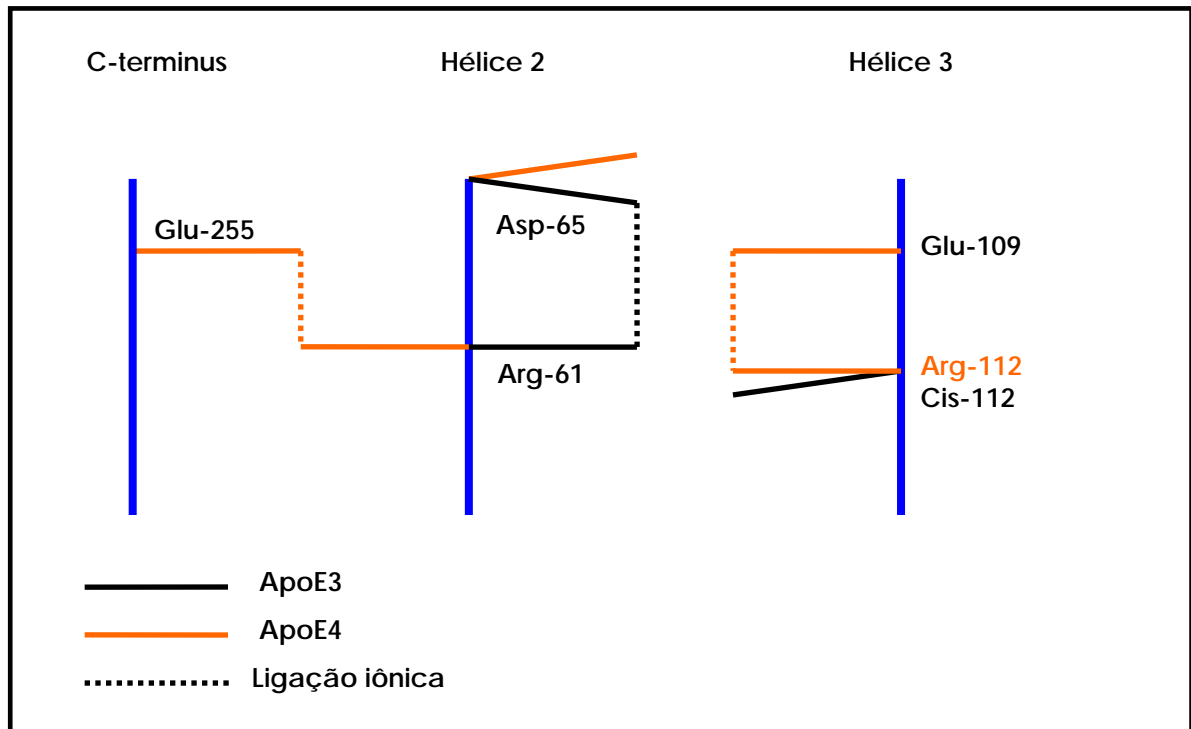
O ácido aspártico 154 muda sua interação iônica para arginina 150 na apoE2, por causa da substituição pela cisteína 158, deslocando a cadeia lateral da arginina 150 para fora da região de concentração iônica positiva, reduzindo em 100X seu potencial catiônico e causando uma redução na afinidade de ligação ao receptor LDL. (B) Estrutura em hélice quádrupla da apoE, mostrando o rearranjo crítico da cadeia lateral da arginina 61. A substituição pela arginina 112 na apoE4 leva a uma interação iônica com o ácido glutâmico 109, que exclui a cadeia lateral da arginina 61 da sua posição usual, levando a arginina 61 a ficar mais exposta lateralmente na hélice 2, permitindo sua interação com o ácido glutâmico 255 no domínio carboxi-terminal da apoE. Essa alteração confere a afinidade específica por uma classe de lipoproteína, **Figura 2**.

A estrutura cristalina do domínio hidrofílico da apoE é homóloga estruturalmente ao domínio hidrofílico da família de fatores de crescimento de quatro-hélices, incluindo o fator neurotrófico ciliar (CNTF), (GUTMAN et al, 1997). Ambas as proteínas apoE e CNTF formam homodímeros, representando um ligante de alta afinidade para vários receptores hepáticos de lipoproteínas, incluindo o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR) e proteínas relacionadas, e para as proteoglicanas heparanossulfatadas de superfície celular. A partir da capacidade de se ligar a esses receptores, a apoE participa do metabolismo dos lipídios e na homeostase do colesterol (ZAIYOU et al, 2000).



Fonte: Mahley, R.W., Rall, S.C., 2000

Figura 1: Estrutura tridimensional da apoE, mostrando as diferenças entre as suas isoformas. (A) A região da hélice 4 (enquadrada) é o sítio onde ocorre o rearranjo de uma ponte iônica na apoE2, reduzindo a carga iônica positiva no sítio de ligação para o receptor LDL.



Fonte: Bentley et al, 2002 (Biochem. J., 366, p. 275)

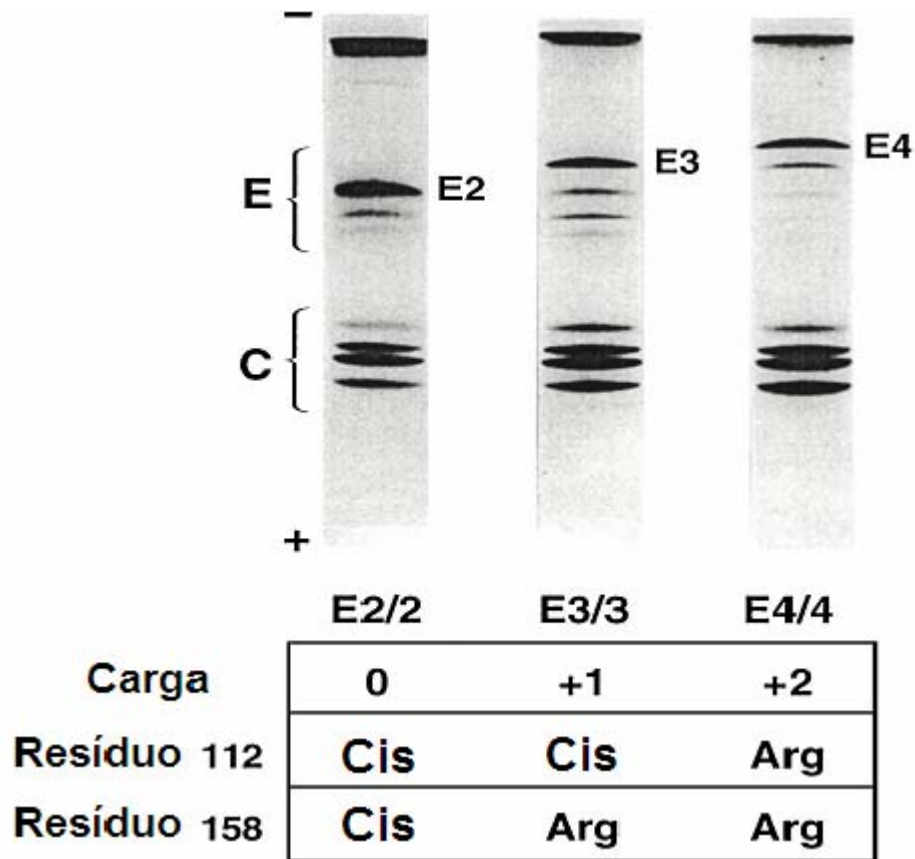
Figura 2: Representação esquemática das pontes iônicas que diferenciam as isoformas APO ϵ 3 e APO ϵ 4 e influenciam na configuração estrutural e propriedades biológicas.

A base molecular do polimorfismo é ilustrada por mudanças nos resíduos cisteína (TGC)-arginina (CGC), dos sítios 112 e 158, o que determina o aparecimento de três alelos co-dominantes. O polimorfismo leva a presença de seis genótipos diferentes em humanos, a saber: três homozigotos (ϵ_3/ϵ_3 , ϵ_2/ϵ_2 , ϵ_4/ϵ_4) e três heterozigotos (ϵ_2/ϵ_3 , ϵ_2/ϵ_4 , ϵ_3/ϵ_4) (BALLERINI et al, 2002; GUTMAN et al, 1997).

A apolipoproteína E humana existe em três isoformas principais, apoE2 (Cis¹¹², Cis¹⁵⁸), apoE3 (Cis¹¹², Arg¹⁵⁸) e apoE4 (Arg¹¹², Arg¹⁵⁸), as quais são codificadas por três alelos, ϵ_2 , ϵ_3 , ϵ_4 , num único *locus*. A isoforma apoE4 é a mais catiônica e difere da apoE3 por uma carga elétrica e da apoE2 por duas cargas elétricas. Um segundo tipo de polimorfismo, não geneticamente determinado, resulta da variação pós-traducional por sialização, que contribui para a adição de uma carga negativa. Essas isoformas sializadas contribuem com cerca de 10 a 20% da apoE plasmática. As variantes da sialização ocorrem pela ligação de carboidratos à molécula da apoE num sítio único: num sítio de *O*-glicosilação associado a um resíduo de treonina 194. As isoformas não sializadas da apoE carecem não somente do ácido siálico, mas de todos os outros açúcares neutros em geral (MAHLEY & RALL, Jr., 2000),

Figura 3.

A interação da apoE com os receptores de lipoproteínas é crítica para o metabolismo do colesterol e triglicerídios em humanos. A análise das seqüências de aminoácidos da apoE em dez espécies diferentes revelou que os domínios 140-150 de aminoácidos contêm lisinas nas posições 143 e 146 e argininas nas posições 142, 145, 147 e 150. Esses aminoácidos participam na ligação ao receptor LDL (LDLR) e são conservados ao longo da apoE2, apoE3 e apoE4 e em todas as espécies examinadas, com exceção dos bovinos, onde a prolina é substituída por arginina na posição 145. Esse alto grau de conservação entre as espécies sugere que esse domínio tem um papel crucial na interação iônica entre a apoE e seu receptor (ZAIYOU et al, 2000).



Fonte: Mahley, R.W., Rall, S.C., 2000

Figura 3: Separação isoeétrica do VLDL, após extração lipídica, mostrando três fenótipos homozigotos da apoE, E2/2, E3/3 e E4/4. As isoformas da apoE2, E3 e E4 diferem seqüencialmente pela diferença de uma unidade de carga iônica, como resultado da substituição dos aminoácidos ilustrados no quadro. As isoformas menores representam isoformas sializadas. Os pólos do cátodo (+) e ânodo (-) estão indicados, tanto quanto as posições das isoformas apoC do VLDL.

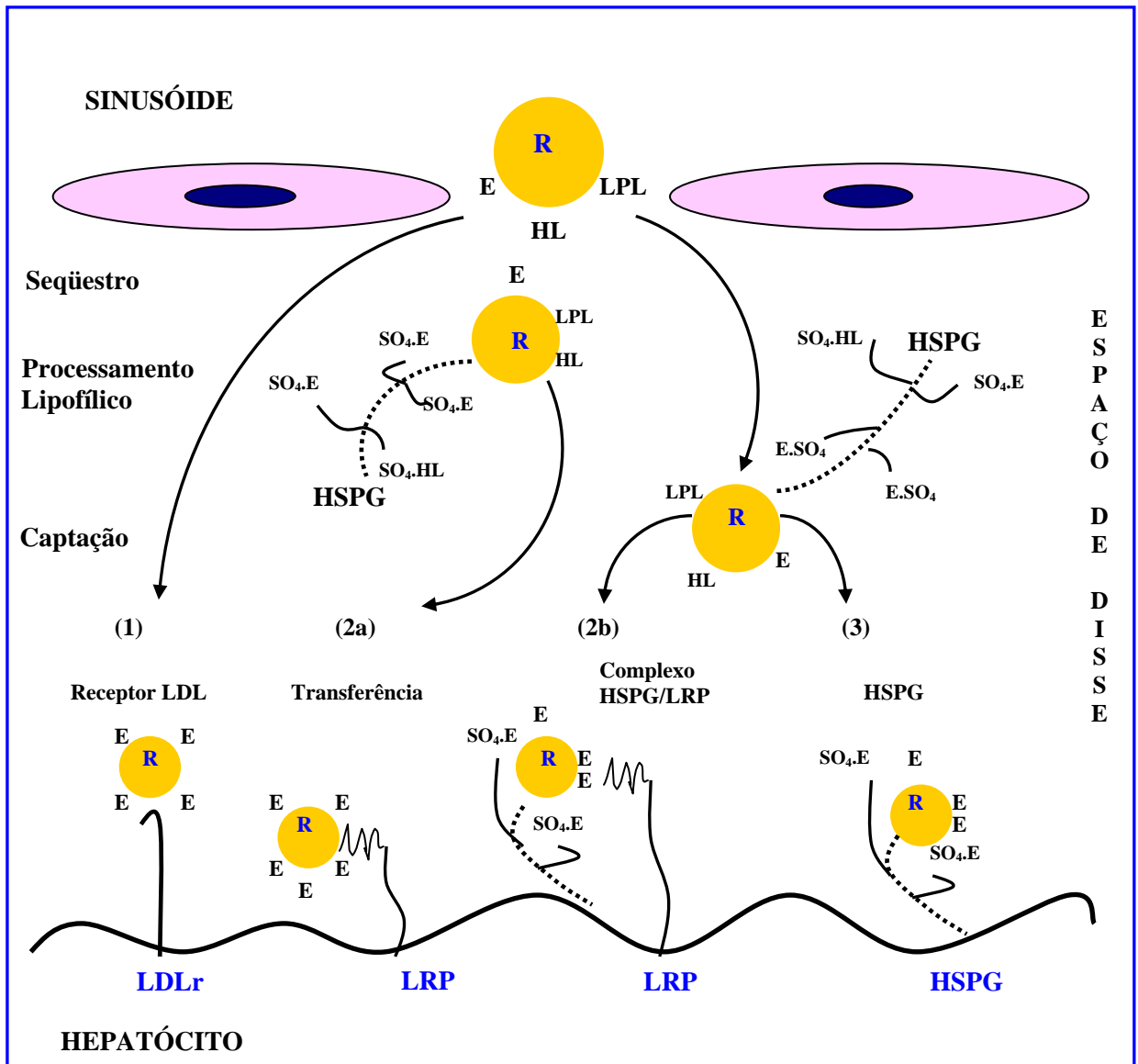
A ligação da apoE à família de receptores LDL requer a conservação de resíduos de lisina e arginina no domínio 136-150 da apoE. Mutagêneses dirigidas nos sítios 143, 146 e 147 demonstraram que a carga positiva e não a presença de aminoácidos básicos específicos é necessária para a ligação com o receptor LDL, juntamente com a adequada conformação da α -hélice anfipática (STRITTMATTER & BOVA, 2002).

O colesterol plasmático e as concentrações de LDL são influenciados pelo polimorfismo da apoE. Tem-se estimado que 60% das variações dos níveis do colesterol plasmático são geneticamente determinadas e que o polimorfismo da apoE é responsável por 14% dessa variação genética. O fenótipo da apoE afeta a concentração total de colesterol plasmático da seguinte forma: E2/2 < E2/3 < E3/3 < E3/4 < E4/4 (com exceção da hiperlipidemia tipo III) (WEISGRABER, 1990).

Hertz e colegas identificaram pela primeira vez a proteína relacionada com o receptor LDL, o LRP. O LRP possui uma ampla variedade de ligantes, incluindo a apoE. Juntamente com o LDLR, o LRP parece participar do *clearance* das lipoproteínas no fígado. O LRP na superfície hepática age interagindo com complexos heparano-sulfato proteoglicanas (HSPG) para completar o processo de acoplamento ligante-receptor. A apoE parece se ligar primeiro ao complexo HSPG antes de interagir com o LRP. Este papel do complexo HSPG no catabolismo das lipoproteínas remanescentes no fígado ratifica a relevância fisiológica da ligação da apoE com moléculas heparina-similes (MAHLEY & HUANG, 1999; MAHLEY & JI, 1999).

Num modelo proposto por Mahley et al, 1999, **Figura 4**, a captação das lipoproteínas remanescentes no fígado via HSPG-LRP ocorre através de três vias: seqüestramento, processamento e captação. Inicialmente, partículas de lipoproteínas são seqüestradas no espaço de Disse, rico em apoE, lá as partículas adquirem apoE, a qual interage com moléculas HSPG, ancoradas na superfície hepática. Durante esse processo, as lipoproteínas retidas passam por eventos lipolíticos envolvendo tanto a lipase lipoprotéica ligada à lipoproteína, quanto a lipase hepática ligada à superfície dos hepatócitos. O papel secretor e de captura da apoE facilita a interação das lipoproteínas com os receptores LDL, LRP ou HSPG

(atuando como receptor). As lipoproteínas contendo apoE são transportadas a partir do HSGP para a LRP, em seguida, ocorre a captação do complexo receptor-ligante por endocitose ou então a captação conjunta do complexo HSPG-LRP-lipoproteína pelos hepatócitos (MAHLEY & HUANG, 1999; MAHLEY & JI, 1999).



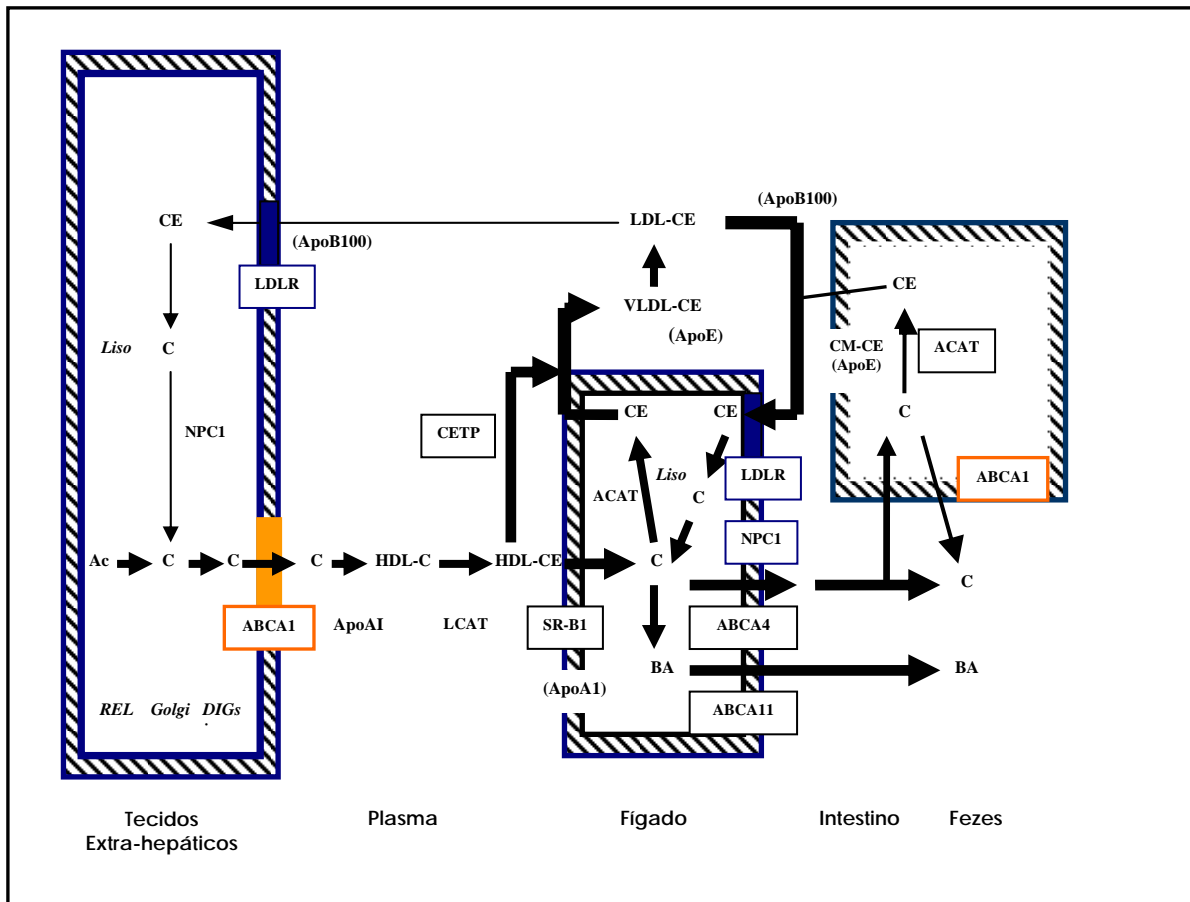
Fonte: Mahley, R.W., Huang, Y., 1999

Figura 4: Eliminação das lipoproteínas remanescentes (R) no fígado, através de três vias principais: (1) captação direta pelo receptor LDL, (2) via proteína relacionada com o receptor LDL (LRP), em complexo com heparano-proteoglicana, HSPG-LRP, (2a) remanescentes transferidos para captação a partir da LRP ou (2b) através da internalização do HSPG-LRP e (3) captação mediada apenas pela HSPG. **LDLr**, receptor LDL; **LRP**, proteína relacionada com o receptor LDL; **HSPG**, heparanosulfato proteoglicana; **LPL**, lipase lipoprotéica; **LH**, lipase hepática; **E**, ApoE; **R**, remanescentes de lipoproteínas.

A maioria do colesterol é proveniente da síntese de novo em tecidos extra-hepáticos. O colesterol se desloca do retículo endoplasmático, ao longo do aparelho de Golgi e por complexos ricos em glicosíngolipídios para estabelecer microdomínios na membrana plasmática, como nas cavéolas. Embora, algum esterol também se movimente lateralmente na fase lipídica da membrana, a maioria deixa a célula pela influência do transportador ABCA1 (transportador ligado a adenosina A1), sendo ligado a apoA1 e então esterificado através da lecitina-colesterol acetiltransferase. A porção de éster de colesteril pode ainda ser transferida para uma partícula de lipoproteína apoB, sendo posteriormente metabolizada no fígado. O restante de éster de colesteril é conduzido diretamente para o fígado, utilizando o transportador SRB1, *scavenger* receptor tipo I classe B. Ao mesmo tempo, menores quantidades de colesterol são absorvidas nas células intestinais a partir da dieta, esterificados em éster de colesteril pela enzima acetilcoenzima A-colesterol transferase, e encaminhadas para o fígado como remanescentes dos quilomícrons.

Após serem processadas, a partir de via de endocitose mediada por receptor, o colesterol se mistura com outros *pools* de esteróis dentro dos hepatócitos e é, então, parcialmente esterificado, através da enzima acetilcoenzima A-colesterol transferase. O éster de colesteril é em seguida incorporado em partículas VLDL e secretado no plasma. Durante o metabolismo dessas partículas de muita baixa densidade, uma parte do éster de colesteril é incluída em partículas LDL, e uma pequena fração é metabolizada pelas células em tecidos extra-hepáticos, utilizando o receptor LDLR presente em vesículas revestidas. Após o processamento das partículas de LDL e hidrólise do éster de colesteril nos lisosomas, o colesterol é então transferido através da proteína Niemann-Pick 1 tipo C (NPC1) para a via metabólica celular, movendo o colesterol recém-sintetizado para a membrana plasmática, a partir da via Golgi/complexos detergente-insolúveis de glicosíngolipídios. O *clearance* das lipoproteínas contendo apoB (LDL e remanescentes de VLDL e quilomícrons) ocorre em grande quantidade no fígado, utilizando o receptor LDLR. Dois ligantes são responsáveis pelo movimento dessas partículas, incluindo a apoB₁₀₀ e a apoE. A **Figura 5** ilustra muitas das proteínas utilizadas no movimento do colesterol não esterificado (CE) em diferentes órgãos e

sua excreção nas fezes, tanto como esteróis neutros e ácidos. (DIETSCHY& TURLEY, 2001; MAHLEY& JI, 1999).



Fonte: Dietschy, 2001.

Figura 5: Vias principais para o movimento do colesterol no corpo.

As regiões anatômicas celulares são mostradas em *itálico*; as proteínas principais estão enquadadas e os ligantes das proteínas transportadoras de membrana são mostrados em parênteses. ABCA1, transportador ligado a adenosina A1; ABCB4, transportador ligado a adenosina B4; ABCB11, transportador ligado a adenosina B11; Ac, acetil coenzima A; ACAT, coenzima A-colesterol-transferase; ApoA1, apolipoproteína A1; ApoB₁₀₀, apolipoproteína B₁₀₀; ApoD, apolipoproteína D; ApoE, apolipoproteína E; ApoER2, receptor 2 da apolipoproteína E; ApoJ, apolipoproteína J; BA, ácido biliar; CETP, éster de colesteril-proteína de transferência; CM, quilomícron; DIGs, complexos de glicosíngolípido detergente insolúveis; ER, retículo endoplasmático; LCAT, lecitina: colesterol acetiltransferase; LDLR, receptor LDL; LRP, proteína relacionado ao receptor LDL; Liso, lisosoma; NPC1, proteína Niemann-Pick 1 tipo C; SR-B1, scavenger receptor tipo I classe B; VLDLR, receptor VLDL.

Uma propriedade comum das apolipoproteínas solúveis é a sua capacidade de se combinar com vesículas de fosfolípidios para formar partículas discóides. Os fosfolípidios, nesses complexos de lipoproteína, são organizados de forma bilaminar, com a apolipoproteína orientada para a periferia do disco. Quando a apolipoproteína é distribuída juntamente com um complexo de fosfatidilcolina (DMPC), numa razão de peso molecular de 3,75:1 (fosfolípido:proteína), são formadas partículas discóides, contendo quatro moléculas de apoE (tetramerização). Utilizando estas partículas de apoE foi demonstrado que a apoE se liga ao LDLR, com uma afinidade similar à LDL ($K_d \sim 2,6 \times 10^{-9} M$). Modelos moleculares mostraram que o aumento da atividade do receptor está relacionado com o número de moléculas da apoE na emulsão. A adição de mais moléculas, além de quatro moléculas por partícula, não potencializou a sua capacidade de ligação. A capacidade de ligação multireceptora da apoE (4 moléculas da apoE por partícula : 4 moléculas do receptor, dois dímeros) em relação ao LDL (1 molécula de apoB-LDL para cada molécula do receptor) tem importantes conseqüências no metabolismo das lipoproteínas. As partículas de lipoproteínas, com uma molécula de apoE por partícula, irão competir mais ou menos de maneira equivalente com o LDL pelos receptores LDL (LDLRs), com as mesmas taxas de *clearance*, contudo, quando o conteúdo de apoE aumenta para quatro ou mais moléculas por partícula, isso determina o aumento dramático de sua afinidade, a partir de uma interação multireceptora, com a correspondente melhoria nas taxas de remoção (LADU et al, 2000; WEISGRABER, 1994).

Substituições na seqüência de aminoácidos modificam a afinidade de ligação da apoE com seus receptores e influenciam os níveis de colesterol no soro. A isoforma E4 liga-se com igual ou ligeiramente maior afinidade que E3, enquanto E2 se liga ao receptor apenas com 2% de afinidade, quando comparada com a isoforma E3. O reduzido potencial catiônico dos resíduos 140-150 da apoE2 parece ser a principal causa da ligação deficiente com o receptor (i.e. reduzida força de interação iônica com os sítios aniônicos de ligação no receptor LDL). A ligação da apoE ao LDLR, portanto, envolve uma interação eletrostática entre o domínio básico de ligação ao receptor da apoE e o domínio ácido de repetições

dissulfídicas no LDLR. Além disso, a estrutura anfipática em α -hélice da apoE (região 140-150) é necessária para a ligação normal ao receptor. Lisinas e argininas são cruciais para essa interação, e apesar das similaridades de carga, a heterotroca desses resíduos pode comprometer a eficiência da ligação (MAHLEY & RALL, Jr., 2000; WEISGRABER, 1990).

Os portadores do alelo E2 exibem menor eficiência em transferir VLDLs e quilomícrons do plasma sanguíneo para o fígado por causa das propriedades de ligação da apolipoproteína. Em contraste, portadores do alelo E3 e E4 são muito mais eficientes nesse processo. Enquanto a apoE4 e a apoE3 se ligam com aproximadamente igual afinidade aos receptores de lipoproteínas, a apoE2 se liga com menos do que 2% dessa afinidade. Portanto, quando comparados com os portadores E3 e E4, os portadores do alelo E2 são mais lentos para realizar o *clearance* dos lipídios da dieta (EICHNER et al, 2002).

As lipoproteínas associadas com a isoforma apoE4 são metabolizadas de maneira mais eficiente do que àquelas que estão associadas com as isoformas apoE2 e apoE3. Dessa forma, os homozigotos para apoE4 apresentam níveis mais baixos de apoE tanto no soro, líquido e o cérebro em comparação com as outras isoformas (POIRIER, 2000).

As diferenças na distribuição das classes de lipoproteínas assumem um papel central nos diferentes efeitos que a apoE3 e apoE4 exercem nas concentrações de LDL e colesterol plasmáticos. A distribuição preferencial da apoE4 nas lipoproteínas ricas em triglicerídios (VLDL e quilomícrons) parece ser responsável pela maior taxa de captação intestinal e hepática dessas partículas remanescentes, porque mais moléculas de apoE por partícula aumenta a afinidade dessas partículas pelo receptor LDL. O aumento resultante da captação pode causar um estado de *down regulation* dos receptores hepáticos, sugerindo um efeito cinético. Também tem sido postulado que o acúmulo da apoE4 em partículas de VLDL poderia mediar a conversão do VLDL em LDL, causando o aumento das concentrações plasmáticas de LDL (WEISGRABER, 1990; WEISGRABER, 1994).

Vários ensaios clínicos têm relacionado a isoforma E4 com o aumento dos níveis de colesterol plasmático e E2 com baixos níveis (EICHNER et al, 2002). Estudos

epidemiológicos têm mostrado que as isoformas E3 e E4 são mais freqüentes, sendo a ocorrência da isoforma E3 alcançando mais de 60%. A freqüência da isoforma E4 é variável: nos orientais (com uma baixa incidência de enfermidade isquêmica e baixos níveis de colesterol) a freqüência do alelo $\epsilon 4$ representa cerca de 0,08; nos aborígenes australianos é de 0,39. Em geral, a presença da isoforma E4 é acompanhada de um alto risco de contrair doenças cardiovasculares (GAMBOA et al, 1999). A isoforma E2 é rara e se relaciona geralmente com um baixo colesterol plasmático. Por outro lado, cerca de 2% dos homozigotos E2 desenvolvem um tipo de hiperlipidemia geralmente associada com outras anormalidades metabólicas presentes no alcoolismo e no diabetes (CASTELLI, 1998).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado o direto impacto da APOE na doença coronariana, pela influência nos níveis do colesterol. Esses estudos têm levado em conta diferentes aspectos: 1) o polimorfismo da APOE é um fator de risco independente para a doença; 2) sua contribuição para os níveis de colesterol e lipoproteínas. Um estudo conduzido em homens de meia-idade, em nove diferentes populações, estimou o aumento do risco de mortalidade para doenças coronarianas em ~ 40% em portadores do alelo $\epsilon 4$, quando comparado com portadores do genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$ ou com portadores do alelo $\epsilon 2$ (EICHNER et al, 2002; STENGARD, WEISS, SING, 1998). A **Figura 6** ilustra o efeito dos alelos da apoE nos parâmetros séricos de lipídios.

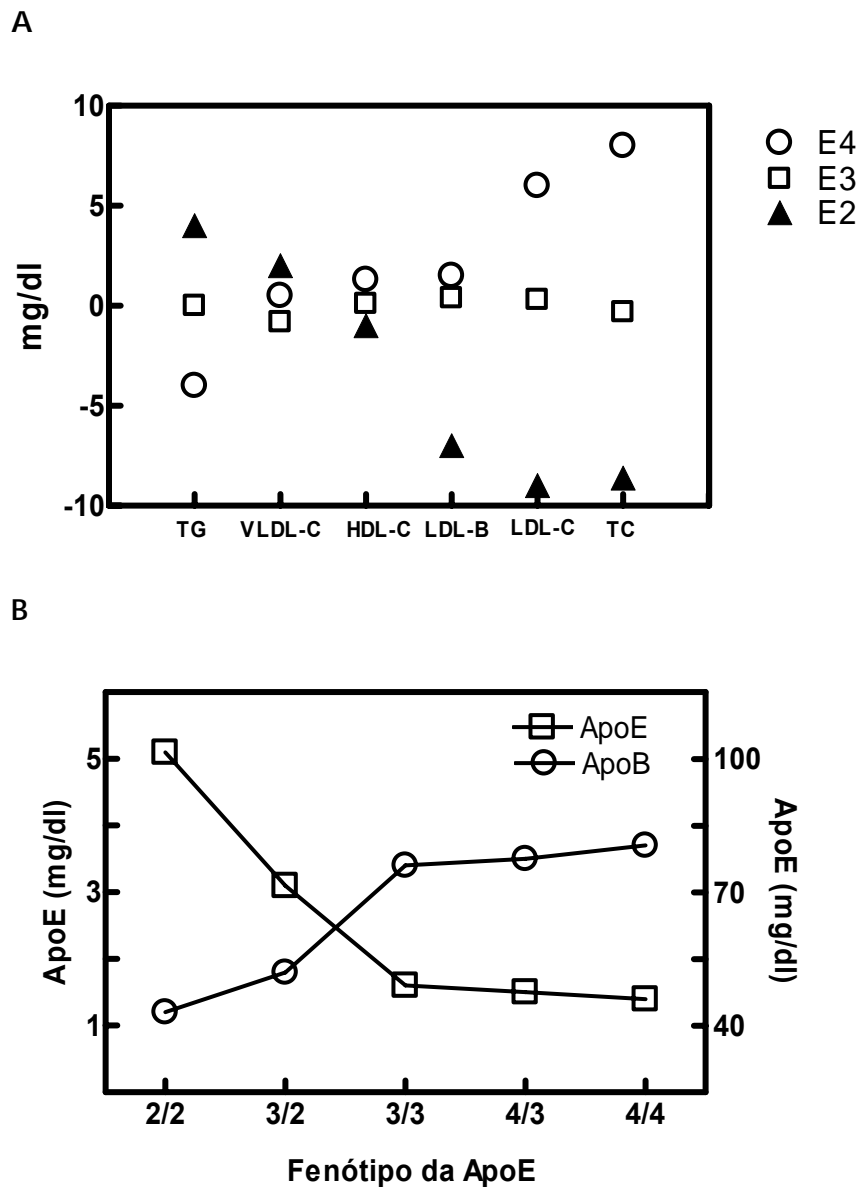
Portadores do alelo $\epsilon 4$ da apoE apresentam valores séricos para colesterol total e pressão sangüínea sistólica mais altos em adultos, estes parecem ser fatores independentes de risco para a doença de Alzheimer de início tardio, sugerindo que outros fatores, além do desequilíbrio nos níveis séricos de lipídios, contribuem para o desenvolvimento do declínio cognitivo observado na doença de Alzheimer (KIVIPALTO et al, 2002).

1.1.2. ApoE e o tecido nervoso

O Sistema Nervoso Central representa cerca de 2% da massa corporal, mas contém quase a metade do colesterol não esterificado presente em todo o

indivíduo. Este esterol está presente amplamente em dois *pools*, a saber: o colesterol nas membranas especializadas de mielina e nas membranas plasmáticas de células gliais e neurônios. Cerca de 0,02% (humanos) ou 0,4% (camundongos) do colesterol dessas reservas é utilizado a cada dia, de tal forma que o fluxo absoluto de esteróis através do cérebro é de aproximadamente apenas 0,09% em relação à velocidade de utilização do colesterol do restante do corpo nessas respectivas espécies (DIETSCHY& TURLEY, 2001).

O entrada do colesterol no Sistema Nervoso Central tem origem quase inteiramente da sua síntese *in situ*. A velocidade de síntese e degradação do colesterol é aumentada em doenças neurodegenerativas e existem evidências que sugerem que grandes quantidades de colesterol também são utilizadas por células gliais e neurônios durante o crescimento do cérebro, remodelação e reparo neuronal. A reciclagem interna do colesterol envolve ligantes como a apolipoproteína E. Mudanças do balanço do colesterol ao longo de todo o corpo podem causar alterações na reciclagem de esteróis e da expressão da apolipoproteína E em várias partes do Sistema Nervoso Central, podendo afetar a integridade de neurônios e da mielina. Há atualmente pouca evidência da transferência, a partir do plasma, de esteróis para o cérebro do feto, neonato ou de adultos (DIETSCHY& TURLEY, 2001; STRITTMATTER& BOVA, 2002).



Fonte: Mahley, R.W., Rall, S.C., 2000

Figura 6: (A) efeito dos alelos da apoE nos parâmetros de lipídios. TG, triglicerídeo plasmático total; VLDL-C, VLDL colesterol; HDL-C, HDL colesterol, LDL-B, LDL apoB; LDL-C, LDL colesterol; TC, colesterol plasmático total. (B) Efeitos dos fenótipos da apoE nos níveis plasmáticos da apoE e apoB.

Enquanto alguns nutrientes alcançam as células através de transportadores, outros, incluindo o colesterol, são ativamente importados para as células, através de receptores especializados. Esses receptores continuamente reciclam a superfície celular via vesículas intracelulares. O material é transportado a partir da superfície celular via endocitose mediada por receptor, em endosomas associados à molécula clatrina. Após o transporte, o receptor retorna à superfície celular para um novo ciclo de importação (COOPER& HOWELL, 1999).

A reciclagem do colesterol pode ocorrer continuamente ao longo do SNC, e pode ser crítica para o reparo neuronal e remodelagem, mesmo no cérebro adulto. Contudo, ainda não se sabe ao certo quais são as proteínas envolvidas nesse processo. Ao contrário das células do resto do corpo que primariamente utilizam o receptor LDL (LDLR), para a recaptação do complexo lipoproteína-colesterol, as células do cérebro expressam muitos transportadores da família do receptor LDL, inclusive ele próprio, mas também LRP, o receptor VLDL, o receptor 2 da apoE (apoER2), megalina e outros. Essas proteínas são encontradas tanto em neurônios quanto na glia. O cérebro também sintetiza vários ligantes, incluindo a apoE, apoD e apoJ (DIETSCHY& TURLEY, 2001).

A apolipoproteína E é a principal lipoproteína no cérebro e no líquido céfalo-raquidiano. O líquido céfalo-raquidiano (LCR), produzido em grande parte pelo plexo coróide, também contém produtos não reabsorvidos derivados do espaço extracelular do cérebro e, em menor grau, do plasma. As lipoproteínas do LCR têm o tamanho entre 7-15nm e uma densidade semelhante ao HDL plasmático, contendo um centro lipídico de colesterol esterificado e com conformação esférica. As lipoproteínas do LCR parecem ser heterogêneas em relação ao conteúdo, sendo que a apoE representa a lipoproteína mais abundante, localizada nas maiores partículas. A apoAI e apoAII são encontradas em partículas gradualmente menores e a apoJ se distribui entre todas as partículas (BASSETT et al, 2000; LADU et al, 2000).

As concentrações da apoE, colesterol total e fosfolípidios no LCR não são as mesmas do soro, sugerindo que a apoE e os lípidios no plasma são incapazes de atravessar a barreira hemato-encefálica, portanto, as concentrações podem refletir

a produção local ao longo do SNC. A falta de uma correlação entre a apoE, proteína total, IgG e o número de células no LCR também indicam uma regulação independente da apoE no líquido céfalo-raquidiano (YAMAUCHI et al, 1999).

O alelo $\epsilon 4$ é o gene que determina a susceptibilidade para a doença de Alzheimer e outros distúrbios degenerativos. As isoformas da apoE são responsáveis por diferentes efeitos no crescimento de dendritos *in vitro*, em cultura de neurônios e na estabilidade do citoesqueleto e do aparelho microtubular (JI et al, 2002).

A doença de Alzheimer (DA) é uma entidade clínico-patológica, com diferentes causas. A forma autossômica dominante familiar, relativamente rara, (parcela de menos de 5% de todos os pacientes com DA) se deve, na maioria das vezes, às mutações em três diferentes genes: proteína precursora amilóide, prenilina 1 e prenilina 2. Contudo, a forma mais comum da doença de Alzheimer, do tipo esporádica, não herdada, não tem uma causa bem definida. Vários fatores de risco para a DA do tipo esporádico foram identificados, incluindo idade avançada, história de trauma cerebral e a herança de certos alelos do gene da apolipoproteína E (APOE).

A idade do início da doença de Alzheimer permite classificar a apresentação da doença em início precoce (antes de 65 anos) e em início tardio (após 65 anos). Estudos preliminares têm mostrado a influência de fatores genéticos para a forma precoce da doença (genes para prenilina 1 e 2 e para proteína precursora de β -amilóide). Na forma tardia da doença, a frequência do alelo $\epsilon 4$ do gene da apolipoproteína E (APOE) foi identificada como o principal fator genético de risco para a DA, de maneira dose-gene-dependente, contando por cerca de 40-50% dos casos (HELBECQUE & AMOUYEL, 2000).

A dosagem do gene APO $\epsilon 4$, um dos três mais comuns alelos em humanos, está diretamente relacionada com o risco aumentado para adquirir a doença de Alzheimer (DA), idade inicial média reduzida e progressão mais rápida da doença. Em humanos, o alelo $\epsilon 4$ parece ser um importante fator de risco para a Doença de Alzheimer esporádica e familiar de início tardio (DEPREZ, 1994; MOLERO, PINO-RAMIREZ, MAESTRE, 2001).

A apoE possui uma característica ímpar entre as apolipoproteínas, por causa de sua relevância no tecido nervoso. Ela atua coordenando a mobilização e redistribuição do colesterol durante o reparo, crescimento e manutenção da mielina durante o desenvolvimento ou após uma lesão no Sistema Nervoso Periférico (SNP). No Sistema Nervoso Central (SNC), a apoE possui um papel crítico na mobilização e redistribuição do colesterol e fosfolípidios durante a remodelação da membrana e durante a plasticidade sináptica (GUTMAN et al, 1997).

Pouco se sabe a respeito da presença de diferentes apolipoproteínas (apos) no parênquima cerebral. Os RNAs mensageiros (RNA_m) que traduzem a maioria das apos como a apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoB, apoC-II, apoC-III, apoF e apoH não foram identificados nos extratos totais do tecido cerebral de várias espécies de mamíferos através de diferentes técnicas incluindo Northern blot, RNA dot blot e em estudos com RNAses. Embora esses resultados não excluam a possibilidade da existência de baixos níveis da expressão do RNA_m em determinadas populações celulares, a falta de outras classes de apolipoproteínas plasmáticas, como a apoA e apoB no SNC reforça ainda mais a função crítica da apoE no tecido nervoso cerebral (BEFFERT et al, 1998; POIRIER, 1994).

No SNC, a apoE é primariamente sintetizada e secretada por astrócitos e macrófagos, sendo que sua síntese é estimulada após a injúria. O colesterol não esterificado, liberado após uma lesão, é esterificado e transportado através da apoE para os neurônios que estão se reinervando, e então é capturado via receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL-R), onde é utilizado como precursor para a síntese de novos terminais sinápticos (NATHAN et al, 1995; POIRIER et al, 1993).

Em cérebros de adultos humanos e ratos, a detecção imunocitoquímica para apoE foi reconhecida em astrócitos, tanto na substância branca quanto na cinzenta, incluindo astrócitos especializados como as células gliais de Bergmann, tanícitos e pituícitos. A imunoreatividade positiva também foi identificada nas membranas basais, tanto ao longo da superfície pial como nos vasos sanguíneos, contudo, oligodendrócitos, endotélio e o epitélio coróide foram imunonegativos. A apoE é detectada por imunocitoquímica ao longo das placas

senis extracelulares, emaranhados neurofibrilares intraneuronais e em vasos sanguíneos contendo β -amilóide em cérebros de pacientes com Alzheimer (BEFFERT et al, 1998; ZAROW & VICTOROFF, 1998).

Numerosos estudos têm documentado a localização imuno-histoquímica da apoE em astrócitos e em células microgliais de roedores, primatas não-humanos e pacientes com a doença de Alzheimer (DA). Nos cérebros de pacientes autopsiados com DA, a presença da apoE foi identificada amplamente nos emaranhados neurofibrilares de neurônios corticais afetados. No rato, após lesão hipocampal, a expressão da apoE em astrócitos parece estar aumentada durante a astrogliose reativa. Em estudos com cérebros de pacientes submetidos a resecção do lobo temporal, como medida para epilepsia intratável, além da intensa imunoreação à apoE em muitos astrócitos, também foi detectada a imunomarcagem de alguns neurônios corticais, assim como em espécimes controles para DA. Esses achados histológicos sugerem a localização predominantemente citoplasmática da apoE em neurônios e em células gliais (HAN et al, 1994; MASLIAH et al, 1995).

Embora pouco estudada, a apoE tem um papel importante no transporte de lipídios no cérebro, como um dos componentes de várias classes de lipoproteínas do plasma e do líquido céfalo-raquidiano (LCR) e como um ligante para três tipos de receptores de lipoproteínas: o receptor para lipoproteína de baixa densidade (LDLR); proteína relacionada com o receptor para LDL (LRP), também chamado de receptor α 2-macroglobina, o receptor para lipoproteína de muita baixa densidade (VLDLR), LR8/apoE receptor-2 e o receptor megalina/glicoproteína 330 (HUSSAIN, STRICKLAND, BAKILLAH, 1999; LADU et al, 2000; WEISGRABER & MAHLEY, 1996).

Astrócitos expressam LDLR em diversas regiões do Sistema Nervoso Central (SNC). Após a internalização do colesterol, transportado a partir da lipoproteína, ocorre uma *down regulation* da expressão do receptor. Outros estudos em várias espécies, incluindo humanos, demonstraram a presença do LDLR em oligodendrócitos, células piaais, microglia e células endoteliais dos capilares cerebrais, sugerindo que muitos tipos celulares no SNC podem expressar o receptor (BEFFERT et al, 1998; PAGE, HOLLISTER, HYMAN, 1998).

Quando um nervo periférico é seccionado ou comprimido, o segmento distal passa por alterações funcionais e histológicas típicas, incluídas na chamada degeneração Walleriana: as fibras nervosas mielinizadas começam a degenerar, sendo formados corpos de mielina ovóides, que em seguida são convertidos em complexos sudanofílicos (partículas enriquecidas com colesterol e fosfolípidios). Os ésteres de colesterol acumulam-se localmente até que a regeneração da mielina seja iniciada. Em resposta às grandes quantidades de lipídios liberadas nessa fase, macrófagos sintetizam e liberam apoE ao longo da lesão, na tentativa de *scavenge* do colesterol a partir dos debrís celulares e da mielina (HANDELMANN et al, 1992; POIRIER et al, 1993).

Na lesão do nervo periférico, macrófagos residentes ou migratórios sintetizam apoE, que é secretada na forma de partículas lipoproteína-símile. As partículas lipoproteína-símile parecem regular a remoção do colesterol, liberado a partir da mielina em degeneração e de debrís celulares após a fagocitose. A expressão do gene da apoE em macrófagos é induzida pelo colesterol. O aumento de sua expressão está diretamente relacionado com o aumento do transporte do colesterol por essas células e, ao mesmo tempo, com o aumento da biossíntese e secreção da apoE (LEBLANC & PODUSLO, 1990).

A produção da apoE durante as respostas de reparo dos nervos periféricos, após uma lesão, sugere um papel da apoE no transporte de lipídios e nas ações neurotróficas associadas ao reparo neuronal. A expressão de RNA_m para os receptores LDL ocorre tanto na periferia como em neurônios do SNC e possivelmente na glia. Após lesão do nervo ciático, macrófagos infiltrados produzem e liberam apoE, com intuito aparente de transportar o colesterol e outros componentes da membrana para serem reciclados e para regenerarem neuritos, via receptores LDL (POIRIER et al, 1991).

Em modelos de lesão do nervo ciático de ratos, ocorre um aumento rápido dos níveis de RNA_m da apoE principalmente entre 1-4 dias, alcançando o nível máximo entre 12-14 dias após a lesão, contudo, sem alteração significativa nos 14-35 dias seguintes. De acordo com LEBLANC e colegas, 1990, um mecanismo traducional ou pós-traducional, ao invés de transcricional ou pós-transcricional,

pelos axônios em regeneração, parece regular os níveis do RNA_m da proteína (LEBLANC & PODUSLO, 1990).

Utilizando cultura de neurônios ganglionares da raiz dorsal de coelhos, Handelman et al, 1992, comprovaram experimentalmente que a apoE atua induzindo o crescimento e extensão de neuritos por um mecanismo de redistribuição do colesterol, mediado por receptor. Os autores sugerem que o papel da apoE de transportar lipídios e redistribuí-los para neurônios, a partir da captação das lipoproteínas, contribui para induzir a ramificação e aumento do comprimento dos processos dendríticos em cada célula ganglionar. A associação da apoE com a matriz extracelular pode diminuir a adesão entre o brotamento neurítico e a matriz extracelular, contribuindo para o aumento de sua extensão. Isso pode ser particularmente importante *in vivo*, o que facilitaria o acesso dos neuritos aos tubos celulares de Schwann, durante a regeneração Walleriana na periferia.

O papel de promotor da viabilidade celular em neurônios hipocâmpais em cultura é potencializado pela apoE. Na ausência de apoE, a viabilidade neuronal com 1 ng/ml de CNTF (fator neurotrófico de crescimento neuronal) é de apenas 20% acima dos valores de sobrevivência das culturas de controle. Por outro lado, na presença da apoE, a sobrevivência dos neurônios hipocâmpais com 1 ng/ml de CNTF é de 40% acima dos valores controles. Esses achados indicam uma nova função da apoE no sistema nervoso, apoiando a hipótese de que a apolipoproteína E secretada localmente nos sítios de injúria tecidual, poderia facilitar o reparo promovendo a atividade de certos fatores de crescimento, como o CNTF (GUTMAN et al, 1997) .

As isoformas apoE e apoE4 parecem possuir papéis distintos na indução do crescimento de neuritos em células neuronais em cultura. Análises bioquímicas, ultra-estruturais e imuno-histoquímicas sugerem que, na presença de lipídios, a apoE3 estimula o crescimento neurítico enquanto a apoE4 tem um papel inibitório. Estudos com células de neuroblastoma (Neuro-2a) indicam que quando as células são tratadas com apoE4, elas exibem um número reduzido de microtúbulos e uma baixa densidade de polimerização da tubulina monomérica quando comparadas com células tratadas com apoE3, sugerindo que a despolimerização dos

microtúbulos e a inibição do crescimento neurítico induzida pela apoE4, pode ter um papel na patogênese da doença de Alzheimer (NATHAN et al, 1994; NATHAN et al, 1995; NATHAN et al, 2002).

O papel da apoE na plasticidade no SNC foi estudado em detalhes por diferentes grupos de pesquisa, utilizando o modelo de lesão do córtex entorrinal (LCE). A deaferentação do hipocampo pela LCE em ratos, se constitui no principal modelo animal para deaferentação hipocampal vista na doença de Alzheimer.

A LCE causa a degeneração da conexão nervosa do córtex entorrinal às células granulares e células piramidais da região CA1 do hipocampo, dessa forma removendo conexões corticais para o hipocampo, causando uma perda de aproximadamente 60% do *input* sináptico para as células da camada granular. Contudo, a perda de sinapses é temporária. Após poucos dias, novas sinapses são formadas, compensando a deaferentação ao longo de dois meses. Essas novas sinapses originam-se dos neurônios septais colinérgicos, células piramidais de associação e comissuriais glutamatérgicas das áreas CA3 e em menor extensão de neurônios do córtex entorrinal contralateral (BEFFERT et al, 1998).

A deaferentação experimental resulta numa rápida ativação dos astrócitos, seguida da invasão dendrítica das células granulares da camada molecular do giro dentato, ao longo da zona deaferentada, através de expansões de fibras comissuriais e associativas glutamatérgicas das células piramidais do hipocampo e de fibras colinérgicas a partir do *septum*. A sinaptogênese começa quatro dias pós-lesão e continua por semanas. A conexão (*input*) contralateral do córtex entorrinal para as células granulares da camada molecular é pequena (5%) em relação a via ipsilateral e mostra relativamente pouco brotamento dendrítico após lesão unilateral.

Nesse modelo, evidências apontam para o papel crítico da apoE durante a sinaptogênese reativa no hipocampo do rato adulto, ilustrado pelo aumento da imunoreatividade e expressão do RNA_m da apoE em astrócitos reativos (mudança da forma arredondada para a forma estrelada), com pique da expressão a partir de seis dias pós-LCE, apoiando a idéia da função neurotrófica da apoE. A apoE secretada por astrócitos poderia, dessa forma, influenciar o processo de

remielinização, contribuindo para plasticidade que se segue à lesão. A reciclagem do colesterol poderia explicar os níveis reduzidos da síntese de colesterol e o aumento da expressão da apoE durante a sinaptogênese reativa (POIRIER et al, 1991; POIRIER et al, 1993).

A análise autoradiográfica dos sítios de ligação do receptor LDL, na zona de deafferentação do hipocampo pós-LCE, revelou um aumento na expressão do receptor LDL nas células granulares (sob remodelação dendrítica e sinaptogênese), durante a fase aguda do processo de reinervação (BEFFERT et al, 1998; POIRIER et al, 1993).

Estudos recentes têm relacionado a frequência do alelo APO ϵ 4 com uma baixa sobrevivência após acidente vascular cerebral e hemorragia intracraniana (MCCARRON et al, 1998; MCCARRON et al, 1999). Em modelos de isquemia focal e global em camundongos APOE-deficientes, foram observadas áreas aumentadas de infarto em comparação com os controles, e que a infusão intraventricular da apoE reduziu o dano neuronal em regiões do núcleo caudado e hipocampo (GRAHAM et al, 1999; HORSBURGH et al, 2000; LASKOWITZ et al, 1997).

O genótipo da APOE pode servir como fator preditivo da recuperação após traumatismo craniano leve. Vários estudos indicam a baixa probabilidade de recuperação em pacientes comatosos portadores do alelo ϵ 4, com um período mais longo de inconsciência (FRIEDMAN et al, 1999; GRAHAM et al, 1999; LICHTMAN et al, 2000). Além do impedimento da função cognitiva em boxeadores profissionais aposentados (demência pugilística) (JORDAN et al, 1997).

A presença de depósitos de placas da proteína β -amilóide no córtex cerebral de pacientes, que morreram após traumatismo, parece estar diretamente relacionada ao alelo APO ϵ 4. Pacientes com traumatismo craniano, portadores do alelo APO ϵ 4, apresentam quatro vezes mais depósitos de β -amilóide em relação aos controles sem esse alelo, assim, constituindo uma população única de alto risco para um prognóstico reservado e com pior desempenho em terapias de reabilitação (LICHTMAN et al, 2000; TEASDALE et al, 1997).

Em modelos animais, utilizando camundongos transgênicos APOE deficientes (*knockout*), o traumatismo craniano experimental induziu uma degeneração neuronal extensa e disseminada, marcadamente ao longo da região hipocampal, com significativos déficits cognitivos e motores em relação aos animais controles (*wild type*), que receberam a mesma lesão. Em estudos com camundongos *knock in*, houve um elevado índice de mortalidade nos animais portadores da APO ϵ 4 humana, em comparação com os outros animais transgênicos não APO ϵ 4 submetidos ao mesmo procedimento (CRAWFORD et al, 2002; LOMNITSKI et al, 1997; LOMNITSKI et al, 1999a; LOMNITSKI et al, 1999b; SABO et al, 2000).

ARENDE e colegas (ARENDE et al, 1997), a partir de um estudo morfológico abrangente, confirmaram a influência do polimorfismo da apoE na plasticidade neuronal em pacientes autopsiados com doença de Alzheimer. A partir de impregnação argêntica de Golgi e métodos histoquímicos, os autores confirmaram um efeito dose gene dependente na remodelagem cerebral. Pacientes com 1 ou 2 alelos da APO ϵ 4 não só mostraram uma severa degeneração em diversas regiões cerebrais como também exibiram menores respostas de plasticidade dendrítica compensatória (comprimento e arborização), sugerindo o comprometimento da reorganização neuronal durante o processo de reparo.

O mal de Alzheimer é uma afecção neurodegenerativa caracterizada pela presença no cérebro de dois achados histopatológicos patognomônicos: placas senis e emaranhados neurofibrilares. Os emaranhados neurofibrilares são estruturas que se acumulam no corpo do neurônio e consistem de filamentos helicoidais pareados, principalmente compostos da proteína *tau* hiperfosforilada. *Tau* é uma proteína associada aos microtúbulos, expressa sobremaneira, mas não exclusivamente, no tecido nervoso, e sua função normal é de se ligar e estabilizar os microtúbulos. No cérebro dos pacientes com DA a proteína *tau* apresenta-se hiperfosforilada (cerca de 4 vezes mais conteúdo de fosfato do que o normal). Essa hiperfosforilação parece reduzir a afinidade da proteína *tau* pelos microtúbulos, desestabilizando o citoesqueleto neuronal, contribuindo com a degeneração senil observada na doença. Existe uma convergência de achados na literatura que mostra que a *tauopatia* pode ser um ponto comum na patogênese de outras

doenças neurodegenerativas do SNC (GENIS et al, 1995; HUANG et al, 2001; YANAGISAWA et al, 1999).

A apolipoproteína E está presente em placas senis em cérebros de pacientes com Alzheimer, sendo que os indivíduos com o alelo para apoE4 apresentam placas mais densas e maiores contendo β -amilóide, em relação aos pacientes homocigotos para o alelo da apoE3 mais prevalente (BEFFERT et al, 1999; GENIS et al, 1995). Além disso, estudos *in vitro* revelaram que a apoE4 se liga com mais afinidade do que a apoE3 à proteína β -amilóide (β A). Isto sugere que a apoE3 reduz a velocidade da formação do padrão helicoidal *in vivo*, retardando a fosforilação da proteína *tau* e que os efeitos deletérios associados à apoE4 na DA parecem estar relacionados com a incapacidade de diminuir este processo, dessa forma, contribuindo para a formação desses emaranhados (CASTELLI, 1998; DEPREZ, 1994; GENIS et al, 1995).

A apolipoproteína E pode agir como uma proteína acompanhante para o peptídeo β A, controlando parcialmente o metabolismo e o *clearance* do complexo β A solúvel e não fibrilar no cérebro humano, prevenindo sua agregação e limitando sua ação neurotóxica. A interação entre a apoE e o β A parece ser apoE-isoforma específica. As isoformas apoE2 e E3 formam complexos mais estáveis com o peptídeo β A *in vitro*, enquanto a isoforma E4 não interage com β A. Portanto, apoE4 pode contribuir para a neuropatologia da DA pela incapacidade de se ligar ao complexo solúvel com o peptídeo β A (DROUET et al, 2001).

Além disso, existem evidências cada vez mais fortes do papel da apoE como uma molécula reguladora das concentrações extracelulares da proteína β -amilóide (β A), na forma solúvel. O processo ocorre através de sua internalização, via receptor da apoE, pela atividade endossomal/lisosomal, no cérebro de indivíduos com doença de Alzheimer (POIRIER, 2000) (POIRIER et al, 1993). Segundo modelo proposto por Poirier, 2000, o complexo ApoE/lipoproteína poderia agir como *scavenger* do β -amilóide não agregado e lipofílico, normalmente secretado no meio extracelular *in vivo*. A produção e a liberação do β -amilóide serveriam como modulador da ligação e internalização da apoE, primariamente através do receptor LDL. A liberação do β A no meio extracelular, dessa forma, atuaria como

indutor da ligação e internalização do complexo apoE-lipoproteína. Num modelo de DA, os níveis reduzidos da apoE, observados nos indivíduos carreadores da APO ϵ 4 (especialmente nos indivíduos APO ϵ 4/4), poderiam resultar no comprometimento do *clearance* do β A solúvel e o aumento da taxa da deposição da proteína amilóide no compartimento extracelular.

1.1.3. Evolução e distribuição dos alelos APOE no mundo

Apesar de algumas discrepâncias na literatura científica, existe uma concordância geral em atribuir ao alelo APO ϵ 4 o fator de risco para a doença coronariana e aterosclerose (EICHNER et al, 2002). E mais recentemente, o alelo APO ϵ 4 tem sido implicado na susceptibilidade para a doença de Alzheimer (DA) (STRITTMATTER & BOVA, 2002). Esses achados sugerem que um ou dois alelos APO ϵ 4 poderiam aumentar 3 a 4 vezes o risco para adquirir a doença de Alzheimer.

Estudos em primatas não humanos revelaram que eles possuem somente um alelo tipo APO ϵ 4, sugerindo que o alelo ϵ 4, na verdade, trata-se do alelo ancestral. Filogeneticamente, após a separação das linhagens de humanos e chimpanzés ao longo de milhões de anos, os alelos APO ϵ 2 e APO ϵ 3 surgiram a partir de mutações e mais tarde se disseminaram nas populações humanas. Considerando, que os três alelos diferem em várias de suas propriedades funcionais, forças seletivas poderiam ter contribuído para a distribuição alélica atual. O alelo APO ϵ 3 é o mais freqüente nas populações humanas e sua freqüência é sempre negativamente correlacionada como o alelo APO ϵ 4, indicando que o alelo ancestral foi gradualmente substituído por um novo alelo, carreando uma mutação 112arg \rightarrow cis. Dessa forma, sendo o ϵ 4 o alelo ancestral, então o alelo ϵ 3 seria um produto de mutação [CGC \rightarrow TCG]₁₁₂ e o alelo ϵ 2, formado a partir da mutação [CGC \rightarrow TCG]₁₅₈ (CORBO & SCACCHI, 1999) (GERDES et al, 1996).

Segundo, Hanlon & Rubinsztein, 1995, o alelo ϵ 4 pode ser postulado como o alelo ancestral porque ele contém argininas em ambos os sítios de aminoácidos 112 e 158. Esses códons possuem dinucleotídeos CpG. Em geral, a direção da mutação é esperada no sentido argininas para cisteínas, devido a relativa alta freqüência de

metilação das citosinas ao longo dos dinucleotídeos CpG e a predisposição das metil-citosinas para deaminação em timinas. Portanto, seria esperado uma direção favorável para mutação de 2 argininas ($\epsilon 4$) para 2 cisteínas ($\epsilon 2$). Outra evidência a favor do alelo $\epsilon 4$ vem da análise do seqüenciamento do DNA de mamíferos, incluindo babuínos, chimpanzés, bovinos, cobaios, coelhos, ratos e camundongos. Todas essas espécies de mamíferos estudadas, exceto o coelho, contêm argininas nas posições homólogas para 112 e 158. A seqüência do coelho foi similar ao alelo $\epsilon 3$ nessas posições.

Nenhum polimorfismo na posição 112 foi observado em qualquer das espécies de primatas examinadas, sugerindo que em todos os primatas não humanos, os alelos APOE correspondem ao alelo APO $\epsilon 4$ humano. Portanto, durante um curto espaço de tempo, ao longo da evolução, na divergência das linhagens de humanos e macacos, duas mutações sucessivas devem ter ocorrido no mesmo *locus* cromossômico, gerando os alelos APOE3 e APOE2. Transições C para T podem ter sido resultado de deaminações de metil-citosinas em dinucleotídeos CpG (HANLON & RUBINSZTEIN, 1995) (CORBO & SCACCHI, 1999).

Apesar da presença de R112 e R158 em quase todos os mamíferos estudados, como também em humanos portadores do alelo $\epsilon 4$, outras substituições de aminoácidos influenciaram o fenótipo da apoE. Humanos possuem um resíduo ímpar de arginina (R61), enquanto que a maioria dos outros mamíferos, incluindo o macaco *rhesus*, possui treonina (T61) no mesmo sítio, o que influencia a afinidade de ligação (domínio carboxi-terminal) pela classe de lipoproteína. A substituição de R61 para T61 altera a preferência de ligação da apoE de VLDL para HDL, levando a uma afinidade $\epsilon 3$ -simile nesses animais, aonde a apoE se liga preferencialmente às partículas de HDL (FINCH & SAPOLSKY, 1999).

A freqüência do gene da apoE em diferentes populações, incluindo populações caucasianas da Europa, mostra uma distribuição geográfica característica. As populações do norte da Europa (finlandeses e alemães) tendem a possuir altas freqüências (~14-19%) do alelo $\epsilon 4$ em relação ao sul da Europa (franceses e italianos) (~ 7-12%). Nigerianos, japoneses e finlandeses possuem uma baixa freqüência (~3-4%) do alelo $\epsilon 2$. Americanos mexicanos e índios americanos

também possuem baixas freqüências (~2-4%) do alelo $\epsilon 2$. Em um outro grupo populacional, consistindo de nove tribos de índios sul-americanos, nenhum alelo $\epsilon 2$ foi encontrado (EICHNER et al, 2002).

Nas diversas populações, a influência do polimorfismo na distribuição dos fenótipos (lipoproteínas plasmáticas) é complexa e recebe a colaboração de outros fatores. Contudo, quando considerações mais restritas são feitas em estudos interpopulacionais, o genótipo da APOE parece seguir uma tendência constante, apesar de todas as diferenças étnicas e ambientais. Os portadores do alelo $\epsilon 2$ (genótipos $\epsilon 2/2$, $\epsilon 2/3$) geralmente possuem níveis médios mais baixos do colesterol plasmático e níveis mais altos de triglicerídeos em relação ao genótipo $\epsilon 3/3$, enquanto os portadores do alelo $\epsilon 4$ (genótipos $\epsilon 4\epsilon 4$, $\epsilon 3\epsilon 4$) possuem geralmente níveis médios mais altos de colesterol e triglicerídeos (CORBO & SCACCHI, 1999; GERDES et al, 1996). A distribuição geográfica dos alelos da APOE pode ser um fator preditivo importante da variação interpopulacional nos níveis de colesterol sérico total e na taxa de mortalidade por doenças coronarianas. Em particular, a distribuição do alelo $\epsilon 4$ pode conferir uma informação valiosa do potencial risco ecológico, tendo um impacto na condução da abordagem clínica em saúde pública (STENGARD, WEISS, SING, 1998).

É interessante notar que as populações do sul da Europa possuem a mesma freqüência alélica da apoE em relação às populações do Japão, enquanto que as populações caucasianas nas regiões do norte da Europa, Canadá e EUA possuem uma alta freqüência do alelo APO $\epsilon 4$, comparativamente 1,5 a 2 vezes maior. A distribuição epidemiodemográfica da APOE nas populações caucasianas ilustra bem as diferenças entre esses grupos populacionais no que diz respeito à mortalidade por doenças coronarianas (DC). Assim, as taxas de mortalidade por DC são 1,5 a 3 vezes maiores nas regiões do norte da Europa em relação ao sul. Tal distribuição poderia explicar melhor a variabilidade inter-populacional da incidência de doenças coronarianas, relacionando o polimorfismo da APOE aos hábitos alimentares. Os indivíduos portadores do alelo $\epsilon 4$, portanto, poderiam ser mais sensíveis ao alto consumo de gorduras saturadas e colesterol típico da dieta do norte da Europa. Dessa forma, o polimorfismo para APOE, notadamente a freqüência do alelo $\epsilon 4$, poderia ser um importante fator, contribuindo para a

variabilidade nas taxas de mortalidade de doenças coronarianas, contudo sem deixar de lado outras importantes variáveis (GERDES et al, 1992).

A ausência do alelo $\epsilon 2$ foi detectada em amostras de populações de origem esquimó da região do Ammassalik na Groelândia ocidental, nos Maias no México, índios Yanomame do Brasil, em outros Ameríndios de nove diferentes tribos da América do Sul e Central e aparentemente em aborígenes australianos. Por outro lado, altas freqüências do alelo $\epsilon 2$ (12-15%) foram confirmadas em chineses e em aborígenes da Malásia e Papua Nova Guiné. A freqüência do alelo $\epsilon 4$ é relativamente alta na população esquimó e é igualmente elevada nas populações em Saami, na Finlândia, em africanos e em aborígenes da Malásia, Papua Nova Guiné e Austrália. Baixas freqüências do alelo $\epsilon 4$ (menos de 10%) foram encontradas em populações maias do México, em chineses, turcos, italianos, sardenhos, espanhóis e em gregos da ilha de Chipre (CORBO & SCACCHI, 1999; GERDES et al, 1996; SKLAVOUNOU et al, 1997).

1.1.4. Neuroplasticidade

A formação do Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos envolve uma complexa seqüência de eventos, regulados de modo preciso, para estabelecer um intrincado circuito neural. Esse circuito, uma vez criado, se tornará crítico na integração de informações sensoriais, estabelecendo as funções cognitivas e muitos aspectos da coordenação do movimento voluntário em adultos. A construção de circuitos neurais requer a geração, migração e diferenciação controlada de neurônios e glia. A sincronização desses eventos é essencial para que as regiões específicas do cérebro sejam organizadas no tempo e espaço corretos, formando circuitos funcionais e definindo a estrutura modelável do cérebro (BERGER-SWEENEY & HOHMANN, 1997).

O desenvolvimento harmonioso do SNC, durante a embriogênese, não apenas requer o curso normal de eventos geneticamente controlados, mas também a influência apropriada de vários processos de sinalização. Fatores intrínsecos e extrínsecos parecem regular o comportamento das populações de

células progenitoras neurais durante a maturação do cérebro. Várias moléculas tais como fatores de crescimento, hormônios, neurotransmissores são importantes candidatos para mediar a sinalização transcelular, coordenando os processos de desenvolvimento, proliferação, migração e diferenciação das células neurais (CAMERON, HAZEL, MCKAY, 1998; NGUYEN et al, 2001; RICE & BARONE S JR, 2000).

A neuroplasticidade é o substrato tanto para aprendizagem e memória, quanto para mediação das respostas após lesão no SNC (plasticidade compensatória). Representa um processo contínuo de reação à atividade, lesão, morte e gênese de neurônios, envolvendo a modulação estrutural e funcional dos processos axônicos, dendríticos e de sinapses. A variedade de elementos estruturais relacionados com a plasticidade inclui LTP (*Long Term Potentiation*), eficácia sináptica, remodelagem sináptica, sinaptogênese, extensão neurítica e dendrítica, neurogênese e recrutamento celular. Num sentido amplo, os processos fenomenológicos que se manifestam no evento da plasticidade são: sinapses (elétricas, bioquímicas, estruturais), neuritos (axônio, dendrito), corpos celulares de neurônios, transporte anterógrado (em direção a neuritos distais) e retrógrado (a partir de neuritos distais), interações celulares (neurônio-glia), circuitos neurais, atividades comportamentais, psicológicas e sociológicas (TETER et al, 2002).

É importante reconhecer que o sistema nervoso continua a se remodelar, não apenas durante o período inicial, mas também durante todo o período de desenvolvimento, em resposta às influências ambientais e aos eventos geneticamente programados. Embora a influência da plasticidade seja mais pronunciada durante os períodos críticos de desenvolvimento pós-natal, declinando durante a adolescência, um nível significativo de adaptabilidade permanece mesmo durante a vida adulta.

Num estudo clássico de Hubel, Wiesel e Levay, 1977, citado por Rapoport et al, 2001, macacos com um olho completamente coberto desde o nascimento desenvolveram um grande número de aferentes, a partir do núcleo geniculato lateral em direção ao córtex visual, estruturalmente relacionado com o olho aberto em comparação com o olho suturado. As vias sinápticas associadas ao olho suturado mostram um declínio de atividade, pela ausência da estimulação sensorial

apropriada vinda do ambiente, enquanto que as vias sinápticas associadas ao olho aberto mostram mais eficiência sendo adequadamente ativadas. Destarte, ilustrando o processo de plasticidade chamado de *maturação por experiência*.

Uma outra forma de plasticidade pode ser demonstrada pelos estudos em roedores, que mantidos em ambientes ricos em estímulos, apresentam um aumento significativo da espessura do córtex cerebral, extensa ramificação dendrítica, aumento na densidade sináptica, elevada atividade acetilcolinesterásica, aumento da razão RNA/DNA, diversidade de transcrição de RNA e aumento das concentrações de determinadas proteínas quando comparados com animais mantidos em ambientes pobres em estímulos ou em condições laboratoriais padronizadas. Esses resultados sugerem que estímulos ambientais, que não são predeterminados e que variam entre indivíduos, contribuem para a estrutura do cérebro (RAPOPORT et al, 2001; ROSENZWEIG & BENNETT, 1996).

A exposição às condições ambientais enriquecidas, precocemente no desenvolvimento, também resulta em melhoria na performance nos testes de aprendizagem em ratos (ROSENZWEIG & BENNETT, 1996).

O ambiente durante os primeiros anos de vida em humanos também é responsável por profundos efeitos na estrutura e função do sistema límbico, que é crítico para a função social e emocional (RICE & BARONE S JR, 2000; ROSENZWEIG & BENNETT, 1996).

Rosenzweig & Bennett, 1996, descreveram uma cascata de eventos neuroquímicos após uma estimulação inicial, que leva à síntese de proteína e mudanças estruturais no cérebro, utilizando um modelo animal em galinhas. No início, uma estimulação sensorial ativa órgãos receptores, que por sua vez, ativam neurônios aferentes, utilizando vários sistemas neurotransmissores sinápticos como acetilcolina (Ach) e glutamato. Inibidores da atividade sináptica colinérgica, como a escopolamina e pirenzepina, podem prevenir a memória de duração curta (STM, *short term memory*), assim como inibidores de receptores glutamatérgicos, incluindo tanto receptores NMDA e AMPA. Alterações da regulação de canais iônicos podem inibir a formação de STM, pelo tratamento com cloreto de lantânio em canais de cálcio e a ouabaína nos canais de sódio e potássio. A inibição de segundos

mensageiros também tem um papel amnésico. Por exemplo, a inibição da adenilato ciclase pela forskolina ou do diacil glicerol pela bradiginina. Agentes que não bloqueiam proteínas quinases cálcio-calmodulina dependentes, mas que bloqueiam a proteína quinase A ou a proteína quinase C previnem a formação da memória de duração longa (LTM, *long term memory*). Uma única sessão de treinamento leva ao aumento da produção de RNA total no cérebro desses animais. O processo neuroquímico envolvido na produção de memória em galinhas parece ser o mesmo relacionado com o mecanismo de memória através da potenciação de longa duração (*long term potentiation*) em cérebros de mamíferos.

A velocidade de transmissão neural não depende somente do contexto sináptico, mas também das propriedades estruturais das fibras de conexão, incluindo o diâmetro axonal e a espessura da bainha de mielina. Os axônios constituintes dos principais tratos de fibras nervosas do cérebro humano, como os do corpo caloso e do trato corticoespinhal continuam a se desenvolver ao longo da infância e adolescência. Achados do *pos-mortem* sugerem que o diâmetro axonal e a bainha miélica passam por um desenvolvimento conspicuo durante os primeiros dois anos de vida pós-natal, porém não se tornam plenamente maduros antes da adolescência ou mesmo na vida adulta tardia (PAUS et al, 1999).

O cérebro humano, segundo critério de circunferência cefálica, parece passar por períodos de rápido crescimento, intercalados com períodos de crescimento relativo mais lento, sugerindo que o desenvolvimento possa ocorrer em estádios de pique. O estádios de pique ocorrem nas faixas etárias de 2-4; 5-8; 10-13 e 14-18 anos. Os dados da literatura também apontam para um dimorfismo em relação ao sexo: as mulheres apresentam um substancial aumento da perimetria cefálica em torno dos 11 anos, enquanto os homens apresentam crescimento significativo em torno dos 15 anos (EPSTEIN, 1986).

As sinapses, substratos para quase toda comunicação célula a célula no SNC, amadurecem em torno de três semanas, durante o período pós-natal em ratos e ao longo da adolescência em macacos e humanos. Lagercrantz & Ringsted, 2001, descreveram cinco ondas de sinaptogênese identificadas em estudos do

córtex visual primário de macacos, com resultados extrapolados para humanos. A fase 1 se inicia em torno de 6-8 semanas de gestação, no mesmo período em que começa a proliferação neuronal. Esse processo é limitado às estruturas inferiores como a subplaca cortical. A fase 2 se inicia após 12-17 semanas, ocorrendo na placa cortical, de modo esparsos. Essas sinapses iniciais formam contatos com os brotos dendríticos de neurônios. A fase 3 é mais rápida, ocorrendo em torno do meio da gestação (20-24 semanas) e persiste até 8 meses após o nascimento. A taxa de sinaptogênese tem sido estimada em 40.000 novas sinapses a cada segundo, em cada córtex estriado do macaco. Esse processo ocorre simultaneamente à crescente arborização de axônios e dendritos. A fase 4 se estende até a puberdade, apresentando também uma elevada frequência. Na fase 5, a sinaptogênese continua até o envelhecimento, em torno dos 70 anos, mas, ao mesmo tempo, exibindo perdas consideráveis (LAGERCRANTZ & RINGSTEDT, 2001; RICE & BARONE S JR, 2000).

As primeiras duas fases parecem não ser afetadas pela ausência de estimulação sensorial, enquanto a terceira fase parece ser parcialmente dependente do *input* sensorial. A sinaptogênese durante essa terceira fase é parcialmente intrínseca e parcialmente dependente da estimulação sensorial. Portanto, coincide com os períodos críticos de desenvolvimento do cérebro. A maioria das habilidades cognitivas, motoras e sensoriais funciona muito cedo após o nascimento, quando a arquitetura sináptica está sendo fortemente modelada. A sinaptogênese durante a quarta fase é ainda mais dependente da experiência. Durante essa fase ocorre a reorganização e o ajuste fino dos circuitos neuronais. Após a puberdade, parece haver uma lentidão de todo o processo (LAGERCRANTZ & RINGSTEDT, 2001).

A capacidade robusta para atividade sinaptogênica depende da ativação orquestrada de elementos pré e pós-sinápticos, a partir principalmente do fenômeno da potenciação de longo prazo (LTP, *Long Term Potentiation*). Assim como no modelo para formação de memória, é necessário a formação e remoção dinâmica de sinapses e mudanças em sua morfologia. A sinalização para plasticidade sináptica inclui mensageiros intraneuronais (retrógrados e anterógrados), interneuronais (transináptica e extra/parasináptica) e intercelulares,

através da glia. Essa sinalização inclui muitas moléculas de diferentes famílias tais como: moléculas da matrix extra-celular, semaforinas/colapsinas, imunoglobulinas, inibidores associados à mielina, receptores tirosina quinase, netrinas, fatores neurotróficos, fatores de crescimento, citocinas da resposta inflamatória e neurotransmissores, e muitas das moléculas inibidoras pertencem às mesmas classes (HORNER & GAGE, 2000; TETER et al, 2002).

A formação de contatos sinápticos representa um processo crítico durante o desenvolvimento do sistema nervoso e desempenha um papel crucial no processo de plasticidade sináptica de longa duração. A capacidade dos neurônios do SNC de formar sinapses parece depender da disponibilidade do colesterol. A sinaptogênese massiva precisa de grandes quantidades de colesterol, a partir da produção por células gliais e sua distribuição via lipoproteínas contendo apoE. O colesterol no SNC é produzido principalmente *in situ* (o transporte através do líquido céfalo-raquidiano é limitado), sugerindo um laço importante entre a sinaptogênese e a síntese de colesterol glial, dessa forma, ajudando a esclarecer porque a sinaptogênese somente ocorre após a diferenciação da macroglia central, durante o desenvolvimento do cérebro (MAUCH et al, 2001).

Pfrieger e colaboradores, num artigo publicado na *Science*, 2001, demonstraram, de forma elegante em culturas purificadas de células ganglionares da retina (RGCs), que o fator sinaptogênico derivado da glia (GSF) representa de fato o próprio colesterol. E o efeito máximo da atividade sinaptogênica do colesterol está relacionado diretamente com a fração associada à apoE. Baseado nesses achados, é possível especular que mutações na apoE podem comprometer a distribuição do colesterol derivado da glia para os neurônios, causando uma perda gradual das sinapses e células nervosas em áreas específicas cerebrais. Ainda, o transporte do colesterol mediado pela apoE poderia contribuir para regeneração das conexões sinápticas após injúria cerebral (MAUCH et al, 2001) (GORITZ et al, 2002).

Além disso, trabalhos de Koudinov & Koudinova, 2001, sugerem que a síntese de lipídios e o efluxo de colesterol são eventos críticos para o processo de potenciação de longo prazo (*Long Term Potentiation* - LTP), em neurônios

hipocampais. No SNC, tanto lipoproteínas contendo apoE, secretadas por astrócitos, como partículas HDL-símile no líquido céfalo-raquidiano poderiam funcionar como aceptores e veículos para distribuição do colesterol para sítios de remodelagem de membrana, durante a morfogênese dendrítica provocada pela atividade sináptica de longa duração. A redistribuição e síntese do colesterol, eventos mediados por lipoproteínas contendo apoE, representariam processos complementares, entretanto cruciais, principalmente nos estádios precoces ou tardios da plasticidade estrutural das espinhas dendríticas, supostos sítios de formação da memória.

Mapas da taxa de crescimento local revelam a complexidade e heterogeneidade do crescimento tecidual durante o processo de desenvolvimento e maturação do cérebro humano. Indivíduos, com faixa etária de 3-6 anos exibem um foco de crescimento em pico, ao longo do corpo caloso anterior, em circuitos frontais que auxiliam a manutenção do estado de vigília e regula a organização e planejamento de novas ações. O rápido crescimento local é consistente com o aumento extraordinário nas taxas do metabolismo de glicose no córtex frontal nas idades de 2 e 4 anos, com as taxas metabólicas frontais permanecendo na taxa de 199% em relação aos seus valores no adulto. Em indivíduos com 7-11 anos, a estabilidade comparativa dos sistemas de fibras espleniais e rostrais do corpo caloso se contrasta com o rápido crescimento focal do istmo caloso. Em indivíduos com faixa etária de 15-16 anos, as maiores taxas de crescimento ocorrem no sistema temporo-parietal, áreas funcionalmente especializadas para linguagem e para o entendimento das relações espaciais (EICHNER et al, 2002).

1.1.5. Desnutrição, doenças diarréicas e declínio cognitivo

O estado nutricional é provavelmente a maior influência ambiental para o feto e para o neonato. Um adequado suprimento de nutrientes é necessário para a manutenção do crescimento e para o desenvolvimento normal de todas as funções fisiológicas. Segundo Morgane et al, 1993, o fornecimento adequado de nutrientes é essencial para o feto por causa de três processos básicos: (1) manutenção, isto é, a atividade química ou de transporte, concentração e o trabalho mecânico

necessário para a existência de um estado de equilíbrio dinâmico celular (*steady state*); (2) crescimento, isto é, a formação de novo citoplasma, membranas celulares e organelas; e (3) diferenciação, isto é, alterações da composição e caracterização de tecidos específicos.

A desnutrição infantil é diagnosticada atualmente pela comparação das medidas antropométricas da criança com as referências médias internacionais, considerando a idade e o sexo, e expressando os resultados em escores de desvio padrão (DPs) (GRANTHAM-MCGREGOR& ANI, 2001).

Os efeitos da desnutrição no desenvolvimento cognitivo de crianças são extremamente complexos. O desenvolvimento é comprometido por diversos fatores, incluindo genéticos, características individuais; ambiente proximal, incluindo a qualidade das relações com os membros da família e a quantidade de estímulos em casa; ambiente distal, incluindo cultura, área residencial e *status* sócio-econômico, tanto quanto saúde e a nutrição da criança. Além disso, essas influências operam ao longo da infância, com esses efeitos sendo dependentes de influências prévias, atuais e futuras, tanto quanto do seu estágio de desenvolvimento (GRANTHAM-MCGREGOR& ANI, 2001).

Dessa forma, o estado de desnutrição envolve aspectos biológicos, sociológicos e psicológicos. Por causa desses fatores, predisposição e o comportamento associados à desnutrição tendem a passar de uma geração para outra. Conseqüentemente, esses efeitos são perpetuados e podem se acumular ao longo de várias gerações.

Múltiplos estudos ao longo das últimas cinco décadas têm avaliado os efeitos da desnutrição no SNC em animais experimentais e em humanos. Os resultados desses estudos revelam a redução do suprimento de energia e/ou de vários nutrientes essenciais durante os primeiros estádios de desenvolvimento, com profundos efeitos na estrutura e função do cérebro. A desnutrição compromete o desenvolvimento cerebral, diminuindo o número de ciclos de replicação celular, com a redução do DNA total, restringindo a arborização dendrítica, portanto, reduzindo as conexões entre neurônios. Em humanos, a má nutrição na fase

intrauterina e especialmente no início do período pós-natal afeta o número de células, explicando a redução do conteúdo de DNA (UAUY, MENA, PEIRANO, 2001).

O desenvolvimento do cerebelo, córtex cerebral e hipocampo é o mais afetado na deprivação nutricional no período perinatal. As conexões sinápticas são comprometidas, especialmente quando a desnutrição ocorre após o nascimento até os três anos de idade. Alterações nos precursores dietéticos influenciam os níveis de neurotransmissores (serotonina, norepinefrina, dopamina e acetilcolina) em regiões específicas do cérebro. A deficiência do suprimento de lipídios essenciais e não essenciais afeta a composição estrutural do cérebro e a formação das bainhas de mielina. Os achados funcionais associados incluem alterações no perfil eletroencefalográfico (EEG), respostas evocadas visuais e auditivas incipientes, desenvolvimento cognitivo e motor e capacidade de socialização comprometidos (ALMEIDA, TONKISS, GALLER, 1996; POLLITT, 2000; PRENTICE & PAUL, 2000; UAUY, MENA, PEIRANO, 2001).

Em modelos animais em ratos, quando a fêmea prenha adulta é submetida a uma dieta pobre em proteína no início da gestação, ao longo das primeiras duas semanas (correspondendo ao primeiro trimestre da gravidez em humanos), não ocorre modificações importantes na citoarquitetura, matriz extracelular e na maioria dos parâmetros de diferenciação glial e neuronal nos cérebros dos recém-nascidos. Entretanto, durante as primeiras 2 semanas de vida pós-natal (correspondendo em humanos ao terceiro trimestre de gestação e ao período neonatal), astrogênese, produção de matriz extracelular, diferenciação neuronal e morte celular programada apresentam alterações marcantes na progênie dos animais com déficit de proteína no período pré-natal. Dessa forma, ilustrando uma enorme plasticidade do cérebro em desenvolvimento após uma agressão inicial (GRESSENS et al, 1997).

Animais submetidos à desnutrição crônica também apresentam deficiência nos processos de maturação social e de comportamento. O animal desnutrido se isola funcionalmente das experiências de aprendizagem, essencialmente rejeitando a interação com o ambiente. A desnutrição pós-natal e a deprivação do estímulo ambiental tendem a agir sinergicamente para isolar funcionalmente o animal de

seu ambiente físico e social. Portanto, ele se torna apático e mostra pouco envolvimento social e pouco interesse pela exploração do ambiente, resultando em significativa perda sensorial, geralmente envolvendo várias modalidades. O animal geralmente mostra dificuldade em se adequar às novas situações que requerem respostas adaptativas e acomodação às novas exigências do ambiente (MORGANE et al, 1993).

Infecções em crianças e a conseqüente desnutrição contribuem anualmente por 13 milhões de mortes ao redor do mundo, afetando principalmente crianças com menos de 5 anos de idade. Os dados epidemiológicos globais mostram que a diarreia é a causa mais comum de morbidade na infância e tem um profundo impacto negativo na saúde e desenvolvimento. Infecções podem levar à redução no consumo de alimento devido ao estado anoréxico, perda de nutrientes por causa de vômitos, diarreia, má absorção e febre crônicas, levando à deficiência nutricional com conseqüências importantes no crescimento e higidez do sistema imunológico (EHIRI& PROWSE, 1999).

A diarreia é uma das principais causas de mortalidade e morbidade entre crianças em países subdesenvolvidos (KOSEK, BERN, GUERRANT, 2003). Uma revisão recente feita pelos referidos pesquisadores, concentrada nas taxas de mortalidade atribuídas às doenças diarreicas, demonstrou que crianças com faixa etária < 5 anos tiveram uma mediana de 3,2 episódios de diarreia/ano. As estimativas de mortalidade revelaram que 4,9 crianças /1000/ano em áreas pobres morrem como resultado de complicações da diarreia nos primeiros 5 anos de vida, representando um declínio em relação às estimativas anteriores de 13,6 e 5,6 crianças/1000/ano. Essa redução foi mais pronunciada em crianças menores de 1 ano de idade. Contudo, apesar da tendência da redução das taxas de mortalidade, a diarreia ainda é responsável pela mediana de 21% de todas as mortes de crianças com menos de 5 anos de idade nos países subdesenvolvidos, sendo ainda responsável por 2,5 milhões de mortes anuais. Além disso, não houve queda da morbidade atribuída à diarreia. Como resultado do crescimento populacional e falta de infraestrutura básica e sanitária em regiões pobres do planeta, o componente de morbidade devido à diarreia, de fato aumentou em relação às estimativas anteriores (GUERRANT et al, 2002a).

Um estudo longitudinal recente de Moore e colegas, com dados do projeto coorte do Gonçalves Dias (1989-1996), acompanhou as mudanças epidemiológicas do perfil da prevalência da diarreia e desnutrição em crianças, confirmando declínio nas taxas de diarreia de seis episódios/criança/ano (1991) para dois episódios/criança/ano (1996) e também nos dias de diarreia de 30,8 dias/criança/ano para 3-8,5 dias/criança/ano. Confirmando, ainda, que tanto os escores de peso-por-idade e altura-por-idade foram importantes fatores preditivos para a incidência de diarreia, e que benefícios do estado nutricional correlacionam significativamente com a redução das taxas de diarreia nessa população (MOORE et al, 2000).

Doenças infecciosas e parasitárias em crianças das áreas mais pobres do terceiro mundo são provavelmente o principal fator que contribui para as diferenças nas exigências energéticas. A maioria das doenças afeta tanto o consumo, quanto a utilização, alterando a equação do balanço energético, levando dessa forma, em maior ou menor extensão, ao comprometimento do crescimento. Em muitos casos, os efeitos anoréxicos, associados às reduções na absorção de nutrientes devido às infecções agudas, como nas gastroenteropatias e em doenças parasitárias gastrointestinais, são provavelmente dominantes. Assim, a energia só será utilizada com máxima eficiência quando todos os nutrientes estiverem presentes em quantidades adequadas, na situação de deficiência de nutrientes, por consequência de doenças infecciosas e parasitárias, haverá um comprometimento do balanço energético (PRENTICE & PAUL, 2000).

Estudos do grupo do Dr. Lima demonstraram correlações positivas entre as infecções parasitárias por *Cryptosporidium parvum* (GUERRANT et al, 1999; NEWMAN et al, 1994), *Giardia lamblia* (NEWMAN et al, 2001) e *Escherichia Coli* enteroagregativa (STEINER et al, 1998) com a incidência de diarreia nos primeiros anos de vida e correlações negativas como parâmetros do desenvolvimento normal de crianças (estado nutricional e fatores antropométricos).

A DALY (*Disability Adjusted Life Years* = Anos de Vida Perdidos por Incapacitação) atual para doenças diarreicas é estimada em ~100 milhões, com

>95% devido à mortalidade. Caso apenas 5% das crianças que tiveram em média quatro a oito episódios repetidos de diarreia nos primeiros dois anos de idade apresentem uma incapacitação de longo termo, mesmo no menor grau de incapacitação, isso por si só, poderia dobrar os valores de DALYs totais para a diarreia (GUERRANT et al, 2002a). Diarreia é definida como a ocorrência de ≥ 3 fezes liquefeitas precedendo um período de 24-h. Um episódio de diarreia é descrito com uma doença diarreica com duração ≥ 1 dia e separado de outro episódio por um intervalo de ≥ 48 h sem diarreia. Diarreia aguda é definida como um episódio de diarreia com duração de < 14 dias e diarreia persistente como um episódio com duração de ≥ 14 dias (GUERRANT et al, 2002b).

A complexidade desses problemas é agravada pela limitação das estratégias atuais de controle das doenças diarreicas que enfatizam a remediação terapêutica em detrimento da relação crucial entre a diarreia e os fatores econômicos e sócio-culturais (EHIRI & PROWSE, 1999). Mais numerosos, e portanto mais importante para a sociedade, são os casos marginais de desenvolvimento cerebral subótimo, isto é, o não preenchimento do potencial genético do indivíduo. É geralmente aceito que a maturação do Sistema Nervoso Central e o desenvolvimento pleno da inteligência dependem de três fatores críticos: (1) hereditariedade ou diretrizes genéticas, (2) estímulo ambiental, (3) nutrição adequada (MORGANE et al, 1993).

Trabalhos desenvolvidos na Unidade de Pesquisas Clínicas (UPC) e Instituto de Biomedicina (IBIMED) da Universidade Federal do Ceará, em colaboração com a Universidade de Virgínia, foram um dos primeiros a identificar que a diarreia infantil precoce está associada com déficits do crescimento linear (MOORE et al, 2001), subsequente impedimento físico (GUERRANT et al, 1999) e impedimento da função cognitiva (GUERRANT et al, 1999; GUERRANT et al, 2002b; LIMA et al, 2000) em um estudo coorte de longa duração no Nordeste do Brasil, portanto, ilustrando a relação da diarreia infantil precoce com déficits funcionais de longo prazo (NIEHAUS et al, 2002).

Nos primeiros trabalhos do grupo do Dr. Aldo Lima sobre o impacto da diarreia ao de longo prazo em crianças, com história de diarreia, esses autores

demonstraram redução dos escores de aptidão física (avaliados pelo método de Haward), 4-7 anos após a história de diarreia, correlacionada diretamente com os episódios de diarreia nos primeiros dois anos de vida, e infecção por criptosporidiose. Esses achados foram independentes dos escores respiratórios, afetados por pneumonia, e outras variáveis como anemia, infecções helmínticas e mesmo valores antropométricos (GUERRANT et al, 1999). As reduções de 4-8% dos escores do teste de Haward foram comparáveis às diferenças de 6,9% observadas com tratamento por albendazole versus placebo em crianças quenianas, em idade escolar com infestação helmíntica (STEPHENSON et al, 1993); e em média de 4,3% da diferença dos escores em trabalhadores rurais cortadores de cana, tratados para esquistossomose que se correlacionou com a diferença de 16,6% na produtividade no trabalho (NDAMBA et al, 1993).

Economistas utilizam escores de idade escolar (IE) e idade de início da escolaridade (IIE) como fator preditivo da produtividade econômica. Num recente estudo, envolvendo 75 crianças com perfil de diarreia conhecido e que completaram a maior parte do estudo coorte, com faixa etária de 6-12, GUERRANT et al avaliaram os efeitos da diarreia infantil (nos primeiros dois anos de idade) nos parâmetros de escolaridade. Os dados demonstraram que os escores de IIE foi significativamente aumentado, correlacionando-se com a carga de diarreia, mesmo considerando outras co-variáveis como antropometria (que se correlacionou de forma independente com a história de diarreia), assim como educação materna, status socioeconômico e outras doenças diarreicas. Achados semelhantes foram observados também com idade escolar (GUERRANT et al, 2002b).

O grupo do Dr. Aldo Lima foi o pioneiro na caracterização e quantificação da etiologia da diarreia (episódios de diarreia e dias de diarreia) no impacto tardio em funções cognitivas em crianças. Num estudo preliminar para avaliar a função cognitiva de crianças (6-10 anos), que foram acompanhadas desde o nascimento, a partir de um projeto coorte, foi observado uma correlação inversa dos escores dos testes QI (TONI III), mesmo após controlar por educação materna, aleitamento exclusivo, e helmintíase (*Ascaris* ou *Trichuris*), com o número de episódios de diarreia infantil (dois primeiros anos de vida). Além disso, os escores do Wechsler Intelligence

Scale for Children (WISC-III) "Coding" e WISC-III "Digit Span" (total e reverso) foram também significativamente comprometidos em 17 crianças com história de diarreia persistente nos primeiros dois anos de vida, mesmo controlando por helmintíase e educação materna (NIEHAUS et al, 2002).

A partir dos dados apresentados no encontro da Sociedade Americana de Medicina Tropical e Higiene (ASTMH) em Houston, 2000, e submetidos posteriormente para publicação, LORNTZ e colaboradores identificaram que a idade de início escolar e o fator idade-escolaridade são significativamente atrasados, correlacionando com o índice de diarreia infantil precoce. Na verdade, o melhor predisponte da performance escolar nessas crianças foi a quantidade de diarreia nos primeiros dois anos de vida, mesmo quando controlando para educação materna, renda familiar e peso ao nascer (GUERRANT et al, 2002b). Esses achados levantam questões básicas acerca da relação entre os marcadores genéticos e ambientais e fatores relacionados à saúde, mesmo controlando para outras co-variáveis, dessa forma, ajudando a identificar potenciais grupos de risco para uma intervenção futura e para o estabelecimento de estratégias de prevenção. Sabe-se que crianças de baixo perfil socioeconômico apresentam, desproporcionalmente, maior risco de exposição a fatores ambientais prejudiciais à saúde e ainda apresentam evolução negativa à essa exposição, quando comparadas com outras crianças que cresceram em circunstâncias menos adversas (BELLINGER et al, 1988).

2. JUSTIFICATIVA, HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1. Justificativa

Foi demonstrado que não há associação entre os polimorfismos da apolipoproteína E e a capacidade cognitiva geral em uma população pediátrica saudável em Cleveland, OH, (TURIC et al, 2001). Contudo, pouco se sabe a respeito de como fatores genéticos, tal como os alelos da APOE, influenciam os efeitos adversos das doenças diarréicas na maturação cerebral. Em contrapartida, APOε4 significativamente se correlaciona com uma recuperação deficiente, após lesão cerebral por traumatismo craniano (GRAHAM et al, 1999; LIBERMAN et al, 2002; LICHTMAN et al, 2000). Diante de um ambiente inadequado, crianças podem apresentar impedimento cognitivo induzido por diferentes fatores, incluindo doenças diarréicas e desnutrição (independentemente de anemia ou aleitamento materno) (BARRES& SMITH, 2001; CHECKLEY et al, 2002; GUERRANT et al, 1999; NIEHAUS et al, 2002), anemia ferropriva (CARVALHO et al, 1995; IRWIN& KIRCHNER, 2001; YOUNG, 2000), desequilíbrios da dieta (PRENTICE& PAUL, 2000), curto período de aleitamento (GORDON, 1997; MAEKAWA et al, 1995; XIANG et al, 2000), deficiências proteica, vitamínica e mineral (GRANTHAM-MCGREGOR, WALKER, CHANG, 2000; MORLEY& LUCAS, 1997; POLLITT, 2000; WASANTWISUT, 1997), contribuindo para a perda do potencial plástico do cérebro.

Dessa forma, crianças portadores dos alelos APOε4 poderiam ser mais vulneráveis ao comprometimento cognitivo, secundariamente aos efeitos persistentes e recorrentes da diarreia infantil precoce. A possível causalidade devido ao alelo APOε4 aos efeitos deletérios da diarreia no desenvolvimento cognitivo poderia dar subsídios críticos para a identificação de grupos de risco nas populações pediátricas em áreas pobres e para o planejamento de potenciais intervenções precocemente, quebrando o ciclo vicioso da diarreia/desnutrição ⇔ déficits cognitivos, **Figura 7**, destarte contribuindo para a execução de políticas de saúde preventivas localmente.

Esse trabalho (primeiro estudo de genotipagem da APOE no Nordeste do Brasil) pode assim oferecer dados epidemio-demográficos para elucidar os mecanismos farmacológicos envolvidos na possível relação dose-gene-dependente do polimorfismo da APOE e seu impacto no desenvolvimento, especialmente sobre condições de estresse ambiental.

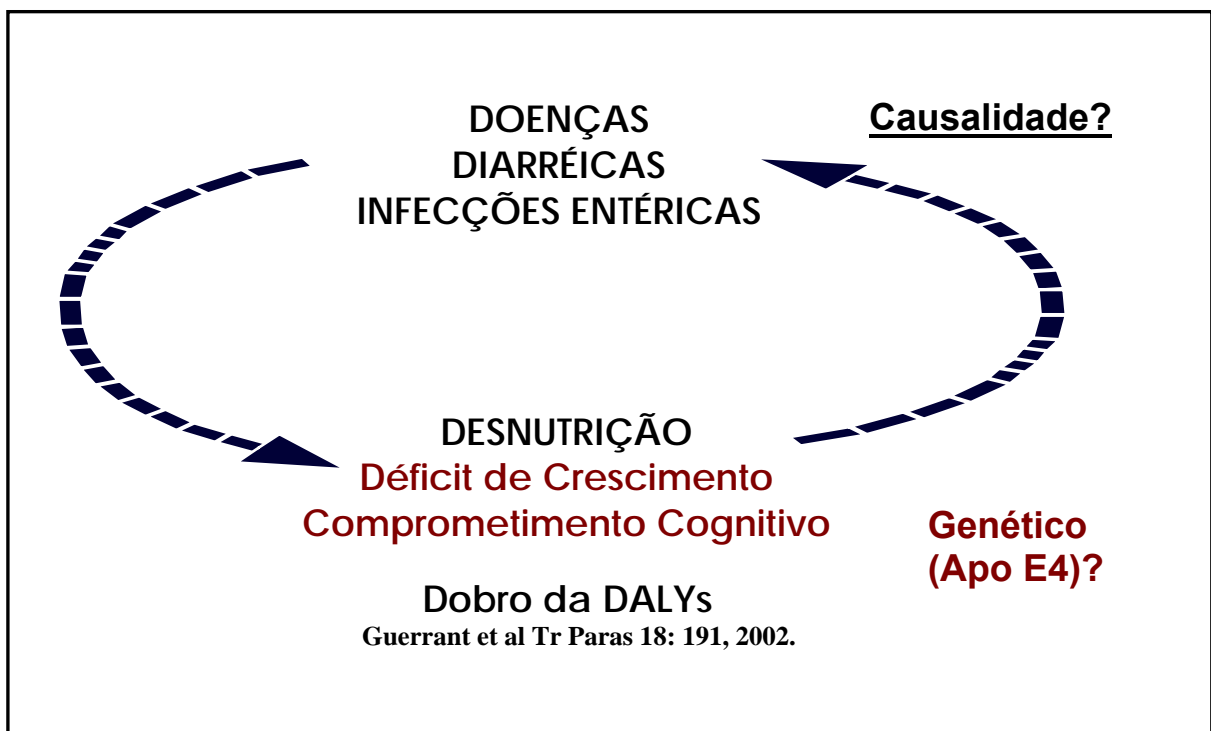


Figura 7: Ciclo vicioso da diarreia e desnutrição, contribuindo para o aumento da DALYs, com incomensuráveis perdas para o desenvolvimento pleno da criança e com repercussões imensas para economia e soberania nacionais. Existe causalidade da perda cognitiva (e plasticidade) por causa da diarreia/desnutrição com o polimorfismo da APOE durante o desenvolvimento infantil?

2.2. Hipótese

Nós postulamos que a prevalência do alelo APOε4 irá aumentar a vulnerabilidade das crianças ao comprometimento cognitivo, confirmado pela redução dos escores neuropsicológicos nessas crianças, com história de diarreia persistente e recorrente nos primeiros dois anos de vida, em comparação com os controles que tiveram melhores escores nos testes, com similar história de diarreia.

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivos gerais:

Essas questões são o foco desse estudo piloto. Para isso, avaliamos o perfil cognitivo de parte da população pediátrica na área urbana do Gonçalves Dias, em Fortaleza, Nordeste do Brasil, comparando a história prévia de diarreia nos primeiros dois anos de idade, em relação à prevalência dos alelos da APOE. A partir daí, examinamos, então, se os alelos APOε4 correlacionaram com o déficit cognitivo de funções executivas corticais, no qual já foi previamente demonstrada a associação com a severidade da diarreia (GUERRANT RL, 2003; GUERRANT et al, 1999; MAHLEY& JI, 1999; NIEHAUS et al, 2002). Portanto, nesse estudo, nós abordamos as interações entre o genótipo da APOE e o desenvolvimento cognitivo em crianças, tão profundamente relacionado com as doenças diarreias infantis.

2.3.2. Objetivos específicos:

- (1) Avaliar a metodologia para genotipagem da apolipoproteína E (incluindo extração de DNA a partir de células bucais) e para construção e gerenciamento de dados e análise das variáveis envolvidas.
- (2) Fornecer o primeiro levantamento epidemiológico do polimorfismo da apolipoproteína E no Nordeste do Brasil.
- (3) Definir a correlação da frequência alélica APOε4 em crianças com pior desempenho cognitivo nos testes de função executiva e inteligência (isto é, escores de TONI e fluência semântica < que a mediana da população do estudo) de acordo com a história progressiva de diarreia nos primeiros dois anos de vida.
- (4) Identificar os testes neuropsicológicos (e domínios cognitivos) mais sensíveis ao impacto da diarreia.
- (5) Identificar grupos de risco de acordo com a morbidade de diarreia e déficits cognitivos.

3. DESENHO EXPERIMENTAL E MÉTODOS

3.1. Local e população do estudo

O desenho experimental trata-se de um estudo coorte realizado longitudinalmente envolvendo 77 crianças, que fazem parte de uma população estratificada (com estudos em andamento), com história de diarreia infantil nos primeiros anos de vida conhecida e atualmente residente na área do Gonçalves Dias, em Fortaleza, Nordeste do Brasil. O Gonçalves Dias é uma comunidade de mais de 1800 pessoas (fevereiro, 1993), cerca de 13,5% são crianças com menos de 5 anos de idade. Uma visão aérea da área do Gonçalves Dias, com o mapeamento das casas envolvidas no projeto coorte por GPS, *Global Position System*, próximo do Instituto de Biomedicina, IBIMED, e Unidade de Pesquisas Clínicas, UPC, (apenas alguns blocos de distância da população em estudo) aparece na **Figura 8**. O método de GPS representa um sistema de navegação por satélite utilizado em pesquisa epidemiológica. A comunidade do Gonçalves Dias foi descrita com mais detalhes por (LIMA et al, 2000).

3.1.1. Sujeitos:

Crianças (com mais de 6 anos de idade) com história de diarreia nos primeiros dois anos de vida conhecida, sendo acompanhadas desde o nascimento por um projeto coorte, morando no Gonçalves Dias (população aproximada de 1800 moradores), favela localizada no Bairro Rodolfo Teófilo, em Fortaleza (população estimada de 2,3 milhões habitantes), capital do estado do Ceará (população aproximada de 6 milhões) no Nordeste do Brasil.

3.2. Projeto coorte

As mulheres grávidas eram identificadas na comunidade pela equipe de campo (duas enfermeiras e uma agente de saúde) e eram solicitadas para serem incluídas no projeto. Após darem o consentimento informado, as mulheres escolhidas para participar do estudo preenchiam um detalhado questionário demográfico e socio-econômico com a ajuda da enfermeira do estudo. A casa de cada criança recém-nascida era visitada três vezes semanalmente (acompanhadas desde o nascimento) pela enfermeira do projeto coorte, que registrava os episódios de diarreia e informações da dieta. A prevalência da diarreia e dados antropométricos foram computados num banco de dados extenso do projeto coorte. A mãe ou responsável da criança com diarreia fornecia informações clínicas acerca da doença, incluindo outros sintomas (febre, vômito, desidratação), consistência e característica das fezes e medicações utilizadas. A enfermeira do estudo coorte visitava a família da criança diariamente até 48h depois da resolução da diarreia.

3.2.1. Critério de diarreia

A diarreia foi definida como a ocorrência de mais de três fezes líquidas precedendo um período de 24h, segundo critério preconizado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1997). Um episódio de diarreia foi definido como diarreia com duração de ≥ 1 dia e intercalado de outro episódio de diarreia por um período de ≥ 48 h sem diarreia. Nós definimos como diarreia aguda um episódio com duração de < 14 dias e diarreia persistente como um episódio de ≥ 14 dias.

3.3. Critérios de inclusão e exclusão do estudo

Os critérios de inclusão ao estudo foram: Consentimento dos pais/responsáveis; crianças participantes com mais de 6 anos de idade, atualmente morando nas favelas do Gonçalves Dias, sendo acompanhadas para avaliar a morbidade por diarreia desde o nascimento e tendo nascidas a termo (incluídas no projeto coorte do Gonçalves Dias).

Os critérios de exclusão ao estudo foram: crianças que se mudaram para uma outra área; evidências de distúrbios neuropsiquiátricos; incapacidade de participar dos testes padronizados; objeção dos pais/responsáveis ou do médico da família.



Figura 8: Vista aérea do Gonçalves Dias (Bairro Rodolfo Teófilo) onde se encontra a população em estudo, mapeada por GPS (*Global Position System*). Os pontos mostram as residências onde o projeto coorte atende.

3.4. Recrutamento dos sujeitos

Nós recrutamos aleatoriamente 77 crianças, com reconhecida história de diarreia na favela do Gonçalves Dias (GD), para avaliar o grau de impedimento cognitivo tardio durante a infância (isto é, > 6 anos de idade). A população pediátrica inteira no Gonçalves Dias (GD) inclui cerca de 380 crianças que foram incluídas nesse estudo coorte, no qual tanto o acompanhamento médico e fichas demográficas são disponíveis para controle interno. Desses, 77 crianças atingiram \geq 6 anos de idade a tempo de serem incluídas nesse projeto.

3.5. Proteção contra riscos

Os pais ou responsáveis das crianças elegíveis para o estudo foram abordados pelo investigador do estudo ou alguém delegado por ele (como a enfermeira da equipe de campo), para explicar as características do estudo. Com a concordância de participar do estudo, juntos leram e assinaram o termo de consentimento aprovado. Todos os detalhes do estudo e o conteúdo do termo de consentimento foram explicados. Foi tomado um cuidado especial para assegurar a confidencialidade da informação. A escovação das células bucais representou mínimo ou mesmo nenhum risco para os participantes da pesquisa. Uma técnica experiente conduziu a colheita de células bucais. Precauções de rotina foram seguidas para reduzir os riscos.

A possibilidade pequena de que os resultados cognitivos e fichários associados ao indivíduo fossem revelados, foi superada pelo potencial benefício desse estudo. Ambas as amostras de células bucais e resultados cognitivos foram identificados com código anônimo. O esclarecimento desses fatos estava contido no termo de consentimento.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, sob o número 264/04, de acordo os princípios regidos pela Resolução nº 196/96 da Comissão de Ética em Pesquisa, do Conselho Nacional de Saúde (CONEP).

3.6. Proteção da confidencialidade

Não disponibilizamos nenhuma informação, em relação aos resultados prévios dos testes cognitivos das crianças, para nenhum membro da equipe de campo. Os espécimens bucais foram identificados somente por códigos. O método de células bucais propicia uma fonte não invasiva de DNA para estudos epidemiológicos. É um método simples e efetivo para conduzir a extração de DNA, com uma importante vantagem de ser indolor e envolver mínimo risco. É adequado para estudos de coorte de larga escala (FEIGELSON et al, 2001; GARCIA-CLOSAS et al, 2001; LE MARCHAND et al, 2001; SATIA et al, 2002), e tem sido testado com sucesso, em populações pediátricas (LONDON et al, 2001; ZHENG et al, 2001).

3.7. Cronograma experimental

O cronograma experimental do estudo foi realizado a partir de três etapas distintas.

Etapa 1: Realização da avaliação cognitiva, a partir da condução de testes neuropsicológicos cegos (GUERRANT et al, 2003; NIEHAUS et al, 2002; RICE & BARONE S JR, 2000), em uma amostra de 77 crianças que já tiveram > 90% do projeto coorte completado nos primeiros 2 anos de idade e que já atingiram 6 anos de idade. Esses resultados foram corrigidos por idade para análise.

Etapa 2: Extração e purificação do DNA genômico de células bucais para genotipagem da APOE, utilizando a técnica de PCR-RFLP, em uma população pediátrica estratificada, após revisar questionários e entrevistas com os pais, no intuito de obter informações do estado socioeconômico, dados antropométricos e condições das instalações sanitárias domiciliares.

Etapa 3: Nessa etapa realizamos: 1. Análises estatísticas; e 2. Mapeamento de potenciais grupos de risco, avaliando o nível de educação e outras co-variáveis relacionadas ao estudo.

3.8. Procedimentos e testes neuropsicológicos

A seguir, descrevemos os testes neuropsicológicos administrados. O tempo estimado para conduzir os testes foi de aproximadamente 60 minutos, semelhante ao último estudo no Brasil realizado por (NIEHAUS et al, 2002). Todos os testes foram adaptados para o português, com a ajuda de agentes de saúde participantes do estudo coorte na comunidade Gonçalves Dias, Fortaleza, CE, Brasil. Todos os testes cognitivos foram conduzidos de uma forma padronizada, com instruções dadas em português, e com a assistência de um agente de saúde da equipe de campo. Dois neuropsicólogos treinados revisaram os resultados dos testes cegamente.

Fluência Verbal: Os testes de fluência verbal foram adaptados do Exame Neuropsicológico e Desenvolvimento, NEPSY (The Psychological Corporation®, San Antonio, 1998). Os testes de fluência verbal avaliam a habilidade de gerar palavras em categorias semânticas (idades 3-12 anos) e restrições fonéticas (idades 7-12 anos). Para o teste de fluência semântica, foi solicitado que as crianças enumerassem o maior número de nomes de animais possível em 1 minuto. No teste de fluência fonética, as crianças foram solicitadas a produzir o máximo de palavras começando com as letras F e S em sessões de 1 minuto. O escore total foi obtido a partir do número de palavras ditas, evitando palavras que não pertenciam a categoria requisitada ou palavras sem sentido, repetições das palavras usadas como exemplo e em formas diminutivas. Num nível descritivo, as tarefas de fluência lingüística envolvem (1) imediata atenção para iniciar a geração de palavras, (2) um conhecimento disponível de palavras para cada uma selecionada, (3) a habilidade de acessar a memória declarativa verbal, e (4) uma habilidade executiva de coordenar esse processo, incluindo a memória de trabalho para monitorar a performance, evitando corromper as regras (RUFF et al, 1997).

Os testes de fluência verbal foram utilizados para avaliar a geração de idéias e motivação. Durante a aplicação dos testes, as palavras foram tabuladas pelo experimentador e conferidas por um assistente. Uma outra confirmação foi feita pela equipe de investigadores, durante a transferência dos dados. Nenhuma discrepância foi observada durante a recontagem dos escores de fluência verbal.

Coding: O teste de Coding (WISC-III Coding Paired Associated Symbol Recall, idades 8-16 anos) foi administrado de acordo com o subteste padronizado no manual WISC-III. Os escores foram dados de acordo com o manual de instruções (The Psychological Corporation®, San Antonio, 1999). A criança precisou lembrar de símbolos associados com dígitos específicos e desenhar o correspondente símbolo para cada dígito. O subteste Coding confere escores do total de erros em uma sessão-teste de 120 segundos e escores do número de símbolos desenhados corretamente a cada intervalo de 30-segundos. A criança foi recompensada com 1 ponto para cada desenho do símbolo apropriado. O total de escores foi, em seguida, convertido em escore escalonado, de acordo com o formato padrão

WISC-III. A resposta foi considerada correta, mesmo quando o símbolo foi desenhado com imperfeições, mas ainda identificável como o símbolo chave.

TONI-3: O TONI-3, Teste de Inteligência Não Verbal (Pro. Ed. Inc., Austin, Texas, 1997) é um teste livre de linguagem, atividade motora reduzida e medida de funcionamento intelectual (com reduzida influência cultural), podendo ser aplicado em indivíduos ≥ 6 anos de idade. Existem duas formas equivalentes do teste contendo 45 itens cada. Todos os itens requerem a solução do problema através de abstração de figuras. O examinador dá instruções em pantomima. O indivíduo observa os itens de estímulo e responde apontando, ou com um outro gesto significativo. Itens foram organizados de acordo com o grau de dificuldade, começando com os itens mais fáceis, progredindo para os itens mais difíceis. O teste continua até o item 45 ou até que o indivíduo cometa três respostas incorretas em cinco itens consecutivos. O escore total do TONI-3 é simplesmente o número de respostas corretas feitas pelo aplicante entre os itens 1 e o item teto.

Labirintos Elithorn: Nesse teste, a criança precisa resolver uma série de labirintos, traçando uma linha do centro de cada labirinto até sua saída, sem que a linha cruze as passagens bloqueadas ou atravesse suas paredes. O teste é interrompido com dois erros consecutivos. O tempo limite para completar cada labirinto é de 30 segundos. O crédito completo é dado quando o teste é feito no tempo limite sem nenhum erro.

O **Quadro 1** mostra o sumário das características e aplicações dos testes neuropsicológicos utilizados.

Quadro 1: Sumário das características e aplicações dos testes neuropsicológicos utilizados.

Domínios cognitivos	Testes		Idade	Escore Total
1. Linguagem; 2. Função Executiva	Fluência Verbal	Semântica	3-12	Somatório das palavras em categorias.
		Fonética	7-12	Somatório das palavras de acordo com a letra inicial
3. Inteligência Não-Verbal	TONI III		Todas as idades	Somatório das respostas corretas até o item final. (escore máximo: 45)
4. Memória e Aprendizagem Memória Visual Recente	Coding		8-16	Escores de 5-24
5. Função Executiva	Labirintos Elithorn		6-12	Escores máximo 28 pontos

* Os testes de fluência verbal foram extraídos do NEPSY (The Psychological Corporation®, San Antonio, 1998). O teste de Coding e labirintos Elithorn foram retirados do manual WISC-III (Wechsler Intelligence Scale-III, The Psychological Corporation®, San Antonio, 1998).

3.9. Colheita de células bucais

As crianças foram recrutadas individualmente por um agente de saúde treinado (conhecido pelas crianças), que foi responsável pelas instruções da coleta. A colheita era feita pelo menos meia hora depois de qualquer refeição prévia. Sob observação do pai ou responsável, o agente de saúde solicitava que cada criança gentilmente bochechasse e ingerisse 20ml de água potável para eliminar as partículas de alimentos. Com ajuda do agente de saúde, a criança então umedecia as cerdas de uma escova citológica descartável (Medical Packaging, Camarillo, CA, USA) em um copo contendo 10ml de água potável para amaciá-las. Em seguida, a criança escovava a superfície da bochecha 10 vezes (cada vez com um movimento para cima e para baixo), e então era solicitado que ele/ela expectorasse a saliva em um tubo de 50ml estéril de polipropileno, repetindo o processo no lado oposto da boca. Em seguida, era feito um bochecho com 10ml de água por 45 seg, com o agente de saúde cronometrando o tempo. Então o indivíduo expectorava a saliva no mesmo tubo de 50ml. Todo material utilizado era descartável e de uso individual para cada criança.

No final da coleta, um técnico adicionava 5ml de etanol a 99% sobre as cerdas da escova dentro do mesmo do tubo de 50-ml, para prevenir a contaminação e para encaminhamento laboratorial. Todos os testes neuropsicológicos, colheita de células bucais, extração de DNA e amplificação das seqüências da apoE foram realizadas com sucesso em amostras coletadas em estudos pilotos em Fortaleza e em Charlottesville, **Figura 9**.

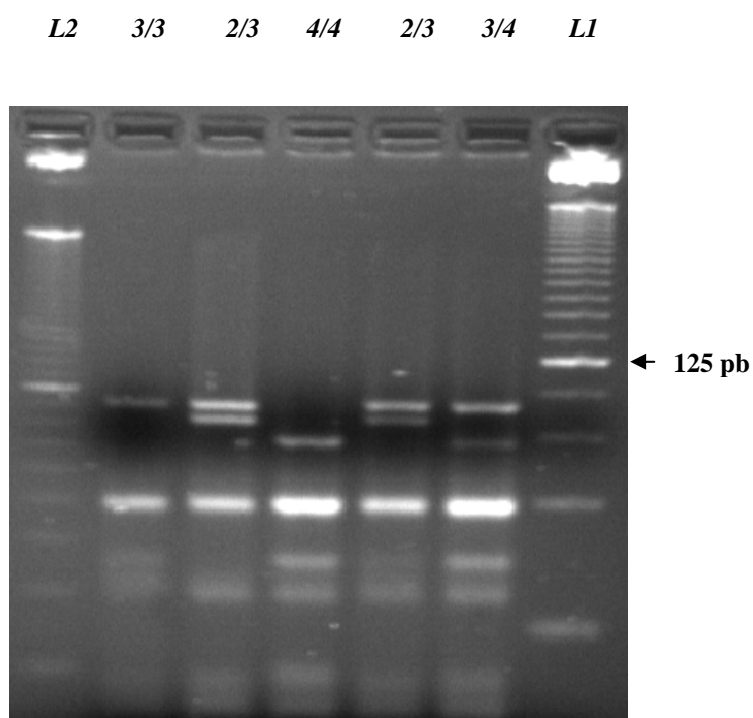


Figura 9: Genotipagem da Apolipoproteína E pela enzima de restrição *HhaI*, após análises de controles gentilmente cedidos pela Dr. Leonard G.D. Debra, Chefe do Centro de Diagnóstico Molecular do Departamento de Patologia e Medicina Laboratorial da Universidade de Pensilvânia, Escola de Medicina, Filadélfia, PA. Os fragmentos de restrição foram resolvidos em gel de agarose a 4%. O genótipo de cada amostra está indicado acima de cada linha. L1: 25-pb DNA ladder e L2: 10-pb DNA ladder.

3.10. Extração do DNA

O DNA das amostras de células bucais foi extraído utilizando o protocolo modificado Gendra Puregene[®] (Gendra System, Minneapolis, MN), a partir de etapas de lise celular, tratamento com RNase, precipitação de proteínas, precipitação do DNA e hidratação do DNA, como descrito por (LONDON et al, 2001).

As etapas do protocolo para extração do DNA a partir das células bucais, após coleta no campo e envio para o laboratório, estão descritas abaixo.

3.10.1. Protocolo de Extração do DNA a partir de Células Bucalis

1. As escovas do tubo de 50ml foram removidas, repousando as cerdas num papel toalha absorvente (para remover o excesso de álcool) e em seguida, foram incluídas num tubo limpo de 15ml, contendo 3ml da solução de lise celular.
2. Os tubos de 50ml com o expectorado foram centrifugados por 10 min a 2000 X *g* para concentrar as células em um *pellet*. Imediatamente, desprezamos o sobrenadante, deixando apenas 100µl do líquido residual. Caso as amostras, após a centrifugação, permaneçam muito tempo em repouso, podem apresentar um *pellet* disperso e mal compactado.
3. O *pellet* junto com uma pequena quantidade do sobrenadante foi vortexado vigorosamente por 5 seg para resuspender as células no sobrenadante residual. Isso facilitou em muito a lise celular no próximo passo.
4. As escovas foram comprimidas no fundo do tubo vigorosamente, no mesmo tubo de 15ml, contendo 3ml da Solução de Lise e em seguida, retiramos o excesso de fluido das cerdas e descartamos as escovas.

5. Transferimos as células resuspensas do tubo de 50ml para o mesmo tubo de 15ml, contendo a solução de lise celular e, em seguida, vortexamos por 5 segundos em velocidade média para maximizar o contato entre as células e a solução de lise celular.
6. Adicionamos 15 μ l de proteinase K (20 mg/ml) e incubamos o lisado a 55°C por 1 hora.

3.10.2. Tratamento pela RNase

1. Adicionamos 15 μ l da solução de RNase A no lisado celular.
2. Homogeneizamos a amostra, invertendo o tubo 25 vezes e, em seguida, incubamos a 37°C por 15-60 minutos.

3.10.3. Precipitação de Proteínas

1. Resfriamos a amostra em temperatura ambiente (5 min).
2. Adicionamos 1ml da solução de precipitação de proteínas ao lisado celular.
3. Homogeneizamos vigorosamente em alta velocidade durante 20 segundos para homogeneizar a solução de precipitação uniformemente com o lisado celular.
4. Colocamos o tubo em banho com gelo por 10 minutos para assegurar um *pellet* mais compacto na próxima etapa.
5. Centrifugamos o tubo contendo a amostra em 2000 X *g* por 10 minutos. O precipitado protéico deve formar um *pellet* firme. Se o *pellet* de proteínas não estiver compacto e bem aderido ao tubo, repetimos os passos 3, 4 e 5.

3.10.4. Precipitação do DNA

1. Despejamos o sobrenadante contendo o DNA (descartando o pellet com o precipitado de proteínas) num tubo limpo e estéril de 15ml, contendo 3ml 100% isopropanol (2-propanol) e 5,0 μ l da solução de glicogênio (20 mg/ml).
2. Homogeneizamos a amostra, invertendo com cuidado o tubo 50 vezes e, em seguida, incubamos em temperatura ambiente por no mínimo 5 minutos.
3. Centrifugamos a 2000 X g por 10 minutos. O DNA pode ou não se tornar visível como um pequeno *pellet* esbranquiçado, dependendo da sua quantidade.
4. Descartamos o sobrenadante e drenamos o tubo num papel absorvente limpo. Adicionamos 3ml de etanol a 70% e invertemos o tubo várias vezes para lavar o *pellet* de DNA.
5. Centrifugamos a 2000 X g por 3 minutos. Cuidadosamente descartamos o etanol. Para evitar que o *pellet* se desprendesse do tubo, descartamos o álcool com cuidado, observando o pellet constantemente.
6. Invertemos e drenamos o tubo em um papel absorvente limpo e esperamos secar em temperatura ambiente por 10-15 minutos.

3.10.5. Hidratação do DNA

1. Adicionamos 200 μ l da solução de hidratação de DNA (20 μ l confere uma concentração de 50ng/ μ l, se a quantidade de DNA for 1 μ g).
2. Reidratamos o DNA, incubando a amostra por 1 hora a 65°C e/ou 12 horas em temperatura ambiente. Homogeneizamos o tubo periodicamente para dispersar o DNA na solução hidratante.
3. No caso de um longo armazenamento, a amostra foi homogeneizada e em seguida, o DNA foi transferido para um criotubo (Eppendorf) de 1,5 ml. Então,

centrifugamos o tubo brevemente e congelamos a amostra a - 20°C ou -80°C (podem ser estocadas a 4°C a 8°C por 1 a 2 dias). Para obter uma reserva, preparamos alíquotas de 100 µl da emulsão.

3.11. Protocolo para genotipagem

O protocolo experimental envolve uma amplificação das seqüências da apoE, a partir da técnica de PCR, **Figura 10**, a partir do DNA genômico e digestão através da enzima de restrição *HhaI* descrita pela primeira vez por (HIXSON& VERNIER, 1990), **Figuras 11 e 12**.

O DNA das células bucais foi extraído utilizando amostras de crianças do Gonçalves Dias. O DNA das células bucais foi então amplificado pelo método de PCR em *DNA Thermal Cycler*, utilizando os iniciadores (*primers*) F4 (5'-GCACGGCTGCCAAGGAGCTGCAGGC-3') e F6 (5'-GGCGCTCGCGGATGGCGCTGAG-3'), descrito por (TSUKAMOTO et al, 1993) de acordo com o protocolo recomendado por Addya e colegas (ADDYA, WANG, LEONARD, 1997). Além do tampão e os componentes nucleotídicos descritos pelo fornecedor da *Hot Taq* polimerase (Qiagen). Cada reação de amplificação contém cerca de 1 µg do DNA extraído de células bucais, 1 pmol/µl de cada primer, 10% dimetil sulfóxido, e 0.025 unidades/µl da *Hot Taq* polimerase num volume final de 50 µl. Cada mistura da reação foi aquecida a 95°C por 15 min (etapa de ativação da *Hot Taq* polimerase), seguido de 95°C por 4 min; 62°C, 30 s; 72°C, 1 min, e submetida a 39 ciclos de amplificação (95°C, 15 s; 62°C, 15 s; 70°C, 15 s), seguidos por uma extensão final (72°C, 3 min) e armazenamento a 4°C. Nós obtivemos aproximadamente 300 ng das seqüências amplificadas da apoE para cada reação de amplificação (com 270 pb). Para visualizar os produtos não digeridos, 10µl de 50µl do produto de PCR serão submetidos a eletroforese em gel de Ultrapure agarose (Gibco-BRL) a 2%, contendo 0.4µg/ml de brometo de etídio e 1,0 X TAE (Tris-acetato- 0,04 mol + EDTA- 0,001 mol).

Depois da amplificação por PCR, 5 unidades de *HhaI* foram adicionadas a cada mistura de reação para digestão das seqüências da apoE (3h at 37°C). Esse processo não requer a purificação dos produtos de PCR ou adição de um tampão específico para realizar a digestão pela enzima *HhaI*, e a digestão incompleta não se constituiu um problema, haja vista que grandes quantidades de seqüências amplificadas são formadas em cada reação (5 unidades de *HhaI*/300 ng DNA). Cada mistura da reação foi adicionada em um gel de agarose a 4% (3% gel Nursuive GTG + 1% gel Ultrapuro), contendo 0.4 µg de brometo de etídio em 0,5 X TBE (Tris-borato- 0,045 mol + EDTA- 0,001 mol) e submetido a eletroforese por 1h sob voltagem constante (100 V). O gel foi montado em bandeja de 10 X 15 cm. Após a eletroforese, os fragmentos de DNA foram visualizados através de iluminação UV. Os tamanhos dos fragmentos digeridos pela enzima *HhaI* foram estimados a partir de DNA *ladders* conhecidos.

A isotipagem de restrição da apoE se deve à clivagem nos sítios polimórficos pela *HhaI* que distinguem as seqüências para ε2, ε3 e ε4, evitando hibridização por Southern blots ou dots-blots com sondas ASO. O primeiro passo é a amplificação das seqüências da APOE, contendo aminoácidos nas posições 112 e 158 do DNA genômico. O segundo passo é a clivagem das seqüências amplificadas da apoE pela *HhaI* para eletroforese em gel agarose. Como observado acima, nós realizamos com sucesso esse protocolo, a partir do DNA de células bucais, obtidas por escovação, em nossos estudos pilotos, **Figura 13**.



Figura 10: Área utilizada para a genotipagem da APOE no laboratório do Centro para Saúde Global da Universidade de Virgínia. Termociclador utilizado no processo de PCR (Reação de Cadeia da Polimerase) e o estojo de purificação do produto de PCR (Qiagen) são indicados pela seta.

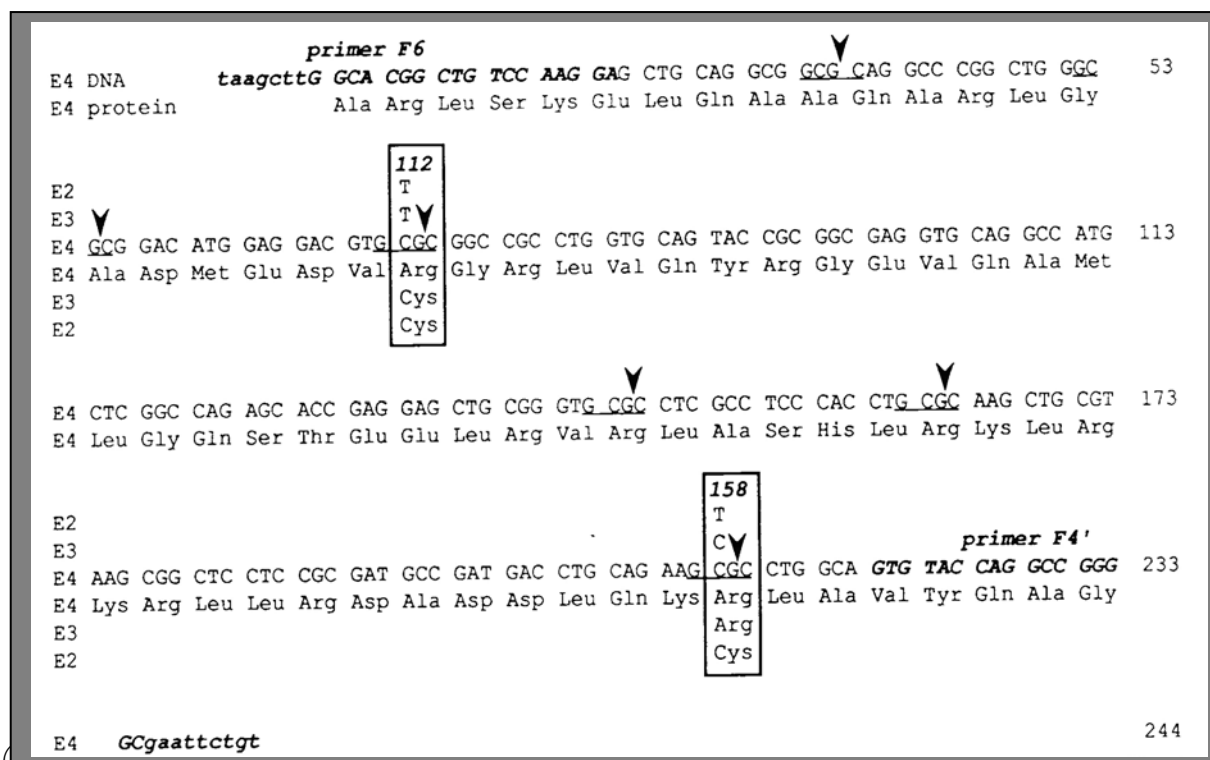


Figura 11: Seqüências de DNA e da proteína de regiões amplificadas, codificando isoformas comuns da apoE e localização dos sítios de clivagem da *HhaI*. Substituições dos nucleotídios que distinguem as isoformas E2 e E3 são mostradas acima da seqüência de nucleotídeos de E4. As substituições de aminoácidos são mostrados abaixo da seqüência de E4 (sítios de substituição nos códons 112 e 158 estão enquadrados). Os sítios de clivagem da *HhaI* na seqüência de nucleotídios de E4 estão sublinhados e indicados por setas.

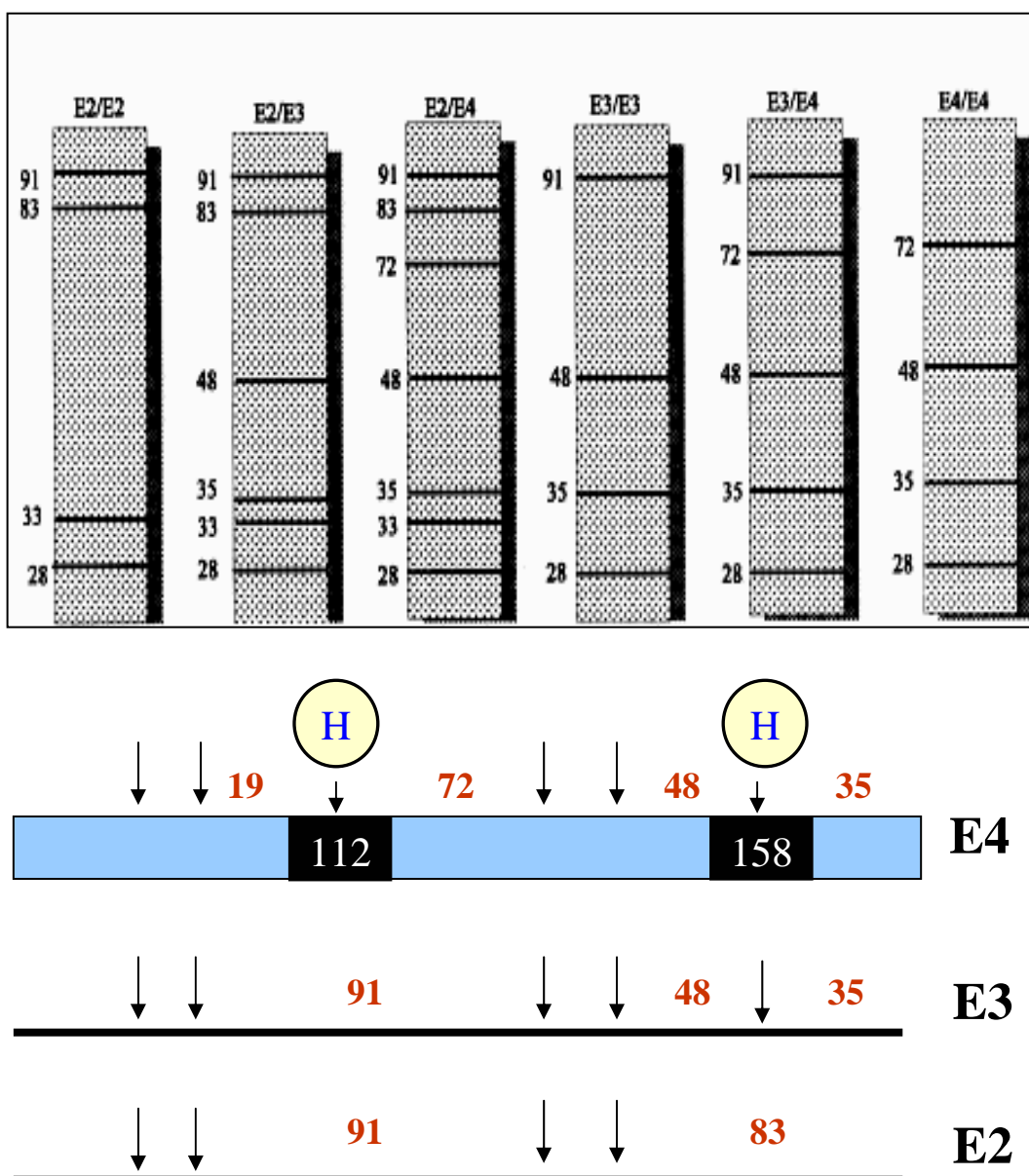


Figura 12: Diagrama dos mapas de clivagem pela enzima *HhaI* e separação eletroforética dos fragmentos de restrição, depois do processo de amplificação por PCR. As setas indicam os pontos de clivagem da enzima de restrição *HhaI* (H) ao longo do gene da APOE. Notar que nos resíduos 112 e 158, ocorre clivagem pela enzima *HhaI*, ao longo do alelo E4 (gerando fragmentos de 72 e 48 pb, ver esquema), contudo, não ocorre clivagem no resíduo 112 no alelo E3 (gerando fragmentos de 91, 48 e 35 pb) e em ambos resíduos 112 e 158 no alelo E2 (gerando fragmentos de 91 e 83 pb).

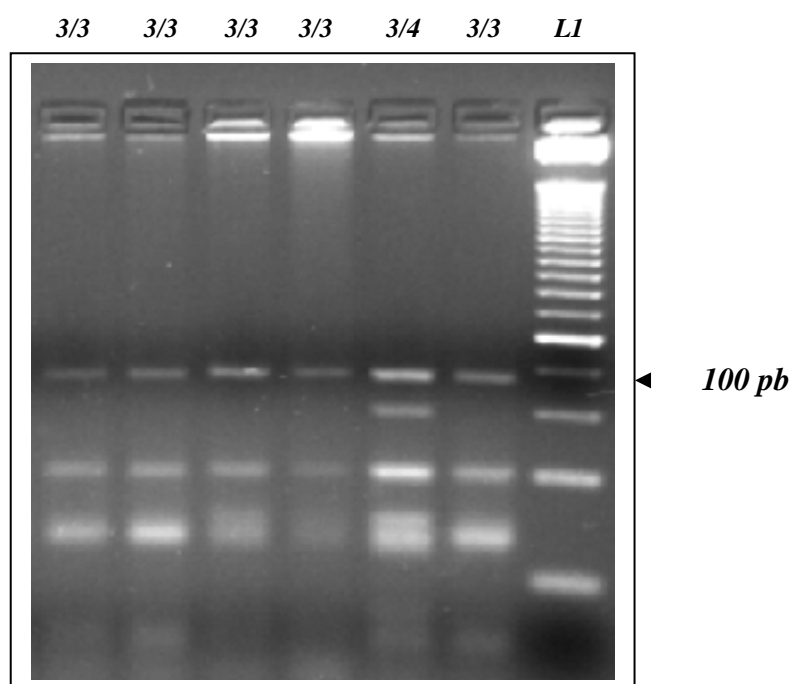


Figura 13: Genotipagem da apolipoproteína E a partir da digestão pela enzima de restrição *HhaI*, usando DNA purificado de amostras de células bucais. Os fragmentos de restrição foram resolvidos em gel de agarose a 4%. O genótipo de cada amostra é indicado acima de cada linha. L1: 25-pb DNA ladder.

3.11.1. Protocolo para Seqüenciamento do Gene da APOE

No intuito de obter um diagnóstico genético acurado dos polimorfismos da APOE, também realizamos o seqüenciamento do DNA-dupla hélice em algumas amostras, após realizar testes pilotos com controles internos. Dessa forma, para algumas amostras, fizemos um contra-teste por seqüenciamento para obter um genótipo correto, sem ambigüidade. Para isso, purificamos o produto de amplificação de PCR, a partir do método Qiagen (Qia-Quick PCR Purification Kit, Qiagen). O produto de amplificação foi gerado a partir do primer, descrito por HIXSON AND VERNIER, 1990, **Figura 11**, obtendo um produto de 244 pb, confirmado por eletroforese em gel de agarose (2%). O seqüenciamento foi realizado após envio do produto purificado de PCR para o Departamento de Microbiologia, no setor de Pesquisa Biomolecular da Universidade de Virgínia (Charlottesville, VA, USA). O **Quadro 2** mostra o seqüenciamento da região amplificada do gene da APO ϵ 3 humana.

Em suma, foram adicionados 200 μ l de tampão PB (de acordo, com as recomendações do fabricante) para 40 μ l do produto de amplificação de PCR (1:5). Utilizando a coluna de filtração (QIAquick) num tubo *ependorf* (2,0 ml), centrifugamos por 30-60 s (~ 13.000 rpm), e em seguida, descartamos o filtrado, recolocando a coluna no mesmo tubo. Em seguida, adicionamos 0,75 ml do tampão PE, repetindo o processo de centrifugação (30-60 s) e descartando o filtrado. Centrifugamos mais uma vez em alta velocidade por 1 minuto. Colocamos a coluna em um novo tubo estéril e para obter o volume final, adicionamos 50 μ l de tampão EB (10mM Tris-Cl, pH 8.5) e cetrifugamos a coluna por 1 minuto. O seqüenciamento foi realizado usando o sistema *Prism DNA Sequencer*.

Quadro 2: Seqüenciamento da região amplificada do gene da APOE humana. Em negrito estão os resíduos 112-T e 158-C. Os códons TGC (para Cis) e CGC (para Arg), caracterizam o alelo ϵ 3, o mais amplamente distribuído no mundo.

```
GNTCGGCGGCGCGGCCCGGCTGGGCNCGGACATGGAGGACGTGTGCGGCC
GCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCG
AGGAGCTGCGGGTGCGCCTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCT
CCTCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGG
GGCGAATTCTGTANNNNNNNNNNNNANNACN
```

3.12. Antropometria e Indicadores de Nutrição

Utilizamos o sistema da Organização Mundial de Saúde (OMS) para definir um caso de diarreia, como foi descrito por (MOORE et al, 2001). Após o treinamento dos investigadores e testando para reprodutibilidade (entre 0,1 cm de comprimento e 0,1 kg peso). A equipe de campo mediu a altura e peso das crianças envolvidas no estudo. O comprimento foi medido supino ao ponto mais próximo com margem de 0,1cm, com uma fita métrica. As medidas de comprimento foram convertidas em z escores da altura-por-idade (HAZ) e o peso foi convertido em z escores do peso-por-idade (WAZ), ambos indicadores foram convertidos em z escores de peso-altura-por-idade (WHZ), utilizando o *software* para estudo antropométrico EpiInfo, 2002. Utilizamos os indicadores do novo NHANES III para referenciar os dados. Essas medidas antropométricas em z escores correspondem ao número de desvios padrão acima ou abaixo dos valores de mediana do Centro Nacional de Estatística em Saúde (NCHS), como referência internacional para populações (WHO, 1997), ver **Quadro 3**.

A medida do comprimento supino e da perimetria cefálica occipito-frontal foi conduzida como descrito por (ZEMEL, RILEY, STALLINGS, 1997), assumindo que a forma da cabeça é determinada durante os primeiros meses de vida. Em circunstâncias normais, o crescimento rápido e contínuo do cérebro em crescimento molda o crânio no sentido de acomodá-lo. A falta de fusão firme dos ossos cranianos ao longo da convexidade craniana permite o aumento do crânio para acomodar o cérebro em crescimento. Muitos estudos confirmam a relação entre o tamanho da cabeça e os escores de QI (Quociente de Inteligência). Um formato reduzido da cabeça pode indicar distúrbios do desenvolvimento cerebral, incluindo proliferação neuronal, migração e processos encefaloclasticos (HANSEN& LOU, 2000; NELLHAUS, 1968; NELSON& DEUTSCHBERGER, 1970). Além disso, a perimetria cefálica, como um indicador do perfil nutricional passado e do desenvolvimento cerebral, tem sido descrita como o parâmetro antropométrico com melhor valor preditivo para o desempenho escolar e para variabilidade da capacidade intelectual (DESCH, ANDERSON, SNOW, 1990; IVANOVIC et al, 2002).

Quadro 3: Medidas antropométricas em z escores correspondendo ao número de desvios padrão acima ou abaixo dos valores de mediana do Centro Nacional de Estatística em Saúde (NCHS), como referência internacional para populações (WHO, 1997).

Indicadores de Desnutrição	Z < -1.0	Z < -2.0	Z < -3.0
HAZ Altura por idade	Levemente abaixo da altura	Moderadamente abaixo da altura	Severamente abaixo da altura
WAZ Peso por idade	Levemente abaixo do peso	Moderadamente abaixo do peso	Severamente abaixo do peso
WHZ Peso/Altura por idade	Levemente abaixo do peso/altura	Moderadamente abaixo do peso/altura	Severamente abaixo do peso/altura

3.13. Análises estatísticas

Esse estudo coorte foi desenvolvido com intuito de obter resultados preliminares, no que diz respeito a distribuição dos alelos da APOE e o *status* cognitivo em crianças com história de diarreia infantil nos primeiros dois anos de idade, em um ambiente de favela. A contagem de alelos e o cálculo de suas proporções serviu para determinar as frequências alélicas. As características demográficas foram descritas em termos de taxas e percentagens. Medidas de associação entre variáveis categóricas foram feitas, utilizando teste qui-quadrado, corrigido por Mantel-Haenszel e teste exato de Fisher, com intuito de verificar se a frequência de alelos estava em concordância com a frequência esperada, de acordo com hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg (DESCH, ANDERSON, SNOW, 1990).

O teste de Mann-Whitney e o teste T Student não pareado foram utilizados para variáveis contínuas (significância de $P < 0,05$). Foram utilizados *softwares* para análise estatística, incluindo SPSS (SPSS, Inc, Chicago, IL, versão 10.1) e *GraphPad Prism* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, versão 3.0). Foram feitas análises de correlação e regressão multilinear, com intuito de evitar potenciais *confounders*, incluindo indicadores de desnutrição, *status* socioeconômico, nível de educação materna e helmintíases. A seleção do modelo estatístico e técnicas de redução de dados foram usadas para definir um subgrupo de “importantes variáveis independentes” entre um grande número de fatores “candidatos”. Comparamos os resultados dos testes neuropsicológicos de acordo com os episódios de diarreia infantil aguda ou persistente ou utilizando o critério da mediana (acima ou abaixo da mediana) dos episódios de diarreia como referencial para dividir a população em dois grupos, com maior morbidade e menor morbidade de diarreia, respectivamente.

O critério para selecionar variáveis na equação de regressão linear foi o nível de significância de $P < 0,05$. Todas as variáveis independentes foram checadas para normalidade e linearidade com as variáveis dependentes antes da realização das análises de correlação e regressão linear. Múltipla regressão linear (em duas etapas)

e análises de correlação foram feitas utilizando o programa SPSS, para avaliar potenciais co-variáveis. O test *T Student* e ANOVA foram aplicados para comparações bivariáveis ($P < 0,05$ foi considerado significativo). O banco de dados foi duplamente checado para validação dos resultados. Valores antropométricos, perímetria cefálica, perfil cognitivo, infestações parasitárias e episódios de diarreia foram consideradas as principais variáveis dependentes avaliadas para o polimorfismo da APOE, enquanto, educação materna, grau de escolaridade e faixa etária da criança, aleitamento materno exclusivo e renda familiar como as principais variáveis independentes desse estudo.

4. RESULTADOS

4.1. Dados demográficos em 77 crianças do estudo coorte

As características da população pediátrica do Gonçalves Dias, incluindo medidas demográficas, antropométricas, nutricionais e *status* socioeconômico, juntamente com a história de diarreia infantil nos primeiros dois anos de idade, aparecem ilustradas na **Tabela 1**. Apenas 22,2% das mães (ou responsável) das crianças envolvidas no estudo coorte concluíram o segundo grau, aproximadamente a metade possui uma renda familiar de menos de 2 salários mínimos (1 salário mínimo = US\$ 86,6/mensal). O número médio de episódios de diarreia nos primeiros dois anos de vida foi de 9,10 (\pm 6,86 SD), semelhante aos achados preliminares de Niehaus e colegas (NIEHAUS et al, 2002), com sujeitos da mesma população, contudo utilizando um menor número. O HAZ-24, altura-por-idade, aos 2 anos de vida, representou o indicador de nutrição mais afetado pela história de diarreia nas crianças do estudo coorte da comunidade Gonçalves Dias, **Figura 14**.

4.2. Testes cognitivos em 77 crianças do estudo coorte

Não houve diferença estatística significativa nos escores totais dos testes de Coding, TONI III e nos labirintos Elithorn, quando foram comparados os grupos de crianças com diferentes histórias de doenças diarreicas, nos primeiros anos de vida, **Figura 15**. Crianças com história de alta morbidade de diarreia (devido a episódios de diarreia persistente ou com mais do que a mediana no número de episódios de diarreia), de modo surpreendente, não apresentaram declínio cognitivo nesses testes, quando comparadas com crianças do mesmo estudo coorte, com baixa morbidade de diarreia (sem episódios de diarreia persistente ou com menos do que

a mediana no número de episódios de diarreia), nos primeiros anos de vida. Contudo, nós percebemos uma significativa correlação negativa entre os valores de QI, obtidos pelo teste TONI-III, e o número de episódios de diarreia nos primeiros dois anos de idade ($n=64$, $r=-0,351$, $p=0,004$) **Figura 16**, e ainda a partir da análise da média do total dos escores de TONI III ($p=0,039$), **Figura 17**. Além disso, em um subgrupo de 73 crianças que completou os testes de fluência verbal, o total de episódios de diarreia nos primeiros anos de vida se correlacionou negativamente com os escores de fluência verbal total, fluência semântica + fluência fonética ($p=0,029$, $r=-0,255$), **Figura 18**.

As características demográficas e os valores do coeficiente de inteligência, QI, dessas 73 crianças que completaram os testes de fluência verbal, aparecem na **Tabela 2**. Além disso, quando os grupos foram estratificados de acordo com a idade, o grupo com história de diarreia persistente ($N=17$), apresentou menores escores de fluência total quando comparados com o grupo sem história de diarreia persistente ($N=56$), especialmente na faixa etária de 6-8 anos ($p<0,05$; **Tabela 3**), contudo isso não ocorreu quando os grupos foram estratificados de acordo com o critério da mediana dos episódios de diarreia, **Figura 19**. A **Tabela 4** mostra a planilha de regressão linear, em relação aos valores de fluência semântica e fonética das 73 crianças envolvidas no estudo, controlando para os indicadores nutricionais e parasitas intestinais. De forma surpreendente, nós detectamos um impedimento desproporcional da fluência semântica em relação à fluência fonética em crianças com história de alta morbidade de doenças diarreicas (incluindo as crianças com história de diarreia persistente) nos primeiros dois anos de vida, ($p < 0,05$), **Figuras 20 e 21**, inclusive de acordo com o critério da morbidade de diarreia em quartis de episódios, **Figura 22**. É digno de nota, que os déficits de fluência semântica, mas não de fluência fonética, correlacionaram com infecção por *Giardia lamblia* ($r=-0,285$; $p=0,039$), **Tabelas 4 e 5**.

Análises utilizando escores padronizados descritos por Monsh et al, 1997, mostraram que o déficit semântico visto, quando cada escore de fluência semântica do grupo de crianças com diarreia persistente (DP), era subtraído da média dos escores do grupo com diarreia aguda (DiA), e dividido pelo desvio padrão do grupo com diarreia aguda (DiA), da seguinte forma:

[escore de fluência semântica do grupo PD – a média dos escores de fluência semântica do grupo DiA]/[desvio padrão dos escores de fluência semântica do grupo DiA].

Considerando o escore de MONSCH et al, 1997, as crianças com história de diarreia persistente (DP) apresentaram cerca de duas vezes maior comprometimento da fluência semântica (média dos escores=-0,69), quando comparado com a fluência fonética (média dos escores=0,33), $F(3,19)=16$, $P=0,012$.

Além disso, a média da diferença dos escores de fluência verbal, descrito por (CERHAN et al, 2002), (escore de fluência fonética menos o escore de fluência semântica de cada criança) foi muito negativo em crianças do grupo DiA quando comparado com o grupo DP ($p<0,001$; **Tabela 6**). Além disso, detectamos uma correlação negativa entre o número de episódios de diarreia nos primeiros dois anos de vida, quando consideramos os escores semânticos, contudo essa correlação não persistiu quando avaliamos os escores fonéticos ($p=0,016$; $r= -0,280$ e $p=0,106$, $r=0,190$, respectivamente), **Figuras 23 e 24**. O período crítico para o déficit no desempenho semântico nas crianças do grupo DP foi observado aos 6-8 anos de idade ($p<0,05$), **Figura 25**, contudo, quando consideramos os grupos de acordo com mediana dos episódios de diarreia, o grupo com mais episódios de diarreia, de acordo com esse critério, apresentou um déficit cognitivo na fluência semântica e fonética aos 11-12 anos ($P<0,05$), **Figuras 26 e 27**. Apesar da falta de diferença estatística no teste de Coding, **Figura 15**, nós detectamos um atraso nas curvas normais de desenvolvimento no grupo com alta morbidade de diarreia (\geq mediana dos episódios de diarreia) e diarreia persistente (DP) em comparação com o grupo com morbidade leve de diarreia ($<$ mediana dos episódios de diarreia) e diarreia aguda (DiA), **Figura 28**, porque foi evidenciado um aumento significativo da média dos escores nesse teste com a idade, somente no primeiro grupo mas não no último ($p<0,05$).

O número total de episódios de diarreia permaneceu como um forte fator preditivo da fluência verbal ($n=47$, $\beta= -0,314$, $p=0,036$) e particularmente dos

escores semânticos (n=47, beta= -0.367 p=0.013), mesmo após termos controlado para educação materna e renda familiar ao nascimento.

Educação materna também se constituiu um significativo fator preditivo (n=47, p=0,038, beta= -0,299) dos escores de fluência verbal, mesmo quando controlando para episódios de diarreia e renda familiar ao nascimento. Contudo, o número total de episódios de diarreia não se constituiu um significativo fator preditivo (p=0,211) dos escores de fluência fonética, mesmo após controlar para educação materna e renda familiar ao nascimento. O nível de educação materna permaneceu como um significativo fator preditivo (n=47, p=0,030, beta= -0,322) dos escores de fluência fonética, mesmo após ajustar para os episódios de diarreia e renda familiar ao nascimento.

Além disso, análises de regressão linear em múltiplas etapas foram utilizadas para confirmar se a relação entre episódios de diarreia e os escores de fluência semântica permaneceu, mesmo controlando por outras possíveis variáveis envolvidas. Episódios de diarreia (nos primeiros dois anos de idade) permaneceram como um significativo fator preditivo dos escores de fluência semântica, mesmo após controlar para escolaridade infantil, educação materna e aleitamento materno, ver **Tabela 5**. As mesmas análises foram feitas para fluência fonética sem alcançar grau de significância.

Tabela 1: Características demográficas e dados antropométricos das 77 crianças do estudo coorte com história de diarreia, aos 6-12 anos de idade, em Fortaleza-CE, Brasil.

Características	No. De Crianças	Média ± SD
<i>Idade média (anos)</i>	–	9,58 ± 1,77
<i>Sexo</i>		
Masculino		
Feminino	30 (38,96%)	
<i>Média do no. de episódios de diarreia aos 0-2 anos</i>	47 (61,04%)	
	77	9,10 ± 6.86
<i>Peso ao Nascer (g)</i>	59	3285 ± 470,7
<i>Status Nutricional aos 2 anos</i>		
Média altura-por-idade (Z)	69	-0,99 ± 1,22
Média peso-por-idade (Z)	69	-0,55 ± 1,05
Média peso-por-altura (Z)	69	-0,06 ± 0,94
<i>Educação Materna</i>		
Sem Escolaridade primária	56 (77,77%)	
≥ Escolaridade primária	16 (22,23%)	
<i>Renda familiar mensal*</i>		
Abaixo de 2 salários mínimos	45,20%	
≥ 2 salários mínimos	23,30%	
Desconhecido	31,50%	

* 1 salário mínimo: ~ US\$ 86,6/mês, de acordo com o câmbio flutuante na época do estudo.

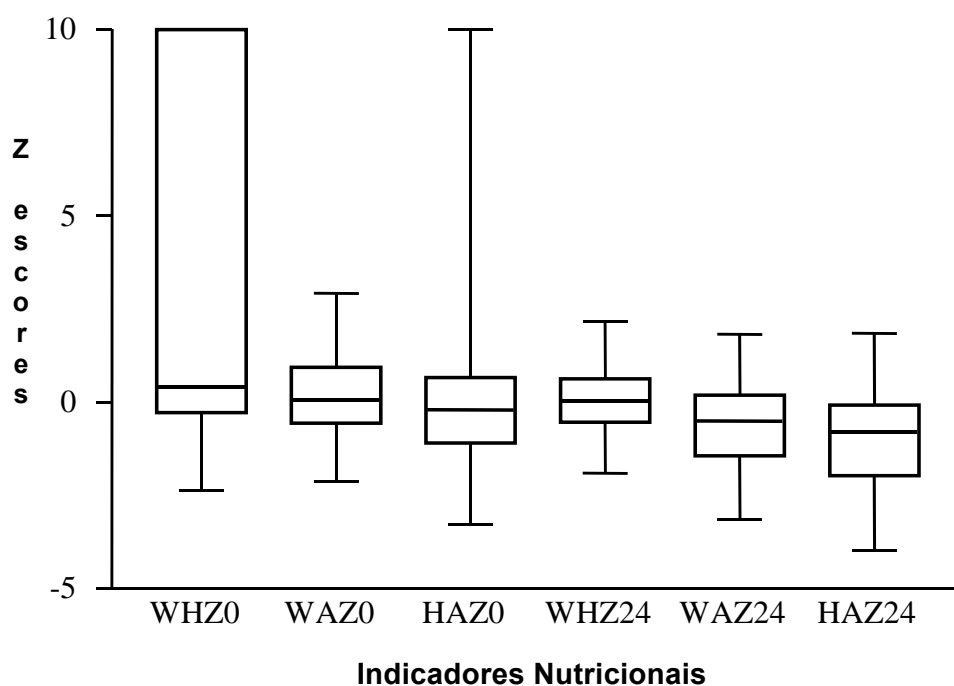


Figura 14: Indicadores de desnutrição ao nascimento (0) e aos 2 anos (24) de idade, ilustrados em z escores em 77 crianças coortes do Gonçalves Dias. As três linhas horizontais representam os quartis 25%, 50% e 75%. Note que a medida antropométrica de HAZ24 se mostrou mais reduzido nessa população.

HAZ 0; WAZ 0; WHZ 0= z escores de altura, peso e altura-peso por idade, respectivamente, ao nascimento.

HAZ 24; WAZ 24; WHZ 24= z escores de altura, peso e peso-altura por idade, respectivamente, aos dois anos de vida.

As barras representam Média \pm SD dos escores.

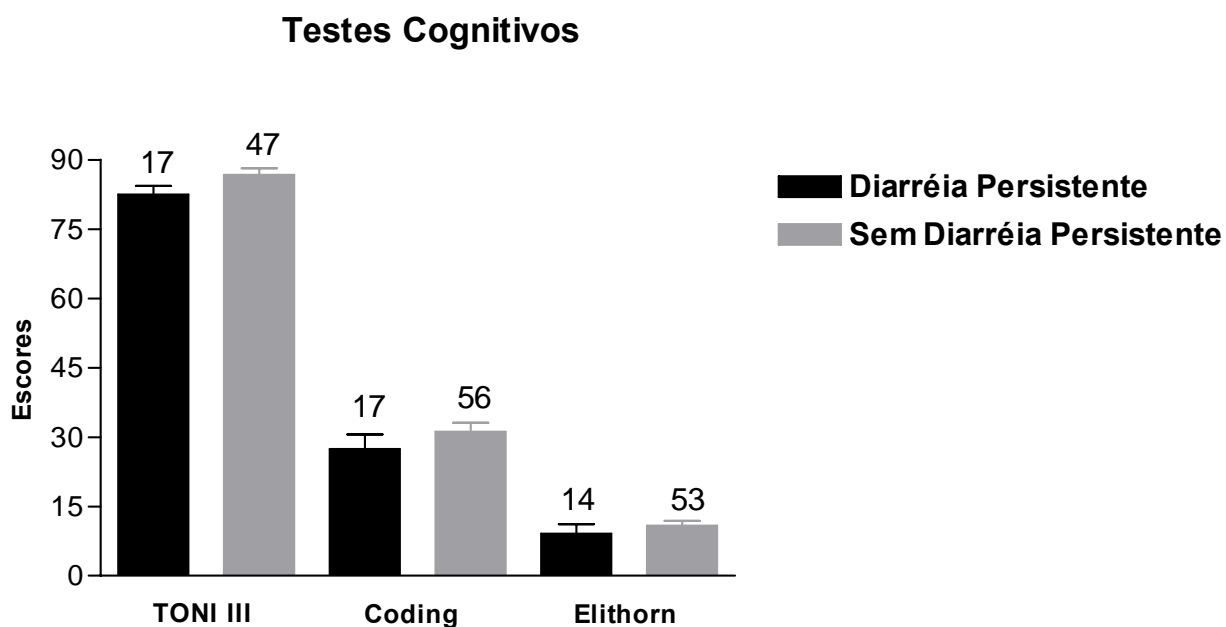
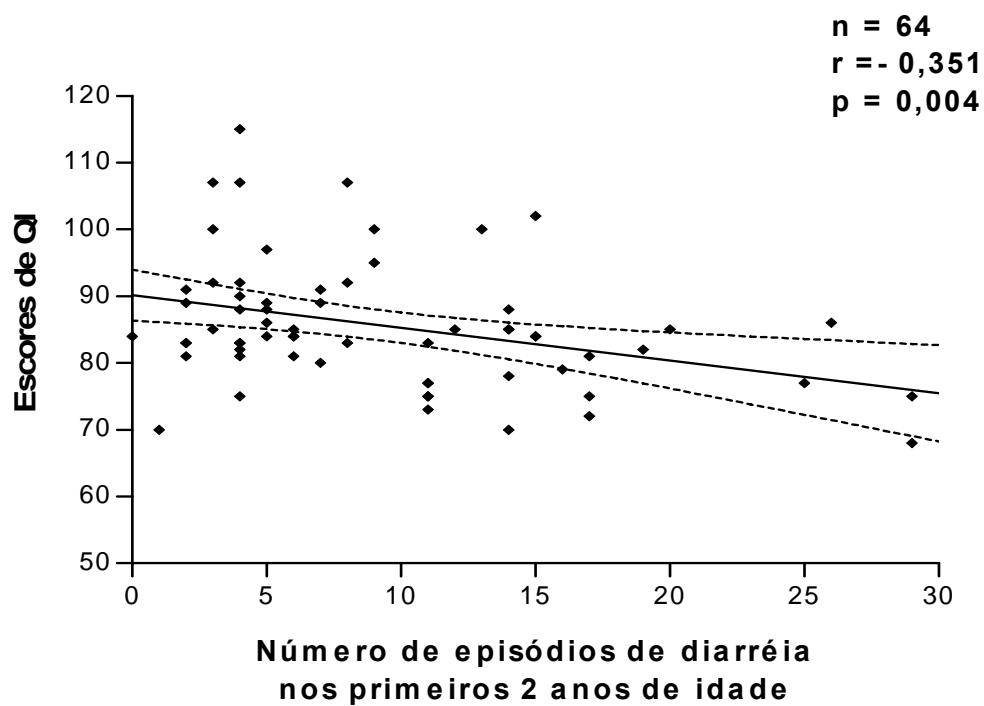


Figura 15: Escores dos testes cognitivos (exceto fluência verbal), aplicados nas crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbididade de doenças diarreicas nos primeiros dois anos de idade. As barras representam Média \pm SD dos escores; pelo teste *T student* não pareado. * $p < 0,05$.



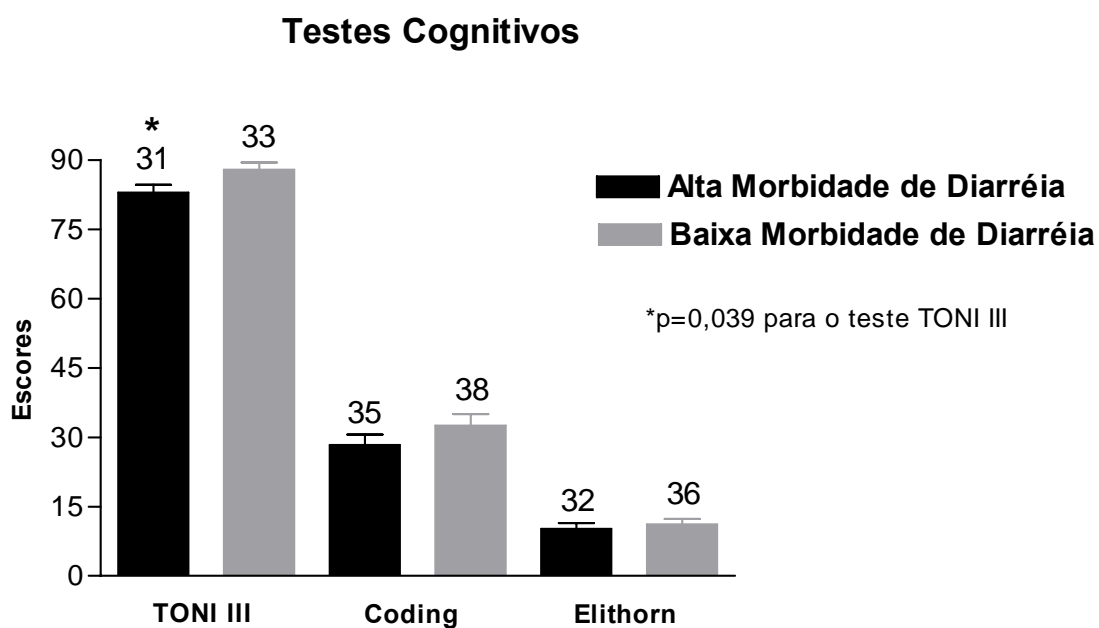


Figura 17: Escores dos testes cognitivos (exceto fluência verbal), aplicados nas crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarréicas nos primeiros dois anos de idade. As barras representam Média \pm SD dos escores; pelo teste *T student* não pareado. * $p < 0,05$.

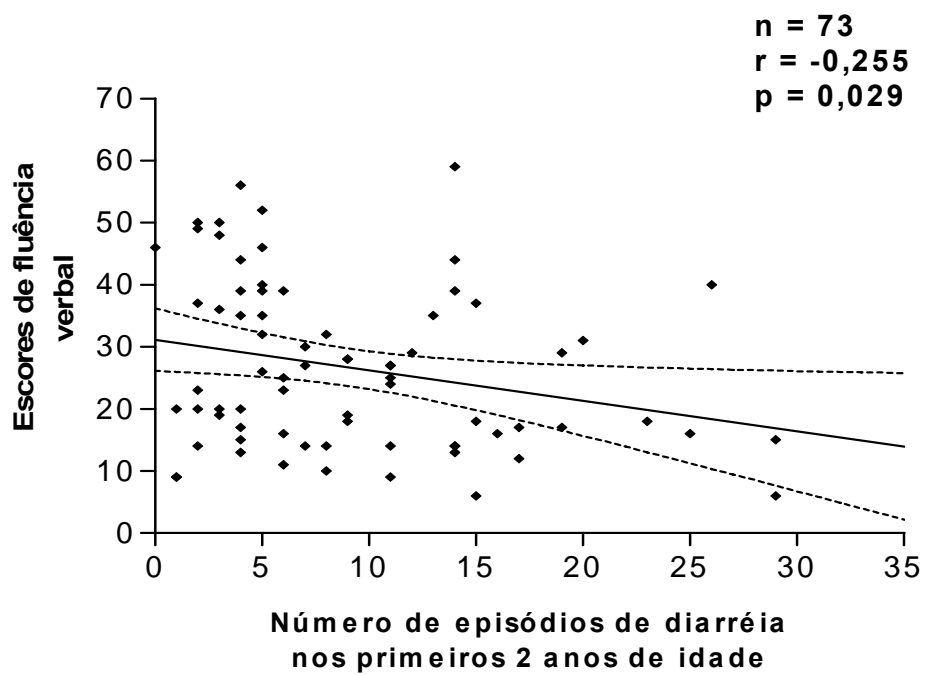


Tabela 2: Características demográficas, QI e escores de fluência verbal em 73 crianças da comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de diarreia nos dois primeiros anos de idade.

	DiA (N=56)	DP (N=17)	PMD (N=35)	BMD (N=38)
Sexo	36 meninas/20 meninos	9 meninas/8 meninos	24 meninas/11 meninos	20 meninas/18 meninos
Idade	9,66 (SD=1,74)	9,64 (SD=1,80)	9,80 (SD=1,81)	9,52 (SD=1,68)
Intervalo	6-12	7-12	6-12	7-12
Educação (grau)	3,38 (SD=1,96)	3,62 (SD=1,54)	3,85 (SD= 2,00)	3,05 (SD=1,65)
Intervalo	1-7	1-6	1-7	1-6
F. Semântica	19,52 (SD=7,92)*	14 (SD=8,35)	21,46 (SD=7,96)*	15,26 (SD=7,54)
Intervalo	0-37	0-29	8-37	0-29
F. Fonética	8,51 (SD=6,50)	10,71 (SD=12,26)	10,51 (SD=9,56)	7,65 (SD=6,44)
Intervalo	0-26	0-46	0-46	0-30
QI (TONI III)**	86,70 (SD=10,05)	82,47 (SD=7,74)	88,14 (SD=9,73)	83,73 (SD=9,42)
Intervalo	68-115	70-100	70-115	68-107

Pelo teste Mann-Whitney U Test. * p<0,05.

SD= desvio padrão

** para crianças com diarreia aguda, N=47; para o grupo com elevada morbidade de diarreia, N=33; e para o grupo com baixa morbidade de diarreia, N=28.

DiA= diarreia aguda; DP= diarreia persistente

PMD= elevada morbidade de diarreia; BMD= baixa morbidade de diarreia.

Tabela 3: Média e desvios padrões dos escores de fluência verbal e história de diarreia das 73 crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias de acordo com a idade.

Carga de Diarreia	DP		DiA		DP		DiA		DP		DiA	
	<i>6-8</i>				<i>9-10</i>				<i>11-12</i>			
Idade (anos)												
Fluência	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD
Semântica	7,66	6,83	16,07*	8,14	18,67	3,78	18,65	6,30	17	8,42	22,50	8,32
Fonética	5,33	6,50	4,71	4,25	14,33	4,72	7,85	4,09	13,38	16,39	11,55	8,04

* $p < 0,05$, quando comparado os escores de fluência semântica em crianças com história de diarreia persistente (DP) com crianças com história de diarreia aguda (DiA), aos 6-8 anos de idade.

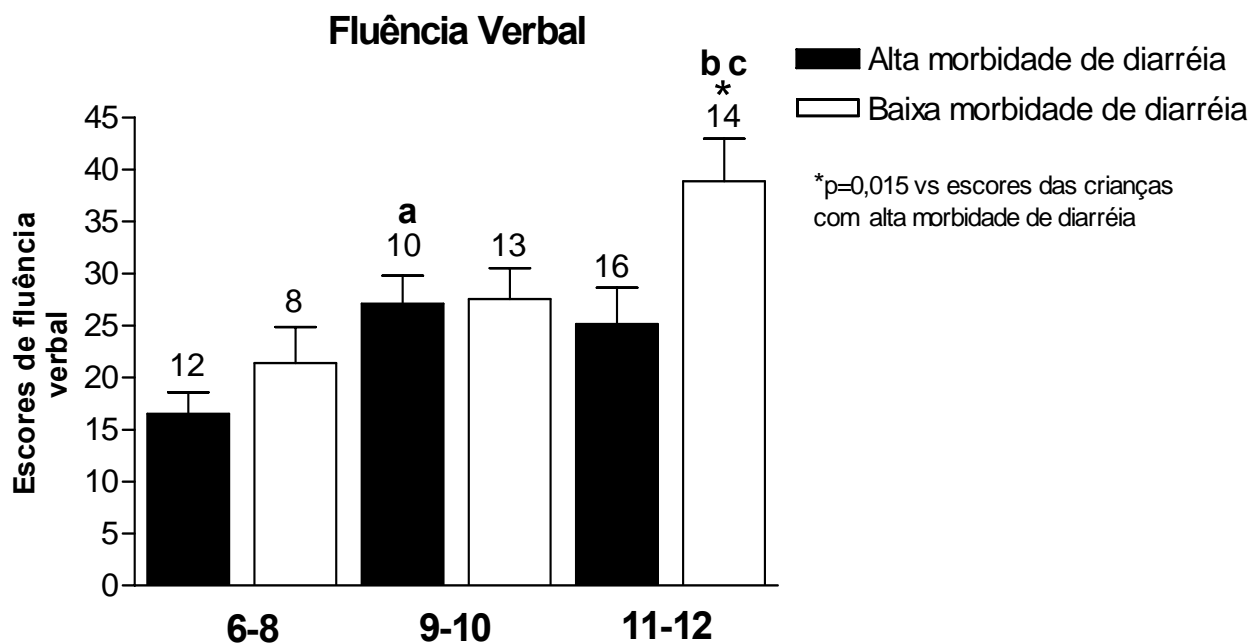


Figura 19: Escores de fluência verbal de acordo com a faixa etária em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarreicas nos primeiros dois anos de idade. As barras representam Média \pm SD dos escores; pelo teste *T student* não pareado. * $p < 0,05$.

a: $p < 0,01$, comparando escores de fluência em crianças com história de alta morbidade de diarreia aos 9-10 anos ($N=10$) e aos 6-8 anos de idade ($N=12$). **b:** $p < 0,05$, comparando escores de fluência em crianças com história de baixa carga de diarreia aos 11-12 anos ($N=14$) e aos 9-10 anos de idade ($N=13$). **c:** $p < 0,01$, comparando escores de fluência em crianças com história de baixa morbidade de diarreia aos 11-12 anos ($N=14$) e aos 6-8 anos de idade ($N=8$).

Tabela 4: Análises de regressão linear dos escores de fluências semântica e fonética nas 73 crianças coortes (faixa etária de 6-12 anos), com história de diarreia infantil (0-2 anos de idade), em relação aos indicadores nutricionais, escores neuropsicológicos, e parasitas intestinais.

	<u>Fluência Verbal</u>			
	<i>Semântica</i>		<i>Fonética</i>	
	<i>R²</i>	<i>P</i>	<i>R²</i>	<i>P</i>
Covariáveis antropométricas*				
Altura-por-idade (Z)	0,016	0,312	0,009	0,436
Peso-por-idade (Z)	0,035	0,132	0,011	0,404
Peso-por-altura (Z)	0,034	0,138	0,011	0,397
Peso ao Nascer	0,040	0,129	0,008	0,486
Perimetria cefálica**	0,001	0,786	0,099	0,006
Testes Neuropsicológicos				
TONI III	0,227	,0001	0,102	0,011
Coding	0,349	< ,0001	0,266	< ,0001
Labirintos Elithorn	0,166	,0006	0,195	,0002
Parasitas Intestinais (0-2 anos)				
Criptosporidium	0,005	0,607	0,013	0,400
Giardia	0,081	0,039	0,001	0,759
Helmintos	0,002	0,735	0,001	0,772

* HAZ, WAZ e WHZ aos 2 anos de idade.

** Medidas de perimetria cefálica foram feitas antes da aplicação da bateria de testes neuropsicológicos.

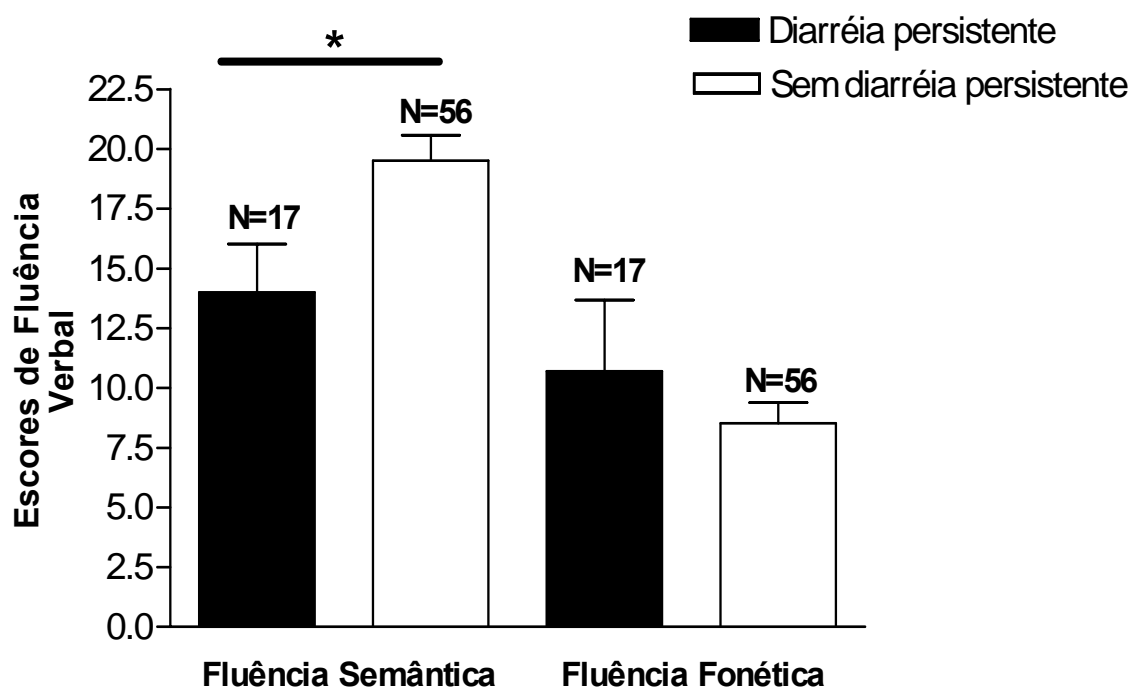


Figura 20: Escores de fluência verbal, incluindo fluências Semântica e Fonética, em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarréicas nos primeiros dois anos de idade. Diarréia persistente foi definida como um estado diarréico com duração de ≥ 14 dias e diarréia aguda como um estado diarréico com duração de < 14 dias. As barras representam Média \pm SD dos escores; pelo teste *T student* não pareado. * $p < 0,05$.

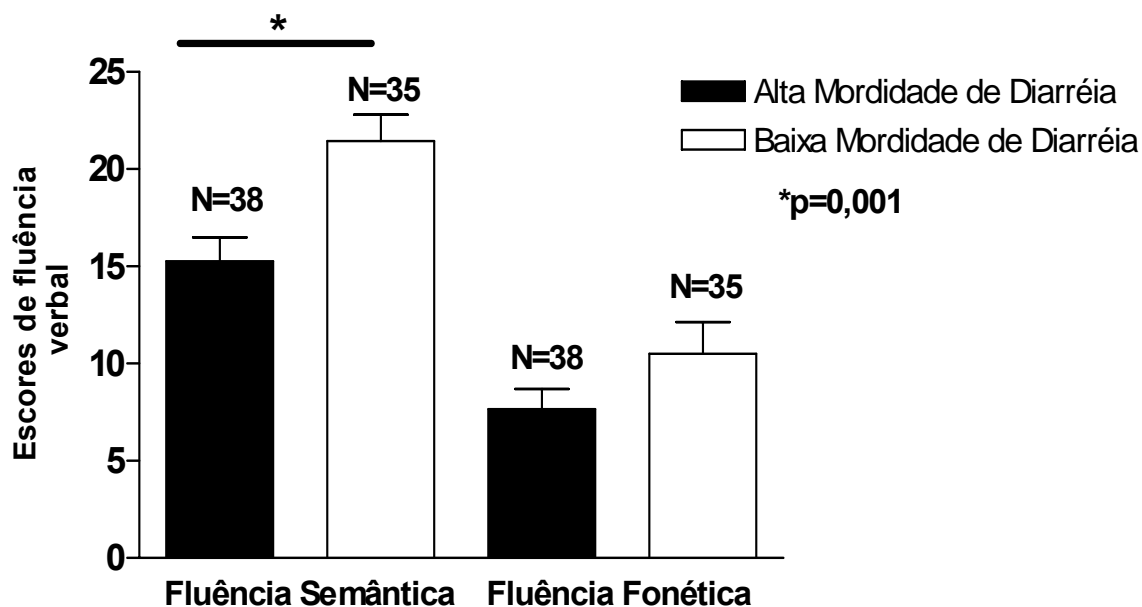


Figura 21: Escores de fluência verbal, incluindo fluências Semântica e Fonética, em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarreias nos primeiros dois anos de idade. Alta morbidade de diarreia foi definida como (\geq a mediana dos episódios de diarreia) e baixa morbidade de diarreia foi definida como ($<$ a mediana dos episódios de diarreia) nos primeiros dois anos de idade. As barras representam Média \pm SD dos escores; pelo teste *T student* não pareado. * $p < 0,05$.

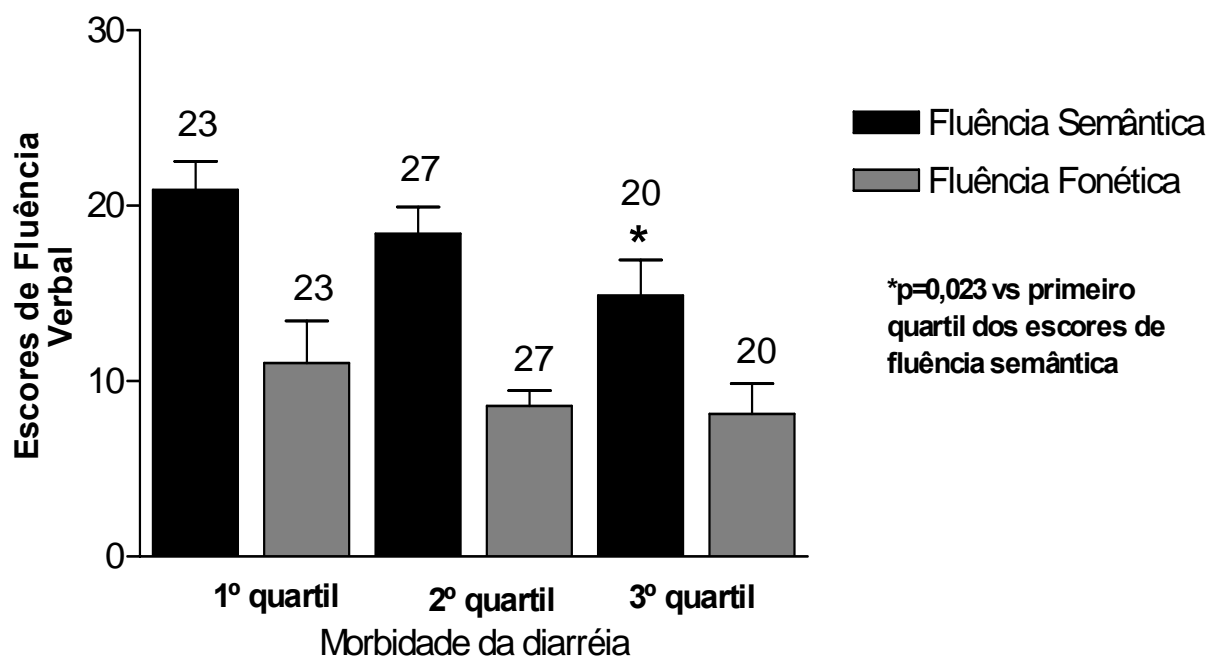


Figura 22: Escores de fluência verbal em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarreicas (em quartis) nos primeiros dois anos de idade. As barras representam Média \pm SD dos escores; pelo teste *T student* não pareado. * $p < 0,05$.

Tabela 5: Análises de regressão linear em múltiplas etapas dos escores de fluência fonética e semântica em 44 crianças coortes (faixa etária de 6-12 anos), com história de diarreia infantil aos dois anos de idade, levando-se em conta indicadores nutricionais e parasitas intestinais.

Variáveis	Semântica			Fonética		
	Coefficiente $\beta^{§§§}$	Grau de Significância (P=)	Coefficiente R^2	Coefficiente $\beta^{§§§}$	Grau de Significância (P=)	Coefficiente R^2
Etapa 1						
<i>Idade</i>	-,151	,443		-,124	,610	
<i>Sexo</i>	-,046	,716		-,353	,030*	
<i>Perimetria</i>	-,161	,270		-,003	,988	
<i>Cefálica</i> §						
<i>HAZ 24</i> §§	-,322	,060		-,202	,331	
<i>Aleitamento materno</i>	-,076	,539		-,163	,290	
<i>Educação Materna</i>	-,136	,295		,022	,891	
<i>Grau escolar</i>	,854	,000	0,42	,657	,012*	0,23
Etapa 2						
<i>Episódios de diarreia</i>	-,051	,754	0,44	-,127	,536	0,25
Etapa 3						
<i>Criptosporidium</i>	-,146	,362		-,190	,341	
<i>Giardia</i>	-,277	,037*		,052	,745	
<i>Helmintos</i>	-,145	,344	0,49	-,006	,977	0,21

§ Perimetria cefálica foi realizada durante a bateria de testes neuropsicológicos.

§§ Z escores da altura-por-idade aos dois anos de vida.

§§§ Coeficientes β foram feitos baseados no modelo final.

Tabela 6: Comparação dos grupos de acordo com a história de diarreia infantil nos primeiros 2 anos de vida e escores de fluência verbal em 73 crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias.

MEDIDAS	GRUPO (DP)		GRUPO (DiA)		T	P
	M	SD	M	SD		
FF	10,71	12,26	8,51	6,50	0,9735	0,333
FS	14	8,35	19,52	7,92	2,486	0,015*
(FF – FS)	-3,29	3,91	-11,01	-1,42	12,46	< 0,001**

Nota: FF= Escore total de fluência fonética; FS= escore total de fluência semântica; DIFF= Escore médio da diferença das fluências * $p < 0,05$ and ** $p = 0,001$ pelo teste *T student* não pareado. M= Média; SD=Desvio Padrão.

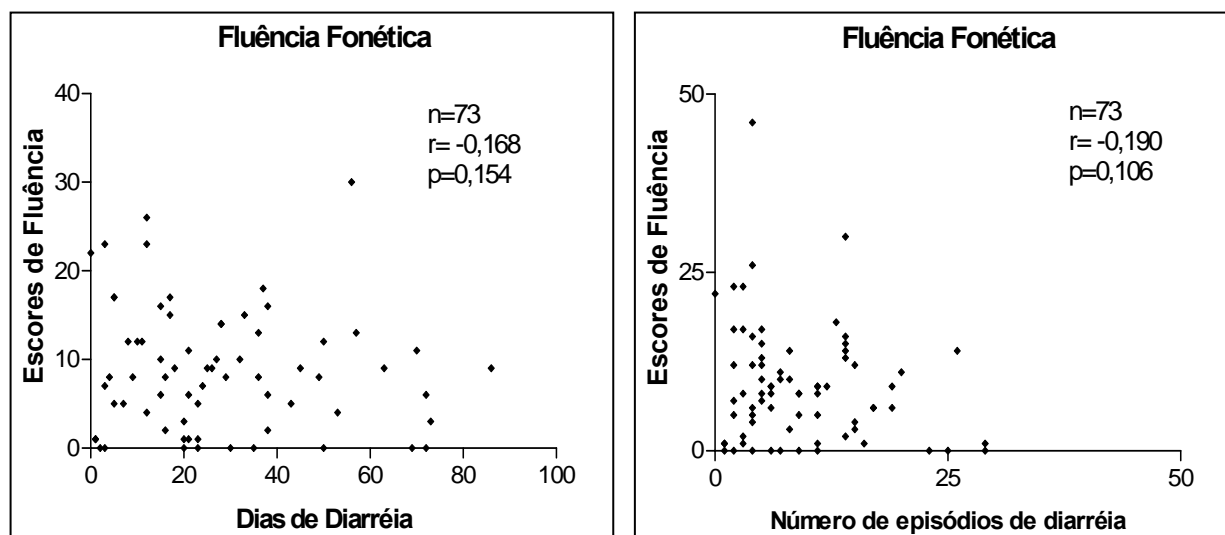


Figura 23: Correlação entre os escores de fluência fonética com o número de episódios e dias de diarréia nos 2 primeiros anos em 73 crianças coortes do Gonçalves Dias.

Nota: O conceito de diarréia foi definido como sendo ≥ 3 vezes líquidas em um período de 24h. Um episódio de diarréia foi definido como sendo diarréia com uma duração ≥ 1 dia, separado de outro episódio de diarréia por um intervalo de ≥ 48 h sem diarréia.

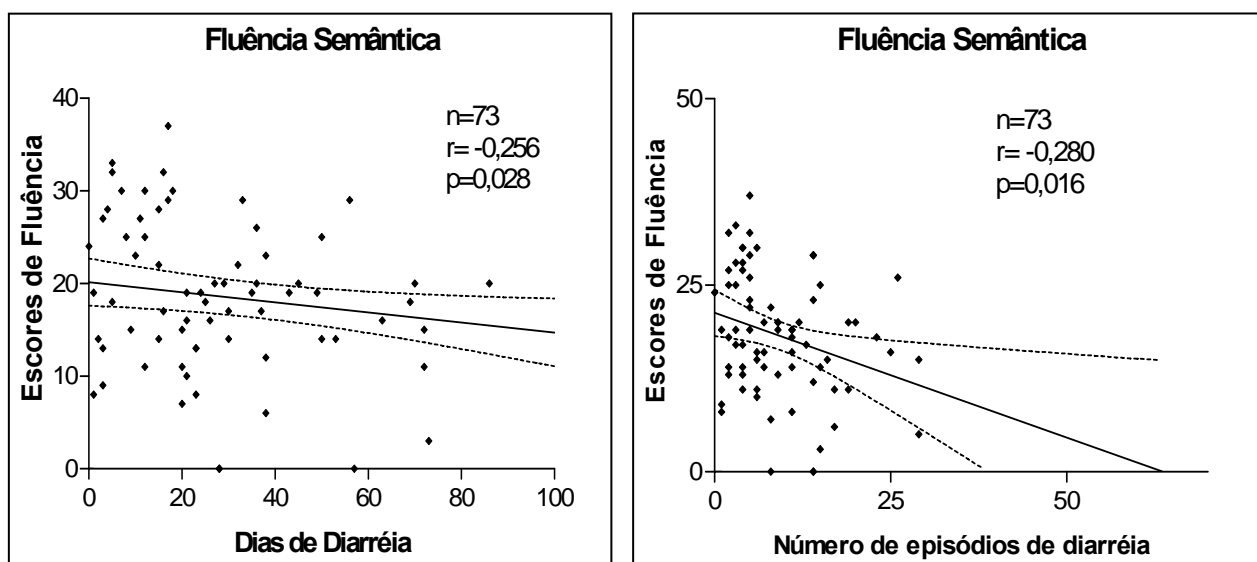


Figura 24: Correlação entre os escores fluência semântica com número de episódios e dias de diarreia nos 2 primeiros anos em 73 crianças coortes do Gonçalves Dias.

Nota: O conceito de diarreia foi definido como sendo ≥ 3 fezes líquidas em um período de 24h. Um episódio de diarreia foi definido como sendo diarreia com uma duração ≥ 1 dia, separado de outro episódio de diarreia por um intervalo de ≥ 48 h sem diarreia.

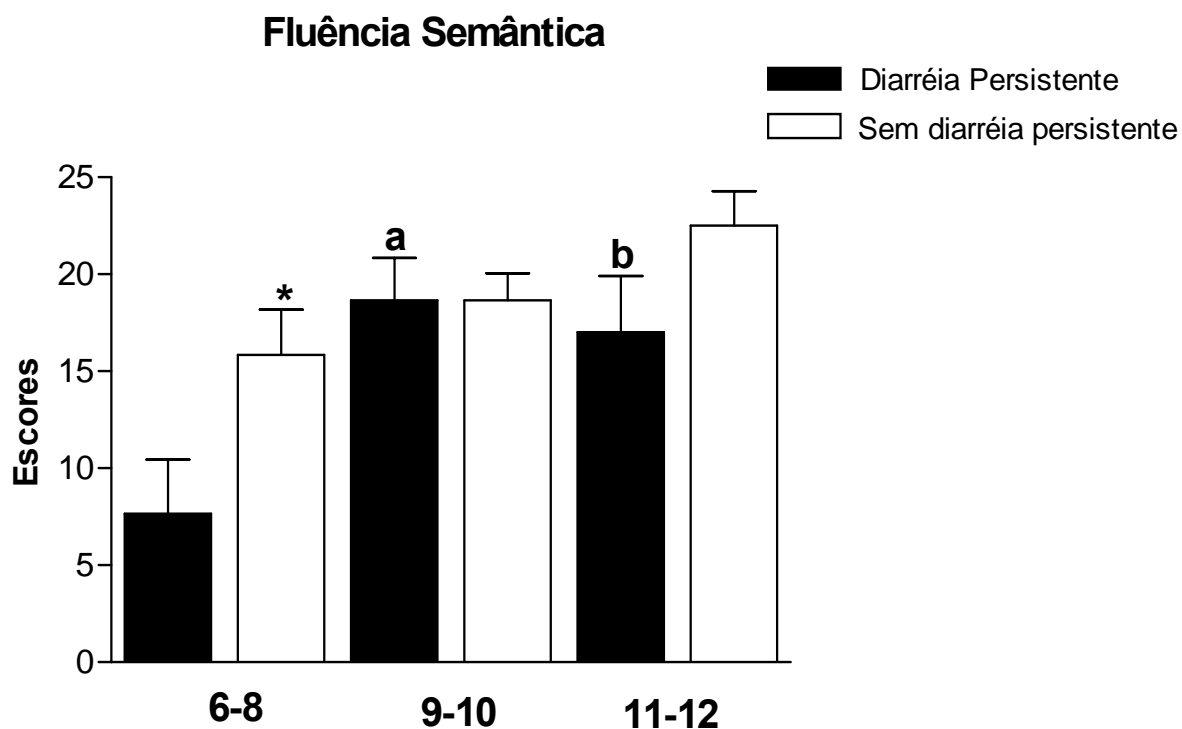


Figura 25: Escores de fluência semântica de acordo com a faixa etária em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarreicas nos primeiros dois anos de idade. As barras representam Média \pm SD dos escores; pelo teste *T student* não pareado. * $p < 0,05$.

a: $p < 0,05$, comparando escores de fluência semântica em crianças com história de diarréia persistente aos 9-10 anos ($N=3$) e aos 6-8 anos de idade ($N=6$). **b:** $p < 0,05$, comparando escores de fluência semântica em crianças com história de diarréia persistente aos 11-12 anos ($N=8$) e aos 6-8 anos de idade.

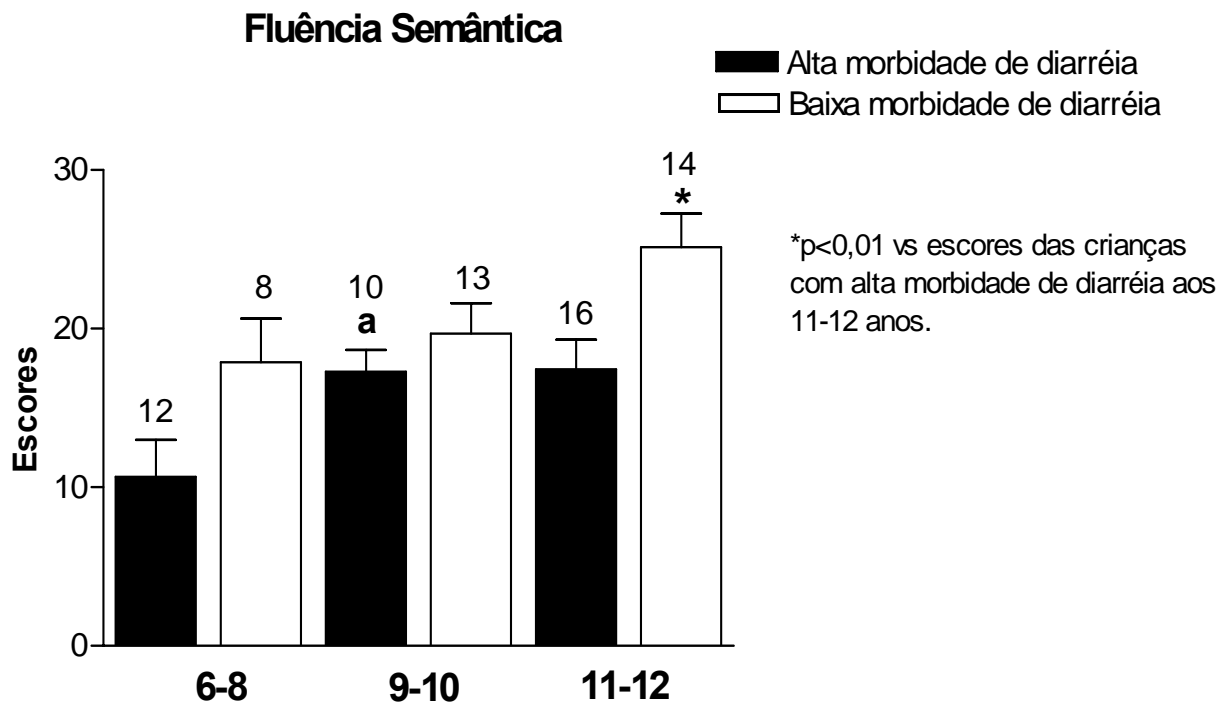


Figura 26: Escores de fluência semântica de acordo com a faixa etária em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarreicas nos primeiros dois anos de idade. As barras representam Média ± SD dos escores; pelo teste *T student* não pareado.

a: p<0,05, comparando escores de fluência semântica em crianças com história de alta morbidade de diarreia aos 9-10 anos (N=13) e aos 6-8 anos de idade (N=12).

Fluência Fonética

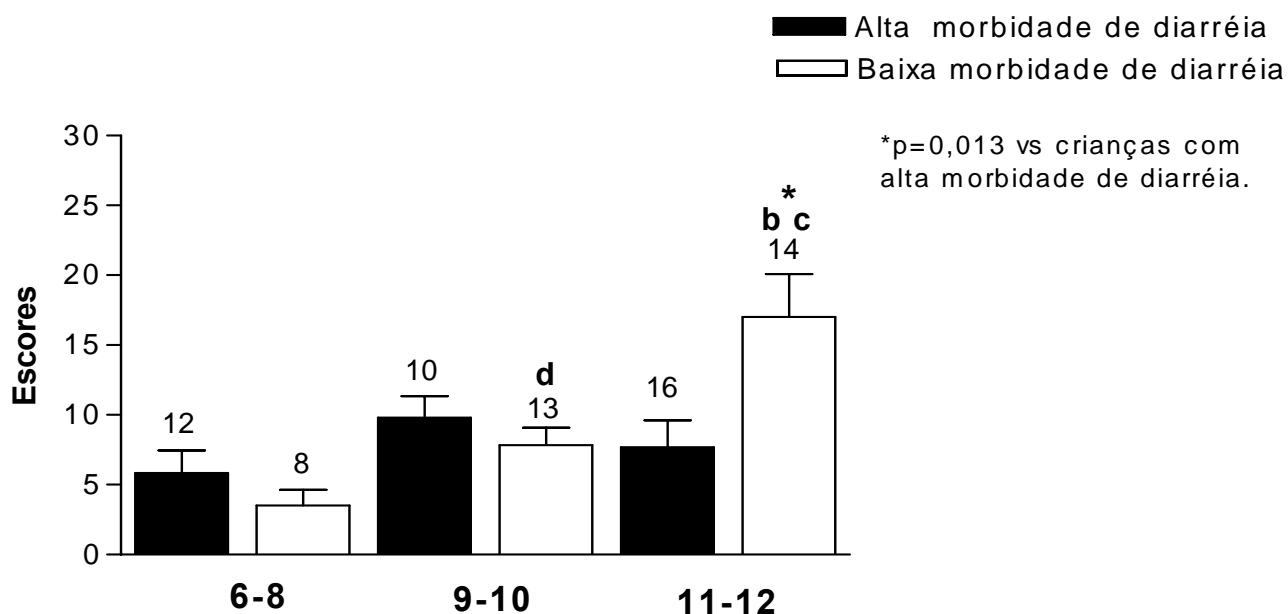


Figura 27: Escores de fluência fonética de acordo com a faixa etária em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarreicas nos primeiros dois anos de idade. As barras representam Média \pm SD dos escores; pelo teste *T student* não pareado. * $p < 0,05$.

b: $p < 0,01$, comparando escores de fluência fonética em crianças com história de baixa morbidade de diarreia aos 11-12 anos (N=14) e aos 6-8 anos de idade (N=8). **c:** $p = 0,012$, comparando escores de fluência fonética em crianças com história de baixa morbidade de diarreia aos 11-12 anos (N=14) e aos 6-8 anos de idade (N=8). **d:** $p = 0,027$, comparando escores de fluência fonética em crianças com história de baixa morbidade de diarreia aos 9-10 anos (N=13) e aos 6-8 anos de idade (N=8).

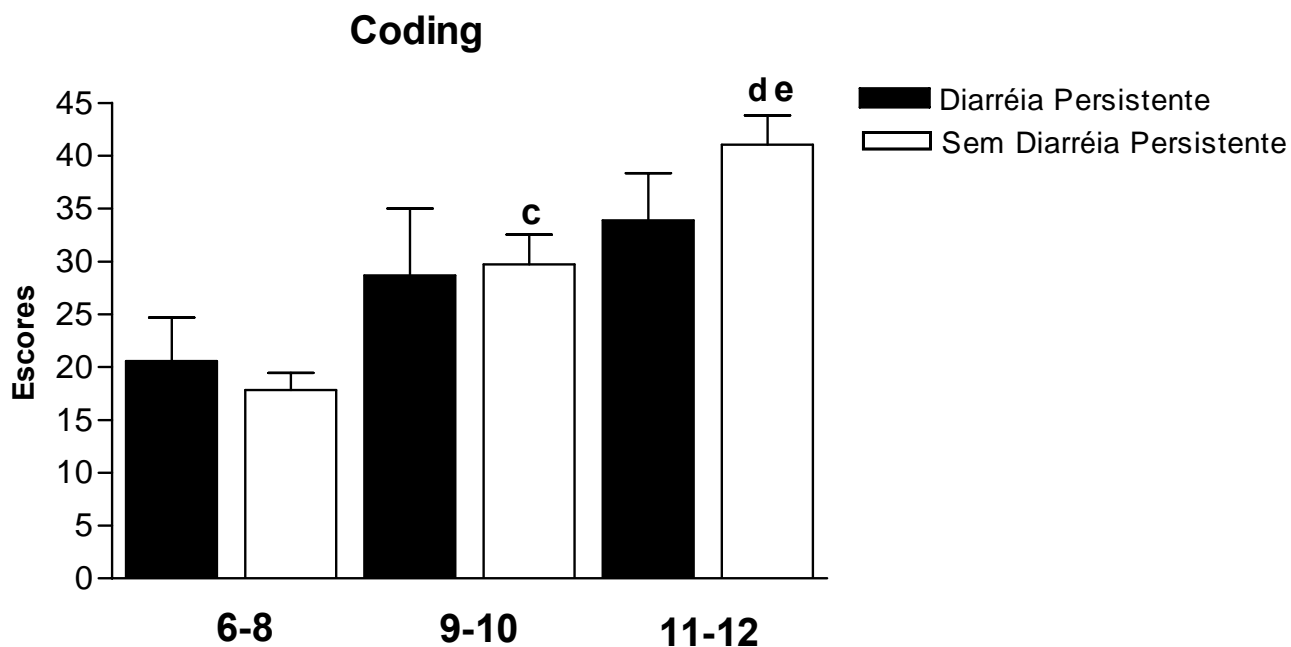


Figura 28: Escores de Coding de acordo com a faixa etária em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarreicas nos primeiros dois anos de idade. As barras representam Média \pm SD dos escores; pelo teste *T student* não pareado. * $p < 0,05$.

c: $p < 0,01$, comparando escores de coding em crianças com história de diarreia aguda aos 9-10 anos (N=20) e aos 6-8 anos de idade (N=13). **d:** $p < 0,001$, comparando os escores de coding em crianças com história de diarreia aguda aos 11-12 anos (N=22) e aos 6-8 anos de idade (N=7). **e:** $p < 0,01$, comparando coding escores crianças com história de diarreia aguda aos 11-12 anos (N=22) e aos 9-10 anos de idade (N=20).

A infecção por giardia também foi um forte fator preditivo para a fluência semântica ($\beta = -0,28$, $p=0,04$) e juntamente com outros parasitas contabilizou para 5% da variância na performance da fluência. Além disso, a relação entre diarreia e o declínio cognitivo perdeu a força de significância ($\beta=0,05$, $p=0,75$), após ajustar para giardiase.

4.3. Purificação do DNA e Genotipagem da APOE

O método de escovação-bochecho foi considerado um método viável para realização da genotipagem da APOE, por causa das altas taxas de sucesso tanto no processo de amplificação por PCR e durante a digestão enzimática. A concentração do DNA, quantidade total de DNA e coeficiente de pureza obtidos a partir das amostras de células bucais estão ilustradas na **Tabela 7**.

4.4. Dados demográficos de acordo com a genotipagem da APOE

Das 77 crianças que realizaram os testes cognitivos, 72 (93.5%) foram incluídas no protocolo genético. Das 5 crianças que foram excluídas do estudo, três se mudaram para outra localidade e somente duas delas, os pais não concordaram em assinar o termo de consentimento. As características demográficas das 72 crianças do estudo coorte incluídas no protocolo para genotipagem da APOE aparecem na **Tabela 7**, de acordo com a presença ou ausência do alelo $\epsilon 4$. As **Figuras 29 e 30** representam fotografias de gel de agarose mostrando o produto de amplificação (270 pb) e genotipagem completa da apolipoproteína E, respectivamente. As **Figuras 31 e 32** mostram seqüenciamento para confirmação de genótipos.

A média dos valores de todas as variáveis antropométricas avaliadas e as características socio-econômicas foram semelhantes entre o grupo de crianças APO $\epsilon 4$ positivas (portadores dos genótipos 2/4, 3/4, 4/4) e o grupo de crianças

APO ϵ 4 negativas (portadoras dos genótipos 2/3, 2/2, 3/3). A distribuição alélica e genotípica de toda população está ilustrada na **Tabela 8**. A frequência do alelo ϵ 4 nessa população pediátrica do Gonçalves Dias foi considerada relativamente elevada (14.6%), levando em consideração a frequência esperada de 9-12% observada na população geral brasileira, como descrita em diferentes levantamentos epidemiológicos (ALMEIDA & SHIMOKOMAKI, 1997; DE ANDRADE et al, 2000; SOUZA et al, 2003; SOUZA, 1998), **Tabelas 8 e 9**. Contudo, quando nós consideramos dois grupos aparte, de acordo com o grau de doenças diarreicas nos primeiros anos de vida, como mostrado na **Tabela 8**, a frequência do alelo ϵ 4 foi superior no grupo com história de menos episódios de diarreia infantil (menos que a média de episódios de diarreia na população como um todo), sendo de 17,5%, em relação ao grupo de crianças com história de alta morbidade de diarreia infantil (com mais do que a média de episódios de diarreia na população como um todo), sendo este de 10,8% ($p < 0,03$, pelo teste χ quadrado).

4.5. Testes cognitivos de acordo com a genotipagem da APOE

Ao contrário da hipótese inicial, as crianças APO ϵ 4 negativas não apresentaram melhor rendimento em todos os testes cognitivos avaliados, **Figura 33**. Ao contrário, as crianças APO ϵ 4 positivas mostraram uma tendência para uma melhor performance em todos os testes cognitivos, contudo sem alcançar valores com força de significância estatística, **Figura 15**. Além disso, quando nós comparamos as crianças que experimentaram alta morbidade de doenças diarreicas (\geq mediana de 7 episódios nos primeiros 2 anos de idade), àquelas portadores da APO ϵ 4 tiveram um desempenho significativamente melhor no teste de Coding ($39 \pm 9,9$; $n=7$, $p=0,01$), quando comparadas com as crianças APO ϵ 4 negativas provenientes do mesmo estudo coorte ($25 \pm 12,7$; $n=27$), **Figura 34**.

Além disso, observamos que crianças do grupo APO ϵ 4 positivo, com história de alta morbidade de diarreia, apresentaram um declínio da fluência semântica (mais comprometida na maioria das crianças devido às doenças diarreicas e desnutrição, predominantemente nas crianças APO ϵ 4 negativas, $p < 0,01$), com o

aumento do número de episódios de diarreia, e a média da diferença dos escores de fluência verbal (DIFF), $p=0,025$, um coeficiente padronizado para avaliar o grau e a proporção do impedimento da fluência verbal, **Figuras 35 e 36**. As crianças portadoras da APO ϵ 4 com história de alta morbidade de diarreia também preservaram os escores de fluência verbal total, $p<0,05$.

As **Tabelas 9 e 10** apresentam os genótipos e frequências alélicas das crianças de acordo com a faixa etária e performance cognitiva, respectivamente. A frequência do alelo ϵ 4 foi significativamente mais elevada ($\chi^2=4,34$, $p=0,037$) nas crianças com melhores escores no teste TONI III ($>$ mediana dos escores de QI), **Tabela 10**, entretanto isso não foi suficiente para determinar diferença estatística no fenótipo avaliado pelo teste, quando, por outro lado, comparamos a média dos escores de QI, em ambos os grupos de acordo com a presença ou ausência do alelo ϵ 4.

Entretanto, sob condições de alta morbidade de diarreia, (\geq mediana de 7 episódios nos primeiros 2 anos de vida), a alta frequência do alelo ϵ 4 ($\chi^2=7,69$, $p=0,011$) nas crianças com melhor performance no teste do Coding ($>$ mediana dos valores dos escores), se correlaciona bem com o melhor rendimento das crianças APO ϵ 4 positivas (~35%) em comparação com as outras crianças do estudo coorte que não possuem o alelo ϵ 4, **tabela 10 e Figura 34**.

Além disso, o número médio de episódios de diarreia infantil nos portadores do alelo ϵ 4 ($8,2 \pm 1,8$, $N=21$) foi significativamente menor ($p<0,001$), quando comparado com não portadores do alelo ϵ 4 ($9,7 \pm 0,9$, $N=51$), **Tabela 11**. Ainda, as crianças do grupo APO ϵ 4 não apresentaram correlação positiva ($n=17$, $r=0,16$, $p=0,53$) entre a infecção por *Giardia lamblia* e episódios de diarreia, como foi observado em portadores do alelo ϵ 4 ($n=36$, $r=0,42$, $p=0,01$).

Tabela 7: Quantidade total e concentração de DNA e coeficientes de pureza em 72 amostras extraídas de células bucais.

Estatística	DNA (μg)	Conc. DNA ($\mu\text{g/ml}$)	Razão 260/280	Razão 260/230
Minimum	2,0	0,10	0,0	0,10
25th %	18,0	0,90	1,27	0,66
Mediana	28,5	1,40	1,32	0,73
75th %	59,0	2,95	1,44	0,79
Maximum	317	15,9	3,0	1,12
Média	45,61	2,27	1,41	0,73
CV %	107,2	107,7	25,17	19,20

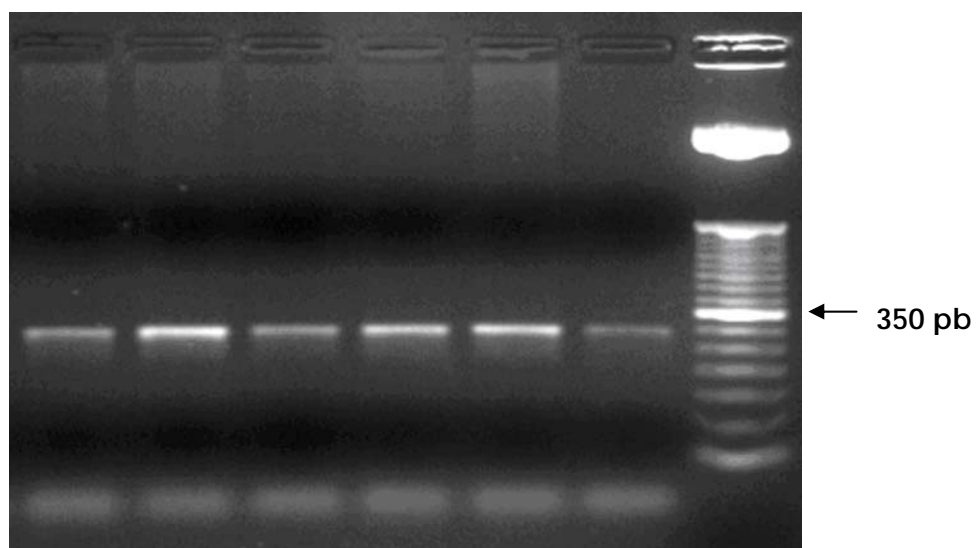


Figura 29: Produtos de amplificação (270 pb), resolvidos em 2% agarose gel, após protocolo de PCR. A seta indica a banda do DNA ladder (50 pb), correspondente a 350 pb, que serve de referencial para diagnóstico da amplificação do gene da APOE humana.

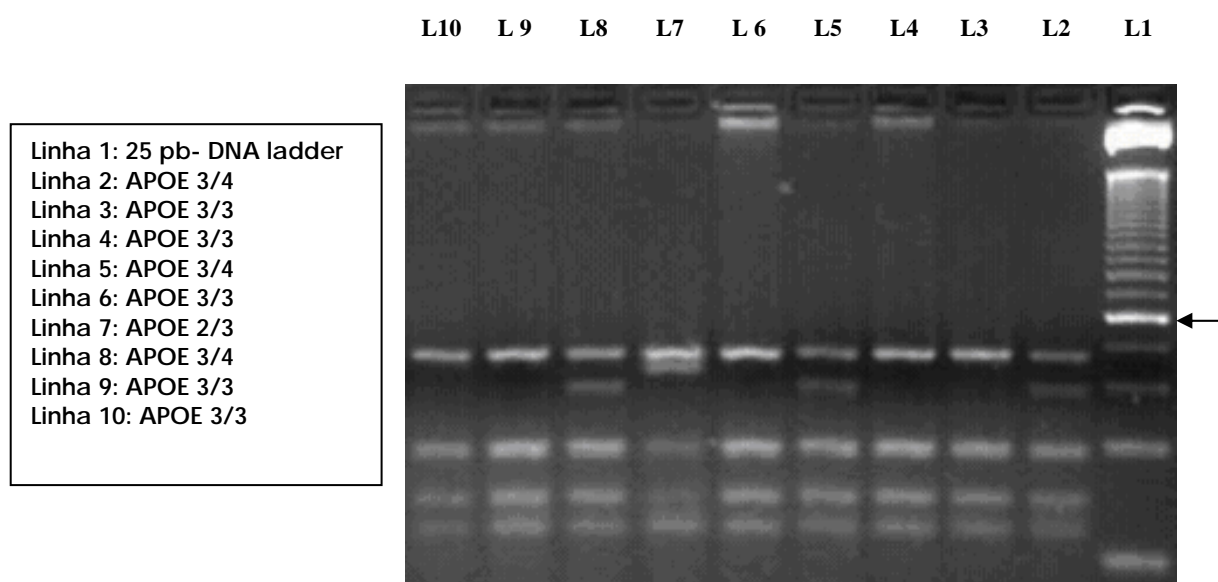


Figura 30: Genotipagem da apolipoproteína E a partir de digestão pela enzima de restrição *HhaI*, usando DNA purificado de amostras de células bucais. Os fragmentos de restrição foram resolvidos em gel de agarose a 4%. O genótipo de cada amostra é indicado ao lado. A seta indica uma banda de 150 pb do DNA ladder.

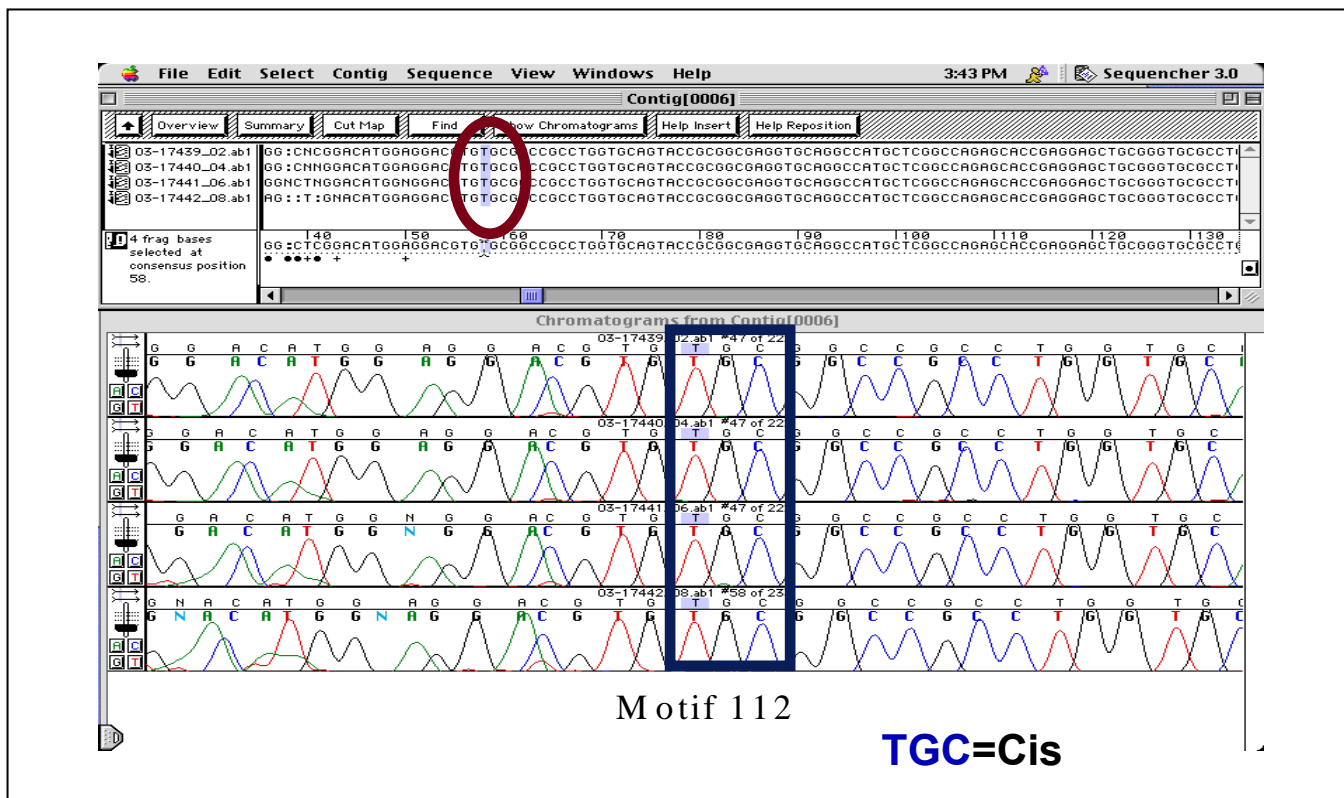


Figura 31: Seqüenciamento do gene da APOE após purificação do produto de PCR ao nível do motif 112 em quatro diferentes amostras. Notar a seqüência TGC, em destaque (presente nos alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 3$, mas não no alelo $\epsilon 2$).

Alelo $\epsilon 2$ = Códon TGC (resíduo 112 – Cis) e Códon TGC (resíduo 158 – Cis).

Alelo $\epsilon 3$ = Códon TGC (resíduo 112 – Cis) e Códon CGC (resíduo 158 – Arg).

Alelo $\epsilon 4$ = Códon CGC (resíduo 112 – Arg) e Códon CGC (resíduo 158 – Arg).

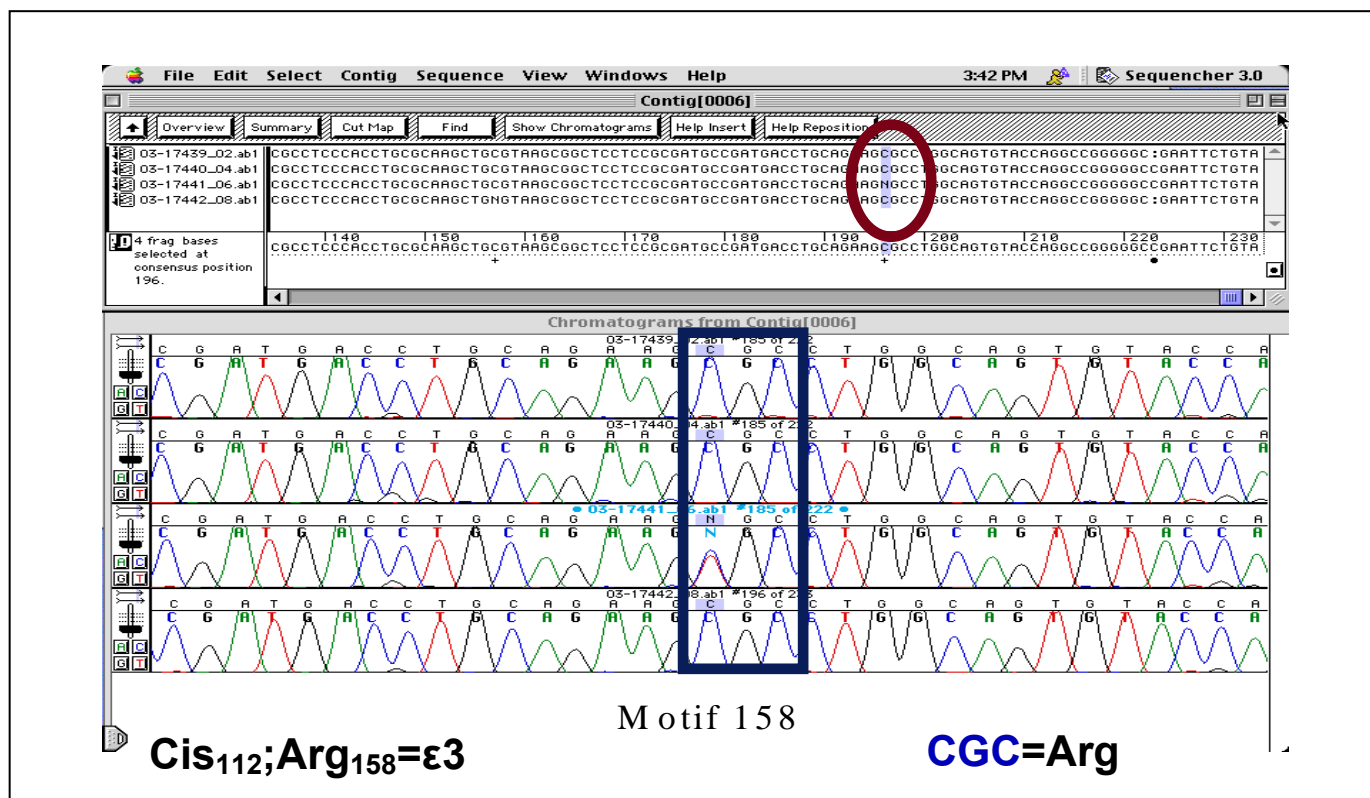


Figura 32: Seqüenciamento do gene da APOE após purificação do produto de PCR ao nível do motif 158 em quatro diferentes amostras. Notar a seqüência CGC em destaque (presente nos alelos ε3 e ε4, mas não no alelo ε4).

Alelo ε2= Códon TGC (resíduo 112 – Cis) e Códon TGC (resíduo 158 – Cis).

Alelo ε3= Códon TGC (resíduo 112 – Cis) e Códon CGC (resíduo 158 – Arg).

Alelo ε4= Códon CGC (resíduo 112 – Arg) e Códon CGC (resíduo 158 – Arg).

Notar que as seqüências observadas no motif 112 (TGC=Cis), figura 31, e motif 158 (CGC=Arg), figura 32, resultam no diagnóstico do alelo ε3.

Tabela 8: Genótipo da ApoE e freqüência alélica (*f*) em crianças coortes (6-12 anos de idade) com diferentes morbidades de diarreia na Comunidade Gonçalves Dias (GD), Fortaleza-CE, Brasil (N=72).

APOE	Genótipos						Alelos		
	2/2	2/3	3/3	2/4	3/4	4/4	2	3	4
Grupo 1	01	03	21	02	05	00	07	50	07
N (f%)	(3,12)	(9,37)	(65,63)	(6,25)	(15,63)	(00)	(10,9)	(78,2)	(10,9)
Grupo 2	00	05	21	00	14	00	05	61	14
N (f%)	(00)	(12,5)	(52,5)	(00)	(35)	(00)	(6,2)	(76,3)	(17,5)
Total	01	08	42	02	19	00	12	111	21*
N (f%)	(1,4)	(11,1)	(58,3)	(2,8)	(26,4)	(00)	(8,3)	(77,1)	(14,6)

Grupo 1: Crianças coortes com \geq média de episódios de diarreia (N=32).

Grupo 2. Crianças coortes com $<$ média de episódios de diarreia (N=40).

Média de episódios de diarreia nos primeiros 2 anos de idade= 9,28

* versus 10-12% da freqüência do alelo ϵ 4 na população geral brasileira (Souza et al, Braz J Med Biol Res 36: 919, 2003; Andrade et al, Braz J Med Biol Res 33: 529, 2000).

Tabela 9: Genótipos e frequência alélica, de acordo com a performance nos testes cognitivos em crianças do Gonçalves Dias, Fortaleza-CE, Brasil.

	Todo Grupo		TONI III		Fluência Verbal		Semântica		Fonética		Coding		Elithorn													
			>Md	<Md	> Md	< Md	> Md	< Md	> Md	< Md	> Md	< Md	>Md	<Md												
	N=72		N=27	N=29	N=34	N=33	N=34	N=32	N=32	N=31	N=34	N=31	N=30	N=28												
ε2ε2	1		0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0												
ε2ε3	8		4	3	6	2	6	2	5	2	4	3	6	1												
ε2ε4	2		2	0	2	0	2	0	1	0	2	0	1	1												
ε3ε3	42		12	22	15	22	14	24	15	21	15	21	13	18												
ε3ε4	19		9	4	11	8	11	6	11	7	13	6	10	8												
ε4ε4	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%												
Alelos APOE																										
ε2	12	8,3	6	11,1	3	5,2	8	11,8	4	6,1	10	14,7	2	3,1	6	9,4	4	6,4	6	8,8	5	8,1	7	11,7	2	3,6
ε3	111	77,1	37	68,5	51	87,9	47	69,1	54	81,8	45	66,2	56	87,5	46	71,9	51	82,3	47	69,1	51	82,2	42	70	45	80,3
ε4	21	14,6	11	20,4	4	6,9	13	19,1	8	12,1	13	19,1	6	9,4	12	18,7	7	11,3	15	22,1	6	9,7	11	18,3	9	16,1
Total	144		54		58		68		66		68		64		64		62		68		62		60		56	

N= número de sujeitos

n= número de alelos

Md= mediana

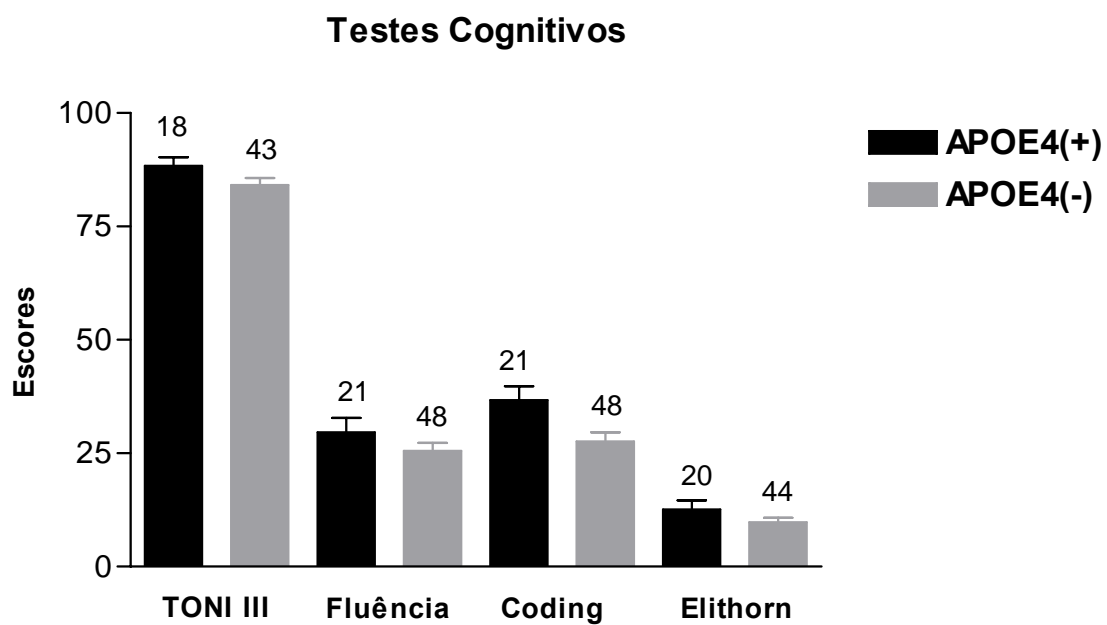


Figura 33: Crianças APO ϵ 4 negativas não apresentaram uma melhor performance em todos os testes cognitivos avaliados, quando comparadas com as crianças APO ϵ 4 positivas.

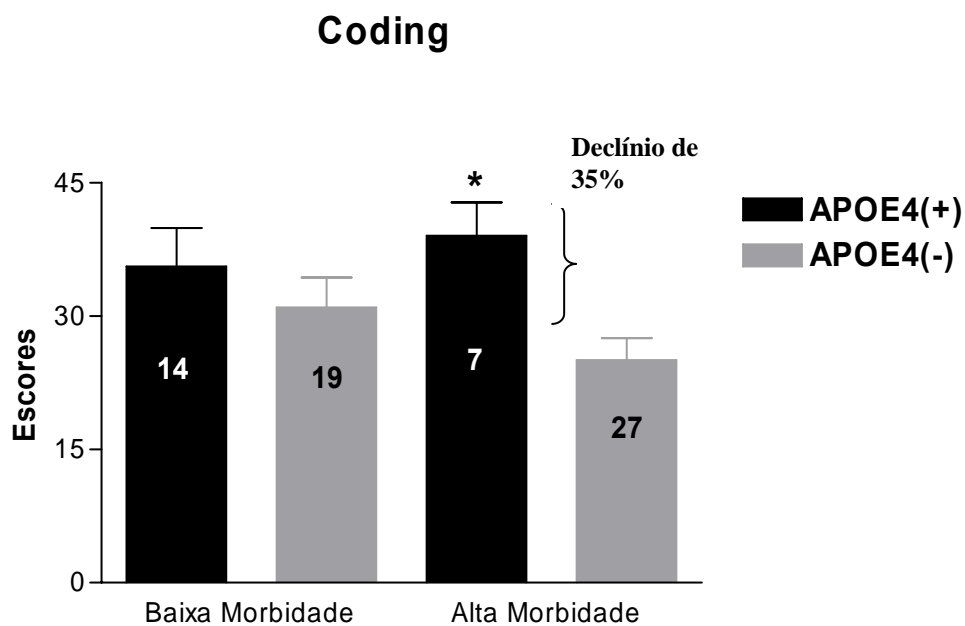


Figura 34: Escores de Coding em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarréicas nos primeiros dois anos de idade. As barras representam Média \pm SD dos escores; pelo teste *T student* não pareado. * $p=0,011$. APO ϵ 4 “protege” os déficits cognitivos (Coding) em crianças com elevada morbidade de diarréia.

Elevada Morbidade: Crianças coortes com \geq mediana de episódios de diarréia.

Baixa Morbidade: Crianças coortes com $<$ mediana de episódios de diarréia.

Mediana de episódios de diarréia nos primeiros 2 anos de idade= 7,0

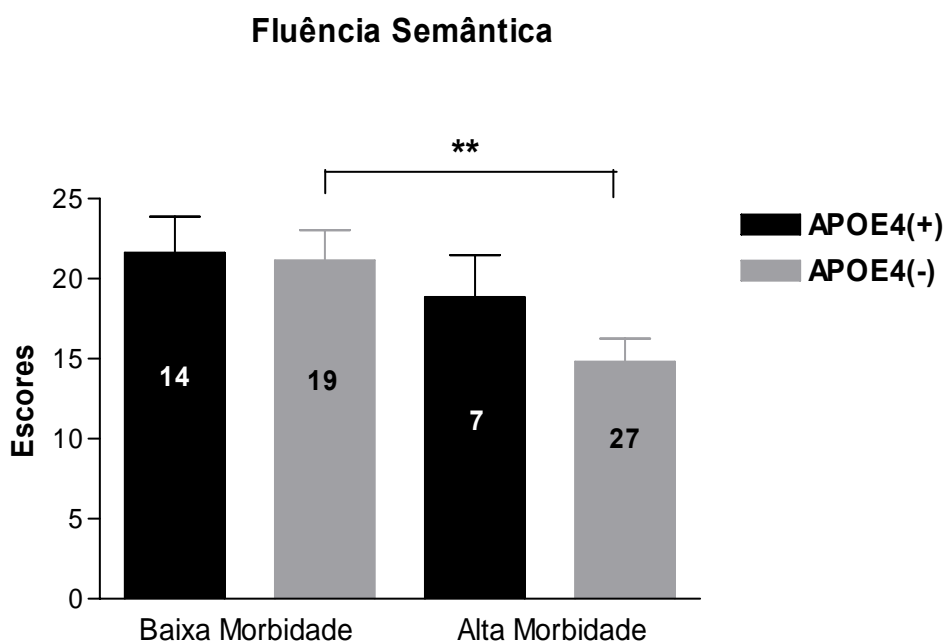


Figura 35: Escores de Fluência Semântica em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade de doenças diarréicas nos primeiros dois anos de idade. As barras representam Média \pm SD dos escores; pelo teste *T student* não pareado. * $p=0,009$. Os escores de fluência verbal são comprometidos apenas em crianças ApoE4- com elevada morbidade de diarréia. ApoE4+ previne esse declínio nas crianças com grau comparável de diarréia nos primeiros dois anos de idade.

Elevada Morbidade: Crianças coortes com \geq mediana de episódios de diarréia.

Baixa Morbidade: Crianças coortes com $<$ mediana de episódios de diarréia.

Mediana de episódios de diarréia nos primeiros 2 anos de idade= 7,0

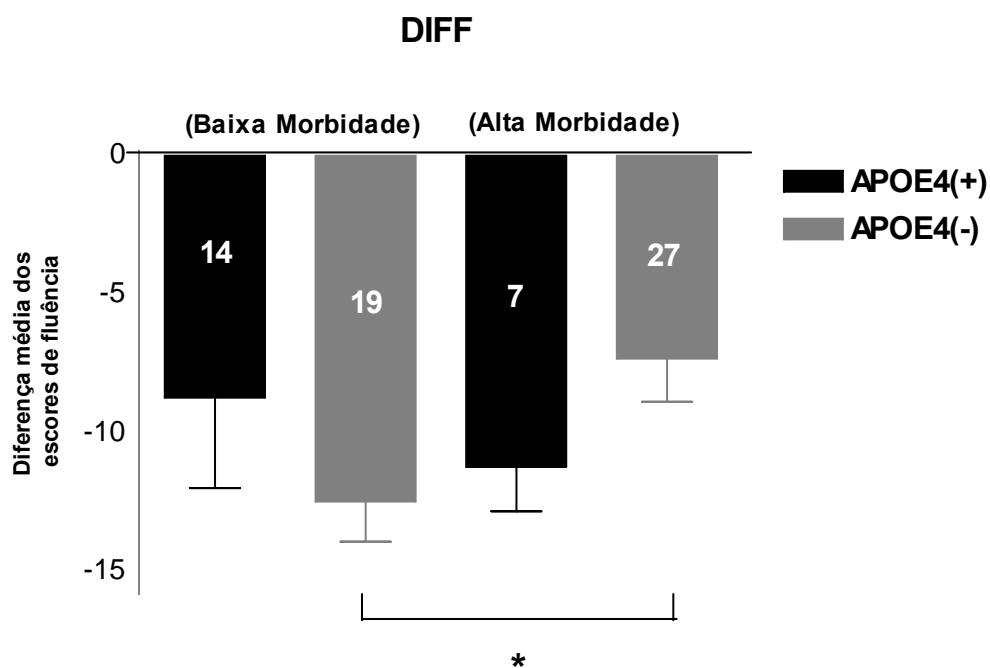


Figura 36: Diferença Média dos Escores de Fluência (DIFF) em crianças coortes da Comunidade Gonçalves Dias, de acordo com a morbidade das doenças diarréicas nos primeiros dois anos de idade. As barras representam Média \pm SD dos escores; pelo teste *T student* não pareado. * $p= 0,025$. Os escores de DIFF são comprometidos apenas em crianças ApoE4- com alta morbidade de diarréia. ApoE4+ previne esse declínio nas crianças com grau comparável de diarréia nos primeiros dois anos de idade.

Tabela 10: Impacto do alelo APOE4 na performance cognitiva de acordo com a história de diarreia.

Perfil Cognitivo	População Total						Crianças com Alta Morbidade de Diarreia**					
	APOE4(+) N (%)	APOE4(-) N (%)	OR	95% CI	P	χ ²	APOE4(+) N (%)	APOE4(-) N (%)	OR	95% CI	P	χ ²
TONI III > mediana	11 (20,4)	43 (79,6)	3,45	1,02 a 11,61	0,037*	4,34	4 (16,6)	20 (83,4)	0,28	0,06 a 1,58	0,19	2,15
TONI III < mediana	04 (6,9)	54 (93,1)					2 (5,2)	36 (94,8)				
Semântica > mediana	13 (19,1)	55 (80,9)	2,28	0,81 a 6,43	0,111	2,52	4 (14,2)	24 (85,8)	0,16	0,02 a 1,56	0,15	3,08
Semântica < mediana	06 (9,4)	58 (90,6)					1 (2,6)	37 (97,4)				
Fonética > mediana	12 (18,8)	52 (81,2)	1,81	0,66 a 4,96	0,243	1,36	4 (12,5)	28 (87,5)	0,47	0,098 a 2,54	0,67	0,72
Fonética < mediana	07 (11,3)	55 (88,7)					2 (6,2)	30 (93,8)				
Fluência Total > mediana	13 (19,1)	55 (80,9)	1,71	0,65 a 4,45	0,267	1,23	5 (16,6)	25 (83,4)	0,29	0,069 a 1,59	0,23	2,10
Fluência Total < mediana	08 (12,1)	58 (87,9)					2 (5,5)	34 (94,5)				
Coding > mediana	15 (22,1)	53 (77,9)	2,64	0,95 a 7,31	0,056	3,64	7 (20,5)	27 (79,5)	0,05	0,002 a 0,97	0,011*	7,69
Coding < mediana	06 (9,7)	56 (90,3)					0 (100)					
Elithorn > mediana	11 (18,3)	49 (81,7)	1,17	0,44 a 3,08	0,748	0,10	4 (13,3)	26 (86,7)	0,54	0,09 a 3,232	0,67	0,46
Elithorn < mediana	09 (16,1)	47 (83,9)					2 (7,6)	24 (92,4)				

Abreviações: OR, odds ratio; CI, intervalo de confiança.

* P<0,05, após correção por Mantel-Haenszel. ** Crianças com ≥ mediana dos episódios de diarreia da população nos primeiro 2 anos de vida.

Tabela 11: Dados demográficos, antropométricos e nutricionais da população do estudo, de acordo com a distribuição dos alelos APOε4.

Características		Crianças Coortes	
		APOε 4(+)	APOε 4(-)
Média de Idade (anos)		10,1 ± 1,6 (N=21)	9,52 ± 1,7 (N=48)
Perimetria Cefálica		54,2 ± 1,8 (N=21)	53,51 ± 2,1 (N=47)
Peso ao Nascer (g)		3434 ± 478 (N=17)	3255 ± 431 (N=38)
Média de episódios de diarreia		8,2 ± 1,8 (N=21)	9,7 ± 0,9*
Sexo	Feminino	15 (71%)	29 (57%)
	Masculino	06 (29%)	22 (43%)
Perfil Nutricional aos 2 anos de idade	HAZ 24	-1,14 ± 1,48 (N=20)	-0,90 ± 1,126 (N=44)
	WAZ 24	-0,78 ± 1,23 (N=20)	-0,46 ± 1,01 (N=44)
	WHZ 24	-0,04 ± 1,44 (N=20)	0,08 ± 0,90 (N=44)
Educação Materna	< Escolaridade primária	15 (71%)	35 (69%)
	≥ Escolaridade primária	6 (29%)	11 (21%)
	Desconhecido	-	5 (10%)
Renda familiar Mensal* (Salário mínimo)	< 2	9 (43%)	22 (43%)
	≥ 2	7 (33%)	9 (18%)
	Desconhecido	5 (24%)	20 (39%)

*p<0,001 pelo teste *T student* não pareado e Mann Whitney.

HAZ 24; WAZ 24; WHZ 24= z escores de altura, peso e altura-peso por idade, respectivamente, aos dois anos de vida.

5. DISCUSSÃO

5.1. Comprometimento da fluência semântica

Em recentes estudos preliminares, realizados pelo grupo do Dr. Guerrant e Dr. Aldo Lima, no Brasil (GUERRANT et al, 1999; NIEHAUS et al, 2002) e de outros (BERKMAN et al, 2002; POLLITT et al, 2000), tem sido documentada uma significativa associação do desempenho cognitivo de crianças, em áreas urbanas pobres, com história de diarreia infantil nos primeiros dois anos de vida (considerado como um crítico período formativo, ver **Figura 37**), mesmo controlando para diferentes co-variáveis.

Nesse trabalho realizado em colaboração com a Universidade de Virgínia, por intermédio do Centro para Saúde Global (*Center for Global Health*), nós abordamos o impacto da diarreia infantil no desenvolvimento das funções executivas, linguagem, memória e coeficiente de inteligência não verbal, avaliado a partir de quatro testes neuropsicológicos, a saber: labirintos Elithorn, fluência verbal (semântica e fonética), Coding e TONI III, respectivamente. Todos estes testes têm sido utilizados como rotina em estudos de neuropsicologia para avaliar elementos da função cognitiva, especialmente envolvendo controle executivo.

Como um grupo, as crianças com história de alta morbidade de diarreia ou diarreia persistente nos dois primeiros anos de vida apresentaram um comprometimento significativo na fluência semântica e fluência verbal total, relacionado com a idade, mas não mostraram deficiência nos testes de Coding e labirintos Elithorn, quando comparado com o grupo sem história de diarreia persistente. Contudo, uma evolução do desempenho cognitivo nos testes de fluência verbal foi observada com a idade, sugerindo que os déficits das funções executivas têm um componente idade dependente, com impedimentos aos 6-8 anos (no critério de diarreia persistente) e aos 11-12 anos de idade (quando consideramos o maior número de episódios de diarreia) e que uma recuperação parcial pode ocorrer, a partir de novas experiências.

Um estudo recente, utilizando protocolo de imagem por ressonância magnética (IRM), demonstrou alterações relacionadas com a idade na substância branca do fascículo arqueado (a via neural que medeia as interações sensório-motoras das regiões de linguagem), com as crianças de 6-8 anos de idade apresentando curvas de mielinização mais rápidas em relação às outras faixas etárias (PAUS et al, 1999).

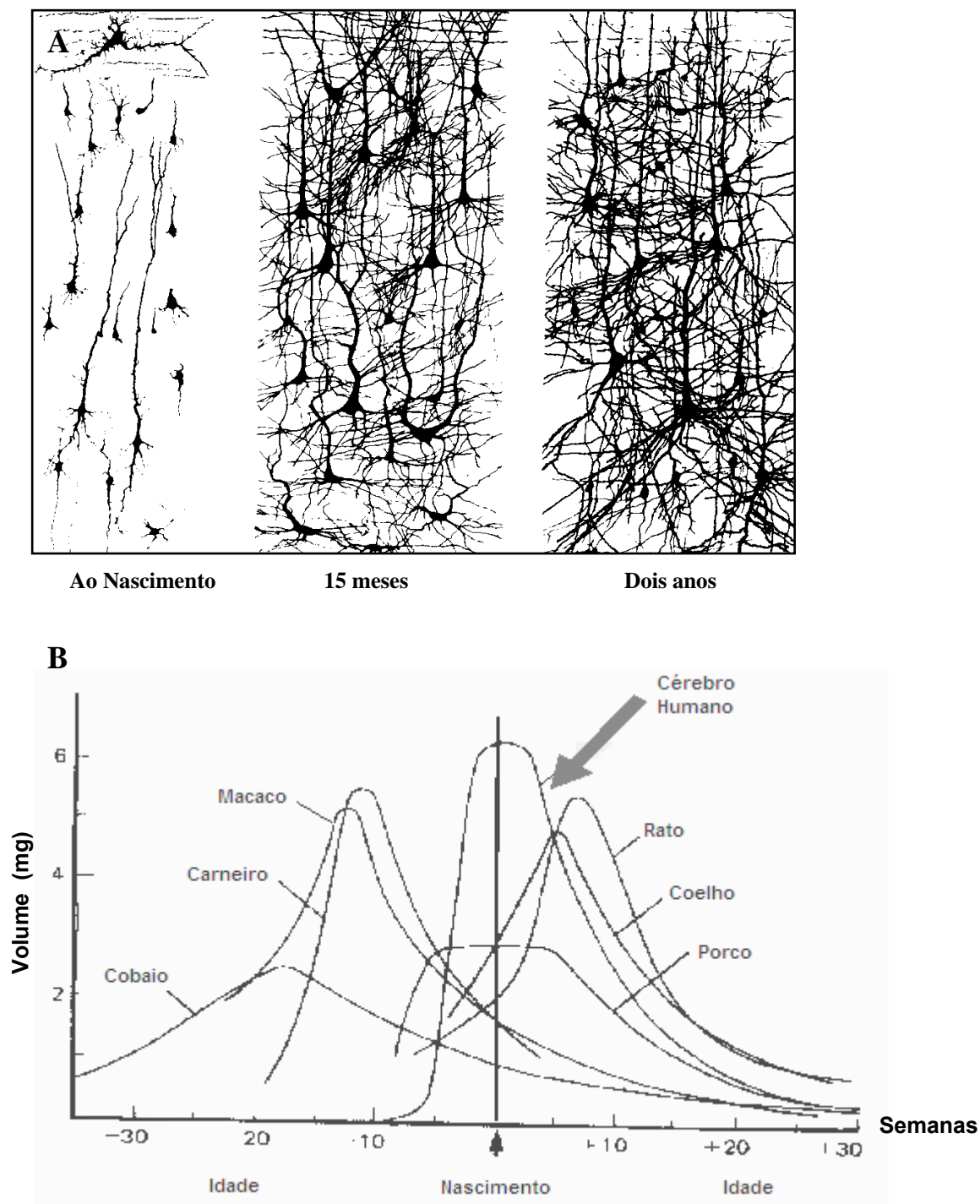


Figura 37: **A.** Aumento de sinaptogênese e extensão dendrítica ao longo dos dois primeiros anos de vida, no córtex frontal humano, representando um período crítico de plasticidade neuronal. **B.** Crescimento do cérebro humano no período pós-natal, comparado com outras espécies animais.

Além disso, alguns estudos têm demonstrado a influência de fatores relacionados com a idade durante reabilitação, após traumatismo craniano, na fluência verbal semântica em populações pediátricas (EWING-COBBS et al, 1998; LEVIN et al, 1996). Em particular, processos tais como arborização dendrítica, mielinização e sinaptogênese apresentam um grande desenvolvimento durante a média infância, numa escala hierárquica, com as regiões anteriores, sendo as últimas a se desenvolver (ANDERSON, 2001).

De maneira surpreendente, a habilidade de fluência semântica foi desproporcionalmente comprometida, após considerar escores padrões médios de fluência verbal, nas crianças com história de diarreia crônica nos primeiros 2 anos de vida. Na verdade, crianças com história de alta morbidade de diarreia mostraram uma tendência (apesar de forma não significativa) de melhor performance na fluência fonética (enumerar palavras começando com uma letra específica), em comparação com crianças coortes sem história de diarreia crônica, atingindo escores comparáveis com crianças saudáveis em um recente estudo italiano, abordando os aspectos de desenvolvimento da fluência verbal (RIVA, NICHELLI, DEVOTI, 2000), mesmo considerando que o conhecimento léxico necessário para a fluência fonética envolve um *set* maior de vocabulário do que a fluência semântica (em categorias), que exige apenas uma busca mais restrita por nomes de animais ou alimentos.

Os escores de fluência semântica, mas não os de fluência fonética, correlacionaram com a morbidade de diarreia nos primeiros formativos 2 anos de vida. O impedimento desproporcional da fluência semântica, mas não da fluência fonética, observado nas crianças com diarreia infantil precoce não parece estar relacionado com déficits no vocabulário (léxico), já que ambos os grupos possuem um mesmo perfil escolar e porque não houve correlação entre o grau de educação materna com os escores de fluência total ($r=0,001$, $p=0,991$).

Déficits na capacidade léxico-semântica e em sentenças semânticas são considerados como características cardinais de deficiências cognitiva-lingüísticas, após severo traumatismo craniano (HINCHLIFFE et al, 1998). A avaliação da fluência verbal representa um dos métodos mais sensitivos para detectar vários níveis de disfunção cerebral (RUFF et al, 1997) e em indivíduos saudáveis para avaliar funções executivas (CROWE, 1998; LADU et al, 2000; LEVIN et al, 2001; RUFF et al, 1997).

O teste de fluência semântica é considerado sensível para o funcionamento do lobo frontal e significativamente se correlaciona com a extensão das lesões frontais do cérebro. Além disso, o grau de fluência semântica se correlaciona com a integridade de todo o hemisfério esquerdo, sendo particularmente sensível para avaliar o funcionamento do lobo temporal (JURADO et al, 2000). Contudo, achados de (MARTIN et al, 1990), sugerem que tanto a lobectomia temporal esquerda ou direita significativamente reduz a fluência semântica e fonética.

O neocórtex temporal, principalmente seu aspecto posterior, tem sido indicado como o substrato anatômico para a reserva semântica, enquanto o lobo frontal e as vias neurais fronto-subcorticais parecem estar relacionadas com as ações de busca (BARR& BRANDT, 1996; MARTIN et al, 1994; NATHAN et al, 1994). A fluência semântica parece requerer um sistema de vias neurais mais amplamente distribuídas do que na fluência fonética, desde que a resposta semântica é mais comprometida após lesão axonal difusa em relação ao contexto fonético (WALLESCH et al, 2001).

Os testes de fluência verbal requerem rapidez da construção léxica. Promovendo acesso léxico automático e refletem a organização léxica eficiente. Os componentes dos testes de fluência verbal incluem: (1) o componente lingüístico associado com a função do hemisfério esquerdo e (2) um componente associado com a integridade do lobo frontal. A performance exige ainda um componente de memória de trabalho porque a criança precisa recrutar novas palavras enquanto relembra palavras previamente ditas, com intuito de evitar a reverberação de erros. A habilidade de auto-monitoramento (evitando fugir das regras do teste), iniciativa e desvios reforçam a idéia de um teste para a função executiva (WATSON, BALOTA, SERGENT-MARSHALL, 2001).

Nesse estudo, nós fomos capazes de identificar um decremento de longo prazo na fluência semântica com a severidade das doenças diarréicas, indicando que outros fatores podem estar também envolvidos. Especialmente, por que o efeito mais severo se restringe à fluência semântica e não a fluência fonética. Esse déficit desproporcional da fluência verbal (fluência semântica mais comprometida em relação à fluência fonética) também é observado em pacientes com doença de Alzheimer (ALBERCA et al, 1999; GOLDBLUM et al, 1998; LAMBON RALPH et al, 2001; MONSCH et al, 1997), mas não nas demências subcorticais (EPKER, LACRITZ,

MUNRO, 1999; GOLDBLUM et al, 1998; LAFOSSE et al, 1997; LAMBON RALPH et al, 2001; MONSCH et al, 1997; ROSSER& HODGES, 1994; SCIARMA et al, 1990; TIERNEY et al, 2001), embora não se constitua num achado universal (NEBES& BRADY, 1988).

Indivíduos com mal de Alzheimer apresentam grande dificuldade para realizar uma variedade de provas semânticas, incluindo nomear objetos, gerar membros de uma dada categoria semântica, codificar atributos semânticos de um estímulo e identificar funções de objetos (MONSCH et al, 1997). Esse padrão de impedimento parece ser atribuído ao comprometimento estrutural do conhecimento semântico (FAMA et al, 2000). Esse defeito não parece estar relacionado apenas com o processo de busca, mas parece envolver um distúrbio do armazenamento da memória cognitiva e comprometimento das vias neurais envolvidas durante o curso da doença (CHAN, BUTTERS, SALMON, 1997). Recentemente, novos achados estruturais e funcionais têm correlacionado a fluência fonética apenas com áreas do lobo prefrontal, enquanto a fluência semântica parece envolver mais fortemente áreas prefrontais e temporais do hemisfério esquerdo (DUNCAN& OWEN, 2000; KITABAYASHI et al, 2001; WARBURTON et al, 1996).

5.2. O déficit cognitivo e o polimorfismo da APOE

Alguns estudos sugerem que a desnutrição e fome podem influenciar na fisiopatologia do mal de Alzheimer e podem interferir no início da doença (HENDERSON et al, 1992; YANAGISAWA et al, 1999). O comprometimento da habilidade linguística na infância pode possuir uma forte relação com a reduzida função cognitiva, o risco de demência do tipo Alzheimer e a baixa expectativa de vida nas últimas décadas de vida (SNOWDON et al, 1996).

A apolipoproteína E (apoE) desempenha um papel crucial no controle da homeostase de lipídios e também participa nos processos de reparação do tecido nervoso (GRAHAM et al, 1999; HUNG et al, 2001; REICH et al, 2001). A apoE é principalmente sintetizada por astrócitos, onde é armazenada juntamente com colesterol e fosfolipídios em complexos de lipídio/proteína, onde são então liberados

para o meio extracelular (LADU et al, 2000). Esses complexos se ligam aos receptores da apoE na superfície das células nervosas, sendo internalizados, servindo de mecanismo para reparo e manutenção das membranas celulares, crescimento de neuritos e sinaptogênese (POIRIER et al, 1993).

A formação de contatos sinápticos representa um processo crítico durante o desenvolvimento cerebral e contribui para a plasticidade de longo-termo no SNC do adulto (LAGERCRANTZ & RINGSTEDT, 2001). Os neurônios do SNC produzem suficiente colesterol para sobreviver e para crescimento, porém a formação de numerosas sinapses mais maduras requer uma quantidade adicional de colesterol que deve ser produzida pela glia. Síntese, transporte e captação do colesterol no SNC pode diretamente interferir na maturação, plasticidade e eficiência dos circuitos neuronais. Novas linhas de evidências indicam que o colesterol produzido pelas células gliais e secretado em complexos de lipoproteína representa o fator glial envolvido na regulação da sinaptogênese (GORITZ et al, 2002).

A ocorrência do alelo $\epsilon 4$ tem sido relacionada com um maior risco para doenças cardiovasculares e aterogênese, pelo aumento dos níveis de LDL-colesterol plasmático e é considerada como um fator de risco genético para o desenvolvimento da doença de Alzheimer de início tardio na maioria dos estudos epidemiológicos ao redor do mundo (CORBO & SCACCHI, 1999; ROSES, 1996). Além disso, o alelo $\epsilon 4$ tem sido relacionado com baixo grau de reabilitação após traumatismo craniano (CRAWFORD et al, 2002; FRIEDMAN et al, 1999) e comprometimento da plasticidade no Sistema Nervoso Central, possivelmente através do ganho de uma nova função, talvez relacionado com um insulto tóxico, de uma forma dose-dependente (TETER et al, 2002). Entretanto, até agora, poucos estudos têm revelado o impacto do alelo $\epsilon 4$ no desenvolvimento e maturação cerebrais. Recentemente, um novo ímpeto em neurociência tem sugerido um efeito protetor do alelo $\epsilon 4$ durante o desenvolvimento embriológico e durante a infância (WRIGHT et al, 2003; ZETTERBERG et al, 2002), apoiando esses achados em crianças com diarreia infantil precoce, com reduzidas condições sanitárias e ambientais.

A melhor performance cognitiva em crianças portadoras do alelo $\epsilon 4$, em relação às crianças do mesmo estudo coorte, com comparável história de diarreia persistente nos primeiros dois anos de vida, pode estar relacionada com o aumento da absorção e distribuição de colesterol para a população neuronal em

desenvolvimento. Numerosos estudos têm mostrado o papel do polimorfismo da APOE no controle do perfil lipídico, mesmo precocemente na infância, sendo que, crianças com fenótipo da apoE4 apresentaram maior absorção do colesterol da dieta do que crianças com fenótipo da apoE3 e elevados níveis de triglicerídios, LDL-colesterol e de apoB (HERRMANN et al, 1994; TAMMI et al, 2000), predominantemente em crianças com reduzido peso ao nascer (GARCES et al, 2002). Além disso, os níveis de colesterol total plasmático podem ser afetados pela elevada morbidade de diarreia, por situação de deficiência nutricional (ETUKUDO et al, 1999; HOUSSAINI et al, 1999).

Embora seja aceito que o colesterol plasmático não pode atravessar a barreira hemato-encefálica, mesmo durante as primeiras fases de desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (a maioria do colesterol é sintetizada *in situ*) (DIETSCHY & TURLEY, 2001), é possível que durante o rápido crescimento neonatal, o conteúdo de colesterol cerebral possa ser modulado pelos níveis de colesterol plasmático, por uma via de sinalização indireta (em resposta a ingestão de colesterol), como sugerido por (BOLEMAN et al, 1998). Os nossos achados apoiam essa hipótese, já que numa situação de deficiência de colesterol dietético, as crianças portadoras do alelo $\epsilon 4$, com maior morbidade de diarreia, preservaram mais eficientemente a habilidade cognitiva, pelo menos nas categorias cognitivas avaliadas nos testes neuropsicológicos utilizados. Ainda assim, nós não podemos eliminar a possibilidade de que a elevada morbidade de diarreia possa ter causado alterações sutis na permeabilidade da barreira hemato-encefálica, principalmente por afetar o balanço oxidativo cerebral (NOSEWORTHY & BRAY, 1998).

Durante a infância, os níveis de triglicerídios e de LDL plasmáticos tendem a serem mais elevados em crianças amamentadas do que em sujeitos desmamados precocemente (OWEN et al, 2002). Porém, não podemos atribuir o melhor rendimento cognitivo nas crianças portadoras do alelo $\epsilon 4$ apenas ao aleitamento materno, já que a duração do aleitamento materno não foi diferente significativamente entre os grupos estudados e porque a performance nos testes cognitivos avaliados não se correlacionou com o tempo de aleitamento (dado não mostrado).

Foi demonstrado que o colesterol dietético pode aumentar a densidade cortical de neurônios apoE imunoreativos ao longo do córtex frontal e hipocampal

no cérebro de coelho, que pode ser acompanhado pelo aumento do trânsito de lipídios e remodelação dos complexos apoE-colesterol (SPARKS et al, 1995). É plausível especular que o aumento da expressão da apoE pode melhorar a disponibilidade de colesterol plasmático para as mesmas áreas do cérebro humano, que, sabidamente, amadurecem mais tardiamente durante a infância e adolescência e também representam as mesmas áreas mais susceptíveis às lesões e que mostram os sinais mais precoces de neurodegeneração (RICE & BARONE S JR, 2000). Além disso, o colesterol da dieta pode também afetar a plasticidade neural, afetando a expressão do gene da mielina (SALVATI et al, 2002).

5.3. APOE e doenças parasitárias

É interessante notar a correlação entre os déficits de fluência semântica, mas não fluência fonética, e a infecção por *Giardia lamblia*. De forma intrigante, a correlação entre giardíase e o número de episódios de diarreia nos primeiros dois anos de idade não prevaleceu em crianças portadores do alelo $\epsilon 4$, sugerindo uma possível proteção contra agentes infecciosos. Recentemente, estudos conduzidos por Wozniak et al, sugerem um benefício do alelo $\epsilon 4$ na hepatite C (WOZNIAK et al, 2002) e susceptibilidade à malária (WOZNIAK et al, 2003). Segundo esses autores, o mecanismo envolvido pode estar relacionado à competição pelo receptor. Indivíduos portadores do alelo $\epsilon 4$ apresentam altos níveis séricos de LDL e baixa expressão de receptores LDL (LDLR). O vírus para hepatite C, por exemplo, pode utilizar o LDLR como via de entrada nas células hepáticas, levando a uma reduzida disseminação do vírus, competindo com o LDL pelo mesmo receptor.

Além disso, em geral, os agentes parasitários não conseguem sintetizar colesterol e ainda podem induzir a formação de anticorpos naturais que, por sua vez, podem metabolizar o colesterol por opsonização ou reduzir os níveis de lipídios circulantes, por inibir a atividade enzimática do sistema colesterol lecitina acetiltransferase dependente (LCAT), dessa forma contribuindo para reduzir os níveis de colesterol sanguíneo. De fato, o trabalho de (DOENHOFF et al, 2002) em

camundongos APOE transgênicos tem confirmado o efeito anti-aterogênico do *Schistosoma mansoni*.

Agentes do tipo giardia ou entamoeba que infectam cerca de 1 bilhão de pessoas anualmente, parasitando o trato intestinal e causando diarreia, má absorção e outros problemas não conseguem sintetizar colesterol e precisam obter colesterol a partir do hospedeiro, utilizando o processo de endocitose mediada por receptor, envolvendo a mesma via de receptor LDL. Um possível mecanismo que interfira na captação do colesterol poderia reduzir a sobrevivência intracelular do parasita em células infectadas. Colesterol, ceramida, fosfatidil colina, esfingomiéline e ácido palmítico são captados pela giardia, para replicação e desenvolvimento em experimentos, utilizando lipídios conjugados com fluorocromos (DAS et al, 2002). Todos esses compostos são importantes no processo de síntese de mielina durante o desenvolvimento das principais redes neurais ao longo dos primeiros dois anos de vida pós-natal (JUREVICS, KIDWAI, MORELL, 1997; MORELL & JUREVICS, 1996). Além disso, a presença de esfingomiéline na membrana plasmática de trofozoítos encistados e não encistados sugere a papel desse lipídio para manter a integridade da superfície de membrana da *Giardia lamblia*, no ambiente do trato intestinal (STEVENS et al, 1997).

O ciclo de vida da giardia apresenta duas formas morfológicamente distintas: trofozoítos e cistos. A doença é causada por trofozoítos com a presença freqüente de episódios de diarreia aguda ou crônica. Os trofozoítos colonizam o intestino delgado superior de hospedeiros e se diferenciam em cistos que, em seguida, são eliminados nas fezes (ADAM, 2001). Lujan e colegas demonstraram que a indisponibilidade de colesterol induz a diferenciação e encistação da *Giardia lamblia* no intestino delgado. Além disso, a adição de colesterol, lipoproteína de baixa densidade e de muita baixa densidade ao meio de cultura inibe a expressão de proteínas da parede cística, geração de vesículas císticas e por fim a biossíntese da parede do cisto (LUJAN et al, 1996).

Num estudo recente desse mesmo projeto coorte do Gonçalves Dias, Newman e colaboradores mostraram que em 157 crianças acompanhadas por cerca de 3 meses, 43 (27,4%) estavam infectadas por Giardia, sendo que a infecção era mais comum em crianças com diarreia persistente (20,6%), em relação às crianças que tiveram diarreia aguda (7,6%), dessa forma confirmando a alta

prevalência dessa infecção nessa comunidade e sua relação com uma substancial morbidade nos primeiros anos de vida (NEWMAN et al, 2001).

Portanto, postulamos que os indivíduos portadores do alelo $\epsilon 4$ podem apresentar uma proteção contra giardíase por apresentarem mais altos níveis de colesterol e dessa forma exibindo *down regulation* de receptores LDL e aumento da competição pelo mesmo receptor LDLR. Destarte, reduzindo a captação de colesterol pelo parasita, a virulência dos trofozoítos e estimulando a diferenciação e encistação intestinal e ainda desviando o pool de colesterol utilizado pela carga de infestação parasitária para o cérebro em desenvolvimento, durante o período crítico de mielinização e sinaptogênese.

Nesse estudo coorte, identificamos um impedimento desproporcional na fluência semântica em crianças da comunidade Gonçalves Dias, com alta morbidade de diarreia nos primeiros dois anos de idade (Patrick et al, no prelo). Paradoxalmente, documentamos uma ação protetora do alelo E4 na fluência semântica, mas não na fluência fonética, sugerindo diferentes papéis da APOE4 durante o desenvolvimento e envelhecimento. Além disso, nossos achados com o teste de coding, um teste cognitivo geralmente associado com memória de trabalho, mas que também parece requerer a memória de longo prazo semântica (GREENWALD et al, 2003), reforça a vantagem das crianças portadoras do alelo E4 com alta morbidade de diarreia, no sentido de realizar tarefas lingüísticas e categóricas.

Por outro lado, as crianças portadoras da APOE4 podem apresentar níveis plasmáticos elevados de LDL e com isso apresentar um acúmulo hepático, *down-regulating* os receptores LDL no fígado e aumentando a competição pelo receptor. O crescimento neonatal ou fetal comprometido pode ainda contribuir com um reduzido desenvolvimento hepático, podendo contribuir ainda mais para reduzir a população de receptores no fígado, possivelmente interferindo no programa genético da expressão do receptor (BARKER et al, 1993; HARDY & KLEINMAN, 1994). Portanto, apesar das vantagens no desempenho cognitivo na infância, essas crianças portadoras do alelo $\epsilon 4$ estariam num grupo de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas nas últimas décadas de vida, (principalmente em relação ao risco de adquirir a doença de Alzheimer) e doenças cardiovasculares com alterações no perfil da dieta e consumo calórico, juntamente

com pouco exercício durante a vida adulta. Recentemente, achados de (MOCERI et al, 2000) reforçam a importância das relações genéticas-ambientais durante o início da vida e o risco de desenvolver o mal de Alzheimer.

5.4. Substrato anatômico da memória semântica

A fluência verbal (fonética e semântica) é considerada um importante componente do conjunto de testes neuropsicológicos para avaliar funções executivas e a integridade dos sistemas de linguagem (BALDO & SHIMAMURA, 1998; RUFF et al, 1997). A performance tanto na fluência semântica (fluência categórica) ou na fluência fonética (fluência da palavra ou léxica) tem sido utilizada com sucesso como índice medidor da integridade do lobo frontal (a região do cérebro envolvida no controle das funções executivas) em vários estudos neuropsicológicos e de neuroimagem (JURADO et al, 2000; RICCI et al, 1999; RIVA, NICHELLI, DEVOTI, 2000; THOMPSON-SCHILL et al, 1998). Uma excelente revisão do papel dos lobos frontais no controle das funções executivas corticais foi feita por Royall et al, 2002.

No teste mais comum de fluência semântica, o pesquisador simplesmente pede para a criança dizer o maior número de palavras pertencentes a uma determinada categoria, como animais ou frutas em um intervalo de 1 minuto. Por outro lado, no teste de fluência fonética, o pesquisador pede que a criança diga o maior número de palavras começadas com uma letra específica em um teste de 1 minuto. Dessa forma, os testes de fluência requerem uma elaborada busca de palavras a partir da memória conceitual (semântica) e léxica (fonética), recrutando áreas específicas cerebrais em um período restrito de tempo. Esse processo de busca utiliza circuitos neurais sensório-motores, conectando domínios corticais e subcorticais do cérebro, no intuito de ter acesso e decodificar os estoques de memória remota, que são continuamente moldados e organizados num padrão hierárquico, exigindo um processo de plasticidade funcional e estrutural permanente (FUNAHASHI, 2001).

Curiosamente, a demanda da ação executiva cresce com o aumento do grau de dificuldade durante o processo de busca na fluência verbal, isto é, a habilidade de escolher corretamente (sem quebrar as regras do teste) uma lista

seleta de palavras, requer maior planejamento, monitoramento, julgamento e tomada de decisão e, ao mesmo tempo, também requer que um controle inibitório gerenciando o padrão de escolha e precisão nas respostas, no sentido de evitar a informação (vocabulário) que não é relevante para o teste (EWING-COBBS et al, 1998).

Com o propósito de selecionar palavras-alvo da memória, se faz necessária uma estratégia de busca mais refinada, tornando o teste mais difícil, conseqüentemente, os testes de fluência verbal, nessas circunstâncias, passam a depender de um sistema de controle executivo mais operacional e eficiente, ajudando, dessa forma, a diferenciar os déficits cognitivos entre os grupos da pesquisa. Além disso, os diferentes graus de dificuldade podem discriminar a função de busca e acesso dos déficits de memória. Por exemplo, palavras na categoria de ocupação (usado no teste de fluência semântica) ou então palavras iniciadas com uma letra *S* (fluência fonética) são consideradas mais difíceis de identificar no Português do que nome de animais ou de palavras começando com a letra *F*, respectivamente, onde a reserva de vocabulário é mais limitada, pela reduzida disponibilidade, destarte, exigindo maior atenção e controle executivo (ROHRER et al, 1999). Impedimentos na performance da fluência semântica podem estar relacionados ao declínio da função executiva (falta de um gerenciamento contínuo do processo de busca) ou um comprometimento do conhecimento semântico (defeito da memória conceitual/semântica e/ou redução das reservas da memória).

Nos testes de fluência fonética, as palavras são selecionadas sem uma complexa busca de significado. Por outro lado, no teste de fluência semântica, o conhecimento do significado das palavras é crítico para a execução do teste, porque as palavras precisam ser agrupadas em categorias, de acordo com o significado conceitual e propriedades semânticas. Esse padrão de déficit semântico é visto em pacientes com doença de Alzheimer (CHAN, BUTTERS, SALMON, 1997; FAMA et al, 2000; LAATU et al, 2003; LAFOSSE et al, 1997; TIERNEY et al, 2001).

O neocórtex temporal, especificamente seu aspecto posterior, é considerado o substrato anatômico da memória semântica, enquanto o lobo frontal (especialmente, o córtex frontal esquerdo) e as vias neurais fronto-corticais estão implicados nas ações de busca (BARR& BRANDT, 1996; MARTIN et al, 1994).

Além disso, a fluência semântica parece requerer um mais extenso e difuso sistema de redes neurais do que a fluência fonética, desde que o discurso semântico é mais comprometido após lesão axonal difusa (WALLESCH et al, 2001).

Na doença de Alzheimer, ocorre um impedimento desproporcional na fluência semântica (categórica), mas não na fluência fonética (léxica), o que significa que a memória conceitual e sua representação nas regiões corticais são seriamente afetadas (LAMBON RALPH et al, 2001; WATSON, BALOTA, SERGENT-MARSHALL, 2001). O processo de busca, no qual depende a ativação dos lobos frontais, não é comprometido no mesmo nível (DUKE& KASZNIAK, 2000; ROHRER et al, 1995), explicando porque a fluência fonética não é igualmente comprometida. Por outro lado, na demência devido à doença de Parkinson e Huntington, que é caracterizada por um amplo comprometimento subcortical, o processo de busca é afetado, levando ao declínio comparável da performance semântica e fonética, porque o acesso à informação é uma via obrigatória para atingir os pools de memória verbal (ROHRER et al, 1999), ver **Figuras 38 e 39**.

Em nossos estudos com crianças da comunidade Gonçalves Dias, acompanhadas desde o nascimento, a partir de um projeto coorte, nós identificamos além de déficits no desenvolvimento físico, também déficits cognitivos avaliados nos testes de Coding, TONI III e fluência verbal total, juntamente com declínio no desempenho escolar em crianças com 6-12 anos de idade, com histórico de alta morbidade de diarreia nos primeiros dois anos de vida (GUERRANT et al, 1999; GUERRANT et al, 2002b; NIEHAUS et al, 2002).

Além disso, quando avaliamos domínios cognitivos de linguagem e função executiva, constatamos que a fluência semântica (mas não a fluência fonética) foi seletivamente comprometida nessas crianças (Patrick et al, no prelo). Em contrapartida, crianças, com história de alta morbidade de diarreia e diarreia persistente, não apresentaram deficiências na fluência fonética, já que atingiram uma performance semelhante com a das crianças sem história de alta morbidade de diarreia e diarreia persistente, alcançando escores pelo menos comparáveis às crianças saudáveis da mesma faixa etária, de acordo com um recente estudo italiano dos aspectos de desenvolvimento da habilidade verbal (RIVA, NICHELLI, DEVOTI, 2000).

Além disso, escores de fluência semântica, mas não os de fluência fonética, correlacionaram negativamente com a morbidade de diarreia nos primeiros dois anos de vida. Embora, essa correlação tenha sido significativa, os valores dos coeficientes de Pearson revelaram que essa variável é responsável por cerca de 8% da variância, sugerindo que outros fatores ambientais e genéticos possam ser relevantes para causalidade, influenciando a variável independente estudada (performance cognitiva).

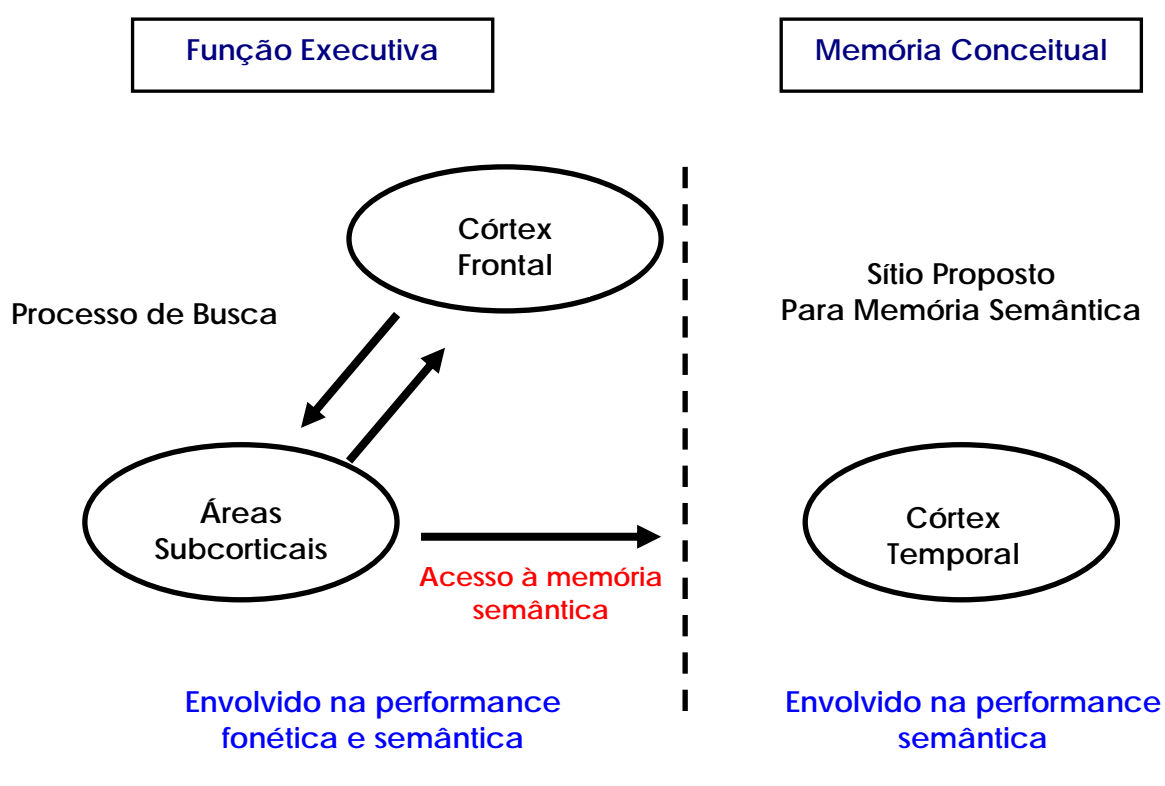
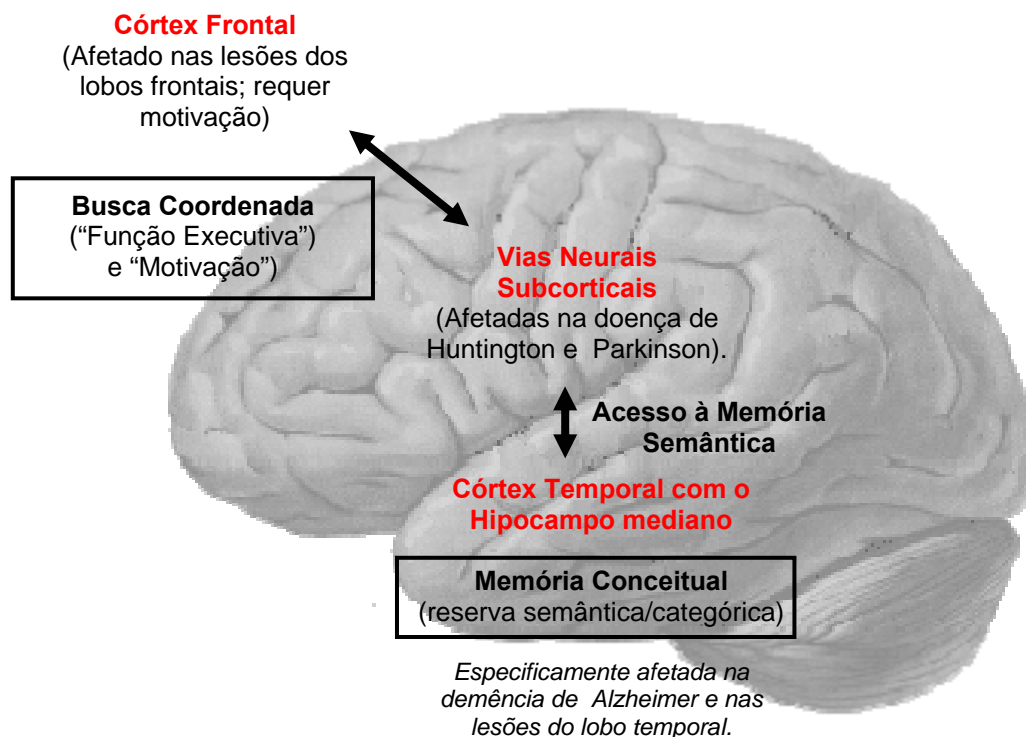


Figura 38: Diagrama esquemático do controle da função executiva e memória semântica. Notar que o córtex frontal e áreas subcorticais são necessários para o acesso da memória semântica (memória conceitual), incluída no substrato do lobo temporal.



Função	Busca Coordenada ("Função Executiva" e "Motivação")	Memória Conceitual (Reserva Semântica/Categórica)
Sítio	Córtex Frontal Vias Neurais Subcorticiais	Córtex Temporal (com o Hipocampo)
Doenças	Doenças de Huntington/Parkinson Lesões do Lobo Frontal e Áreas Subcorticiais	Doença de Alzheimer Lesões do Lobo Temporal ? Diarréia Infantil
Teste(s)	Performance Fonética e Semântica	Somente Performance Semântica

Figura 39: Diagrama das áreas neuroanatômicas envolvidas no armazenamento e acesso da memória semântica, requeridas durante os testes de fluência verbal e um modelo proposto para o efeito da diarréia e desnutrição.

O déficit desproporcional dos escores de fluência verbal, afetando principalmente a fluência semântica em comparação com a fluência fonética, em crianças com história de alta morbidade de diarreia, não parece ser relacionado com diferenças no vocabulário dos grupos estudados, já que ambos os grupos possuíam um mesmo perfil de escolaridade e faixa etária. Além disso, as mães apresentavam um comparável grau de instrução (quase uniformemente < 8ª série) em ambos os grupos, não apresentando correlação com os resultados do teste de fluência verbal.

Curiosamente, o déficit semântico nas crianças com maior severidade de diarreia correlacionou negativamente com a infecção por *Giardia lamblia*, mas não com outros parasitas, sugerindo que a giardíase poderia especificamente comprometer o desenvolvimento cognitivo ou servir de importante indicador da contaminação ambiental que poderia afetar a função cognitiva, como postulado por BERKMAN, 2002.

Evidências que apoiam a elegibilidade do teste de fluência semântica, para avaliar os efeitos da desnutrição no desenvolvimento cognitivo, vieram do grupo de Grantham-Mcgregor e Simeon (CHANDLER et al, 1995; SIMEON, 1998), que estudaram o impacto de curto prazo dos programas de merenda escolar na performance cognitiva de crianças. Esses autores observaram um déficit primário na capacidade motivacional da criança desnutrida, sendo que a lassidão (falta de energia) está relacionada não apenas com a atividade física, mas também com o esforço mental e com o comportamento (KVALSVIG, COOPAN, CONNOLLY, 1991).

Nos estudos de Grantham-Mcgregor relacionando a performance cognitiva de crianças em idade escolar e a infestação parasitária por *Trichuris trichura*, esses autores observaram que o teste de fluência semântica foi um dos três testes neuropsicológicos que foi consistentemente afetada em crianças infectadas, em comparação com as crianças não infectadas. Os outros testes foram "busca visual" e "aprendizagem pareada", este último sendo um teste de vocabulário em língua francesa (GARDNER, GRANTHAM-MCGREGOR, BADDELEY, 1996). Esses investigadores também descreveram melhora na fluência semântica em um subgrupo de crianças tratadas com terapia anti-helmíntica (NOKES et al, 1992), embora esse achado não foi replicado em outro subgrupo de crianças com moderada carga de infestação (SIMEON, GRANTHAM-MCGREGOR, WONG, 1995). A

variabilidade da performance semântica, por causa de intervenções nesses estudos, poderia ser consequência das diferenças na motivação entre esses grupos, como foi especulado por esses autores, levando ao melhor desempenho na função executiva.

O teste de fluência é iniciado por um estímulo auditivo, mas também envolve um mecanismo de auto-controle para iniciar e manter um processo mental na ausência de qualquer referência externa (pista). A tarefa é, portanto, auto-dirigida, requerendo motivação e auto-controle, dessa forma, reforçando a idéia de sua maior eficácia discriminativa (sobre a maioria dos outros testes) em diagnosticar o impedimento da função executiva sob influência da diarreia, infecções entéricas e desnutrição.

Os mecanismos envolvidos no déficit semântico, vistos em um subgrupo de crianças com história de alta morbidade de diarreia nos primeiros dois anos de vida, são até agora pouco conhecidos. Entre essas possibilidades, um evento inicial poderia perturbar o desenvolvimento da rede neural relacionada com a linguagem, como recentemente postulado por (LEVIN et al, 2001). As crianças possuem uma maior ativação frontal do que adultos, especialmente antes do meio da infância (BOOTH et al, 2003; TAMM, MENON, REISS, 2002), dessa forma, dependendo mais das mudanças estruturais e funcionais ao longo do tempo, que, caso sejam comprometidas, poderia predispor a impedimentos. Contudo, nossos achados em que a fluência fonética não foi alterada (como a fluência semântica o foi) sugerem que as vias neurais fronto-subcorticais não foram primariamente afetadas.

Por outro lado, a lesão hipocampal foi considerada um fator de detrimento em pacientes com epilepsia do lobo temporal direito na performance da fluência semântica mas não da fluência fonética, sugerindo um papel crítico da estrutura do hipocampo na performance da primeira (GLEISSNER& ELGER, 2001). Além disso, novas evidências têm apontado para a importância da função hipocampal no estabelecimento das associações categóricas (HENKE et al, 1999). Já se é bem conhecido que o hipocampo, uma estrutura altamente plástica durante o desenvolvimento, é fortemente afetado pela desnutrição precoce (BRONZINO et al, 1997; CIARONI et al, 2002; LEVITSKY& STRUPP, 1995). Estudos recentes têm mostrado que a proliferação celular e apoptose (KIM et al, 2001) e alterações de

comportamento (FUKUDA, FRANCOLIN-SILVA, ALMEIDA, 2002; LUKOYANOV & ANDRADE, 2000), são afetadas pelo envolvimento do hipocampo na desnutrição experimental. Além disso, o processo de plasticidade no hipocampo é considerado particularmente vulnerável às alterações do metabolismo da glicose e hipotermia induzida pela fome (PLANEL et al, 2004; YANAGISAWA et al, 1999) e a deficiência de alguns importantes nutrientes que poderiam predispor à doença neurodegenerativa tardiamente. As mesmas proteínas que estão envolvidas na fisiopatologia de doença de Alzheimer, como a proteína precursora do amilóide e as presenilinas, também participam da construção das redes neuronais e na plasticidade sináptica no hipocampo imaturo (RIBAUT-BARASSIN et al, 2003).

Embora a questão motivacional seja uma importante variável influenciando a performance semântica, o padrão de impedimento específico, observado em crianças brasileiras da favela Gonçalves Dias, parece estar relacionado com o déficit da memória semântica. Esse efeito é sugerido pela ausência proporcional do déficit fonético em crianças coortes com elevada morbidade de diarreia. Caso a representação desse conhecimento conceitual for especificamente comprometida, isso representaria uma forma identificável de "lesão cerebral", devido aos episódios de diarreia e desnutrição nos primeiros anos de vida, um período reconhecidamente sensível de rápido desenvolvimento cerebral e plasticidade.

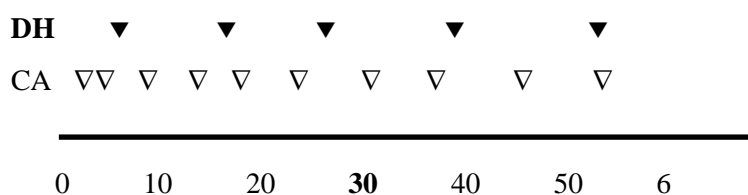
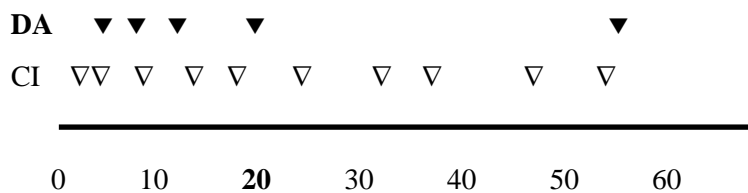
5.5. Perspectivas

Para que seja possível avaliar o grau do comprometimento da reserva de memória semântica seria necessário avaliar a metodologia do teste. De acordo com Roher et al (ROHRER et al, 1999), um modelo de teste para avaliar o papel da memória semântica incluiria simplesmente a cronometragem da lista de palavras (agrupadas em categorias) ditas em 1 minuto. Quando a reserva semântica é limitada (ex. Atrofia cortical), os sujeitos concentram as respostas nos primeiros quartis do teste, depletando a reduzida reserva de palavras na memória, dessa forma, reduzindo a frequência de respostas nos últimos quartis do teste. O mesmo

padrão de respostas é observado na demência do tipo Alzheimer, mas não na demência de origem subcortical, onde o processo de busca (mas não a memória semântica) é profundamente bloqueado, que permite uma maior simetria do padrão de respostas durante o período do teste, embora com número reduzido de palavras, **Figura 40**.

Ainda, as novas estratégias do uso de eletroencefalogramas (EEG) e análise de imagens (Tomografia por emissão de pósitrons, PET scan e ressonância magnética funcional MRI_f) durante o desenvolvimento poderiam ilustrar alterações sutis de neuroplasticidade e mudanças de conformação dos substratos neuroanatômicos da fluência semântica, correlacionando com os episódios de diarréia, valores antropométricos.

A



Tempo de Busca (s)

B

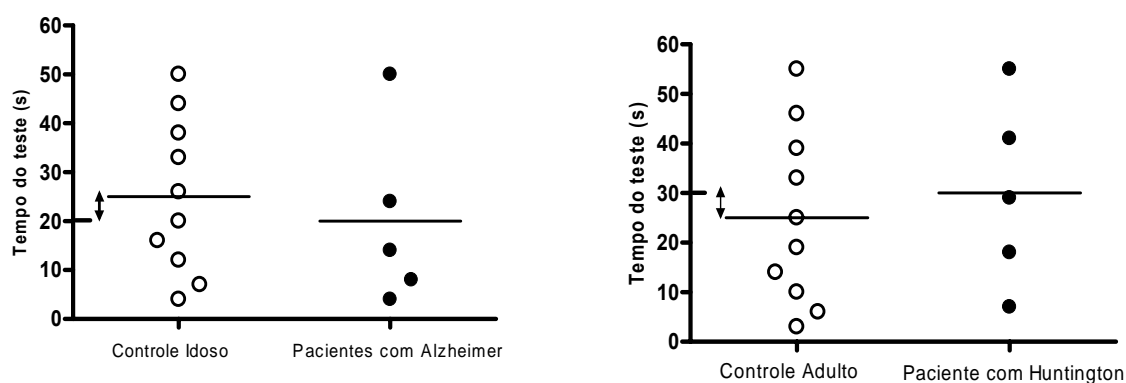


Figura 40: A e B. Latência de respostas idealizadas em um teste de fluência semântica em pacientes com doença de Alzheimer (DA), doença de Huntington (DH) e seus controles (CI=controle idoso; CA= controle adulto). Os dados de demência são representados por pontos sólidos. Os números em negrito (A) e linhas horizontais (B), ao longo do eixo das abscissas, indicam valores da média da latência das respostas. As duplas setas (B) indicam as diferenças entre médias (adaptado de Rohrer, Wixted, and Paulsen, 1999).

Em outras palavras, pacientes com demência subcortical apresentam uma reduzida busca de palavras, contudo, com respostas mais uniformemente distribuídas durante o período de 1 minuto do teste. Caso este mesmo padrão se repita em crianças com história de alta morbidade de diarreia, isso apontaria para um defeito da função executiva, contudo, caso o padrão fosse o mesmo dos pacientes com Alzheimer, isso sugeriria um defeito primário da memória. Déficits lingüísticos precoces na infância são considerados fortes fatores preditivos de distúrbios cognitivos nas últimas décadas de vida (SNOWDON et al, 1996).

Além disso, novas estratégias de bioestatística multidimensional para o teste de fluência estão agora disponíveis, sendo especialmente valiosos para esclarecer outros aspectos do domínio cognitivo da fluência verbal, pela análise da estrutura seqüencial e composição das respostas individuais e pela construção de mapas do perfil de respostas em categorias, em diferentes grupos de estudo (SCHWARTZ et al, 2003).

5.6. O alelo APO ϵ 4 preserva a fluência semântica em crianças com elevada morbidade de diarreia: Um fator de sobrevivência?

Nesse estudo, nós documentamos que crianças com elevada morbidade de diarreia portadores do alelo APO ϵ 4, o mesmo gene associado com o maior risco de desenvolver o mal de Alzheimer de início tardio, apresentaram melhor performance cognitiva aos 6-12 anos de idade nos escores de Coding do WISC-III, em comparação com crianças com similar morbidade de diarreia, mas sem apresentarem alelos do APO ϵ 4, mesmo após controlar por diferentes fatores sócio-demográficos. Além disso, o grupo positivo para APO ϵ 4 teve a fluência semântica preservada (mas não a fluência fonética). Além disso, as crianças com elevada morbidade de diarreia e com o alelo APO ϵ 4 tiveram preservado o coeficiente da diferença média dos escores de fluência verbal (DIFF), um coeficiente padrão do comprometimento da fluência verbal. Esses achados, pela primeira vez, mostram que o alelo APO ϵ 4 é relativamente comum em crianças faveladas e sugerem um papel protetor. Esses resultados (não esperados) sugerem um benefício desse alelo,

como um fator de sobrevivência sob estresse ambiental da diarreia infantil, portanto apontando para seu papel crítico durante os processos de desenvolvimento e envelhecimento (WRIGHT et al, 2003). Esses resultados também sugerem que o alelo APO ϵ 4, assim como o gene que codifica a hemoglobina de hemácias falciformes (HbSA), que protege contra malária, o alelo APO ϵ 4 representaria “um polimorfismo balanceado” que assegura proteção contra os déficits cognitivos devido à diarreia infantil, contudo adicionaria um risco aumentado para um processo neurodegenerativo tardio.

As forças evolucionárias movidas por uma dieta mais rica e maior expectativa de vida retêm o alelo APO ϵ 3, como o alelo mais freqüente no mundo, pelo seu efeito protetor no final da vida. Para essas mesmas forças, o alelo APO ϵ 4 seria deletério, por causa da sua associação com o risco aumentado para doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Entretanto, o alelo APO ϵ 4 permanece relativamente freqüente em certos grupos populacionais (por exemplo, sua freqüência pode alcançar cerca de 30-40% em alguns países africanos, onde as doenças infecciosas e a diarreia infantil prevalecem (CORBO & SCACCHI, 1999; GERDES, 2003), sugerindo um efeito protetor e de sobrevivência.

Nossos resultados oferecem uma explicação potencial para a persistência do alelo APO ϵ 4 no nosso genoma e sua provável vantagem seletiva através da história, afetada pelas doenças parasitárias e diarreicas, relacionada com problemas de higiene e sanitário, que acompanharam o estabelecimento da civilização ocidental.

Em suma, nós documentamos um potencial efeito protetor do alelo ϵ 4 no desenvolvimento cognitivo de crianças em áreas urbanas pobres (favela) de Fortaleza, com história de alta morbidade de diarreia infantil, possivelmente por causa do aumento dos níveis de colesterol plasmáticos e por influenciar a expressão de receptores de LDL no fígado. Embora com uma amostra restrita, nossos resultados sugerem um possível benefício do alelo ϵ 4 numa situação de risco de vida por causa da severidade de doenças diarreicas na infância, e serve de referência para outros estudos mais conclusivos e refinados para investigar a influência dos polimorfismos da APOE na plasticidade cerebral e sinaptogênese, sob condições de estresse ambiental. Outros desenhos de pesquisa mais sofisticados são necessários para avaliar a influência de outros fatores ambientais relevantes,

como o efeito de neurotoxinas (ex. intoxicação por chumbo) pode afetar esses resultados.

Esse estudo pela primeira vez documentou um comprometimento desproporcional da fluência semântica, do tipo Alzheimer *símile*, em crianças de áreas urbanas pobres de Fortaleza, com história de diarreia persistente nos primeiros 2 anos de vida. Entretanto, os mecanismos e substratos estruturais e funcionais, relacionados com o declínio da fluência semântica, ainda esperam por uma investigação mais criteriosa. Além disso, um outro estudo prospectivo mais amplo e mais bem planejado é necessário para definir os aspectos de desenvolvimento observados. Esse trabalho também reforça a sensibilidade do teste de fluência verbal (especialmente a fluência semântica) para avaliar déficits cognitivos determinados por desbalanços nutricionais na diarreia infantil precoce. Portanto, nossos achados abrem uma nova oportunidade para investigar como as curvas do desenvolvimento lingüístico em crianças desnutridas podem influenciar o rendimento escolar, sociabilidade, comportamento e outros fatores relevantes para o desenvolvimento cognitivo saudável.

Funções executivas corticais são importantes para o estabelecimento da autonomia do indivíduo. O impedimento dessas funções pode determinar dificuldades comportamentais e emocionais, assim como, predispor a desordens neuropsiquiátricas (HERNANDEZ et al, 2002; ROYALL et al, 2002). Essas operações bem elaboradas são processos essenciais na vida diária para planejamento, antecipação, julgamento, tomada de decisões e articulação dos processos de adaptação para novas situações e constantes mudanças ambientais. Declínios potenciais no controle executivo dessas funções podem levar a falta de adaptação em situações de estresse e riscos (FUNAHASHI, 2001). Nossos resultados ilustram o papel potencial da fluência semântica, como referência da integridade dos sistemas de linguagem, e chamam a atenção de que essas crianças com história de diarreia infantil grave, nos primeiros dois anos de vida, podem sofrer impedimentos cognitivos de longo-prazo que são cruciais para o desenvolvimento normal de adultos produtivos e bem adaptados para o mercado de trabalho.

Os estudos do Dr. Aldo Lima em colaboração com o Dr. Richard Guerrant têm mostrado uma associação direta da diarreia infantil precoce com déficits duradouros de crescimento, ilustrado pelo valores de HAZ altura por idade

(GUERRANT RL, 2003; LIMA et al, 2000; MOORE et al, 2001). De fato, os escores de HAZ, aos dois anos de idade, têm-se mostrado um consistente marcador dos déficits causados pela diarreia infantil precoce, sendo um excelente predisponente dos distúrbios tardios do desempenho cognitivo e físico (ABBOTT et al, 1998; BERKMAN et al, 2002; DILLINGHAM& GUERRANT, 2004).

Nesse estudo em crianças com história de diarreia precoce, nós demonstramos a sensibilidade do teste de fluência semântica como indicador dos defeitos cognitivos, podendo servir como um modelo simples, prático e de baixo custo para avaliar o desenvolvimento cognitivo em crianças sujeitas à desnutrição e diarreia, em países pobres. Assim como os valores de HAZ servem de marcador para declínio físico, os escores de fluência semântica podem oferecer um método simples e de fácil execução (facilmente aplicável no campo), com intuito de identificar crianças em grupos de risco para intervenções. Nossos resultados sugerem que os déficits cognitivos tardios decorrentes das doenças diarreicas, se assemelham ao perfil cognitivo da doença de Alzheimer, e reforçam a vantagem evolutiva do alelo APO ϵ 4 para sobrevivência, parcialmente explicando sua permanência no nosso pool genético.

Esse estudo pode servir como ferramenta para o desenvolvimento de novas políticas públicas, com propósito de identificar, planejar e estabelecer precocemente intervenções sustentadas, na área social, e de saúde pública, para prevenção das doenças diarreicas na infância e suas terríveis conseqüências para o desenvolvimento.

6. CONCLUSÃO

Dessa forma, concluímos:

1. O comprometimento desproporcional nos escores de fluência semântica (em relação à fluência fonética) em crianças com elevada morbidade de diarreia, nos primeiros dois anos de vida, ratifica a sensibilidade/utilidade do teste para avaliar o decremento cognitivo em crianças com história de diarreia e desnutrição.
2. O déficit desproporcional da fluência semântica sugere que as crianças afligidas por alta morbidade por diarreia exibiram perda da memória conceitual semântica (do tipo Alzheimer-símile), por causa da diarreia/desnutrição nos formativos primeiros dois anos de vida.
3. Identificamos uma relativa alta frequência do APO ϵ 4 (14% vs 9-11%, esperado) nas crianças da comunidade do Gonçalves Dias, Fortaleza, Nordeste do Brasil.
4. Identificamos uma mais alta frequência do alelo APO ϵ 4 (18%) em crianças com baixa morbidade de diarreia nos primeiros dois anos de vida, em comparação com crianças do estudo coorte, com maior morbidade de diarreia nos primeiros dois anos de vida (11%).
5. As crianças portadoras do alelo APO ϵ 4, que tiveram alta morbidade por diarreia infantil (\geq mediana de 7 episódios nos primeiros dois anos de idade), apresentaram significativamente uma melhor performance no teste de Coding do WISC ($p=0,011$), quando comparado com crianças APO ϵ 4 negativas com similar morbidade de diarreia.
6. O grupo portador do alelo APO ϵ 4, com elevada morbidade por diarreia, preservou a fluência semântica (que foi profundamente comprometida em todas as crianças com história de diarreia, mais predominantemente em crianças APO ϵ 4 negativas, $p<0,01$), e a diferença média dos escores de

fluência verbal (DIFF), $p=0,025$, um coeficiente padronizado do déficit desproporcional da fluência verbal.

7. Nossos resultados sugerem um papel protetor do alelo $\epsilon 4$ em crianças com história de elevada morbidade por diarreia nos primeiros dois anos de idade.

Referências Bibliográficas

1. ABBOTT, R. D. et al. Height as a marker of childhood development and late-life cognitive function: the Honolulu-Asia Aging Study. *Pediatrics*, v.102, n.3 Pt 1, p.602-609,1998.
2. ADAM, R. D. Biology of Giardia lamblia. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.14, n.3, p.447-475,2001.
3. ADDYA, K.; WANG Y. L.;LEONARD D. G. Optimization of Apolipoprotein E Genotyping. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, v.2, n.4, p.271-276,1997.
4. ALBERCA, R. et al. [Verbal fluency and Alzheimer's disease]. *Neurologia*, v.14, n.7, p.344-348,1999.
5. ALMEIDA, O. P.; SHIMOKOMAKI C. M. Apolipoprotein E4 and Alzheimer's disease in Sao Paulo-Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.*, v.55, n.1, p.1-7,1997.
6. ALMEIDA, S. S.; TONKISS J.;GALLER J. R. Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. *Neurosci. Biobehav. Rev*, v.20, n.3, p.389-402,1996.
7. ANDERSON, V. Assessing executive functions in children: biological, psychological, and developmental considerationst. *Pediatr. Rehabil.*, v.4, n.3, p.119-136,2001.
8. ARENDT, T. et al. Plastic neuronal remodeling is impaired in patients with Alzheimer's disease carrying apolipoprotein epsilon 4 allele. *J. Neurosci.*, v.17, n.2, p.516-529,1997.
9. BALDO, J. V.; SHIMAMURA A. P. Letter and category fluency in patients with frontal lobe lesions. *Neuropsychology.*, v.12, n.2, p.259-267,1998.
10. BALLERINI, S. et al. Apolipoprotein E genotyping: a comparative study between restriction endonuclease mapping and allelic discrimination with the LightCycler. *Clin. Chim. Acta*, v.317, n.1-2, p.71-76,2002.

11. BARKER, D. J. et al. Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life. *BMJ*, v.307, n.6918, p.1524-1527,1993.
12. BARR, A.; BRANDT J. Word-list generation deficits in dementia. *J Clin Exp. Neuropsychol.*, v.18, n.6, p.810-822,1996.
13. BARRES, B. A.; SMITH S. J. Neurobiology. Cholesterol--making or breaking the synapse. *Science*, v.294, n.5545, p.1296-1297,2001.
14. BASSETT, C. N. et al. Cerebrospinal fluid lipoproteins in Alzheimer's disease. *Microsc. Res. Tech.*, v.50, n.4, p.282-286,2000.
15. BEFFERT, U. et al. Apolipoprotein E and beta-amyloid levels in the hippocampus and frontal cortex of Alzheimer's disease subjects are disease-related and apolipoprotein E genotype dependent. *Brain Res.*, v.843, n.1-2, p.87-94,1999.
16. BEFFERT, U. et al. The neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimer's disease. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, v.27, n.2, p.119-142,1998.
17. BELLINGER, D. et al. Low-level lead exposure, social class, and infant development. *Neurotoxicol. Teratol.*, v.10, n.6, p.497-503,1988.
18. BERGER-SWEENEY, J.; HOHMANN C. F. Behavioral consequences of abnormal cortical development: insights into developmental disabilities. *Behav. Brain Res.*, v.86, n.2, p.121-142,1997.
19. BERKMAN, D. S. et al. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet*, v.359, n.9306, p.564-571,2002.
20. BOLEMAN, S. L. et al. Pigs fed cholesterol neonatally have increased cerebrum cholesterol as young adults. *J Nutr.*, v.128, n.12, p.2498-2504,1998.
21. BOOTH, J. R. et al. Neural development of selective attention and response inhibition. *Neuroimage.*, v.20, n.2, p.737-751,2003.

22. BRONZINO, J. D. et al. Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal long-term potentiation in freely moving rats. *Exp. Neurol.*, v.148, n.1, p.317-323,1997.
23. CAMERON, H. A.; HAZEL T. G.; MCKAY R. D. Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J. Neurobiol.*, v.36, n.2, p.287-306,1998.
24. CARVALHO, F. M. et al. Erythrocyte protoporphyrin versus blood lead: relationship with iron status among children exposed to gross environmental pollution. *Environ. Res.*, v.71, n.1, p.11-15,1995.
25. CASTELLI, P. Estudios de la asociación genética de la apolipoproteína E con la longevidad, el deterioro cognoscitivo y la demencia. *Salud Mental*, v.21, n.6, p.43-49,1998.
26. CERHAN, J. H. et al. Diagnostic utility of letter fluency, category fluency, and fluency difference scores in Alzheimer's disease. *Clin. Neuropsychol.*, v.16, n.1, p.35-42,2002.
27. CHAN, A. S.; BUTTERS N.; SALMON D. P. The deterioration of semantic networks in patients with Alzheimer's disease: a cross-sectional study. *Neuropsychologia*, v.35, n.3, p.241-248,1997.
28. CHANDLER, A. M. et al. School breakfast improves verbal fluency in undernourished Jamaican children. *J Nutr.*, v.125, n.4, p.894-900,1995.
29. CHECKLEY, W. et al. Effects of nutritional status on diarrhea in Peruvian children. *J Pediatr.*, v.140, n.2, p.210-218,2002.
30. CIARONI, S. et al. Neural precursor proliferation and newborn cell survival in the adult rat dentate gyrus are affected by vitamin E deficiency. *Neurosci. Res.*, v.44, n.4, p.369-377,2002.
31. COOPER, J. A.; HOWELL B. W. Lipoprotein receptors: signaling functions in the brain? *Cell*, v.97, n.6, p.671-674,1999.
32. CORBO, R. M.; SCACCHI R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele? *Ann. Hum. Genet.*, v.63 (Pt 4), p.301-310,1999.

33. CRAWFORD, F. C. et al. APOE genotype influences acquisition and recall following traumatic brain injury. *Neurology*, v.58, n.7, p.1115-1118,2002.
34. CROWE, S. F. Decrease in performance on the verbal fluency test as a function of time: evaluation in a young healthy sample. *J Clin Exp Neuropsychol.*, v.20, n.3, p.391-401,1998.
35. DAS, S. et al. Lipid metabolism in mucous-dwelling amitochondriate protozoa. *Int. J Parasitol.*, v.32, n.6, p.655-675,2002.
36. DE ANDRADE, F. M. et al. Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.33, n.5, p.529-537,2000.
37. DEPREZ, P. N. La enfermedad de Alzheimer y el rol de la apolipoproteína E. *Rev Psiq Clínica*, v.31, n.n. 2, p.157-169,1994.
38. DESCH, L. W.; ANDERSON S. K.; SNOW J. H. Relationship of head circumference to measures of school performance. *Clin. Pediatr. (Phila)*, v.29, n.7, p.389-392,1990.
39. DIETSCHY, J. M.; TURLEY S. D. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr. Opin. Lipidol.*, v.12, n.2, p.105-112,2001.
40. DILLINGHAM, R.; GUERRANT R. L. Childhood stunting: measuring and stemming the staggering costs of inadequate water and sanitation. *Lancet*, v.363, n.9403, p.94-95,2004.
41. DOENHOFF, M. J. et al. An anti-atherogenic effect of *Schistosoma mansoni* infections in mice associated with a parasite-induced lowering of blood total cholesterol. *Parasitology*, v.125, n.Pt 5, p.415-421,2002.
42. DROUET, B. et al. ApoE protects cortical neurones against neurotoxicity induced by the non-fibrillar C-terminal domain of the amyloid-beta peptide. *J. Neurochem.*, v.76, n.1, p.117-127,2001.
43. DUKE, L. M.; KASZNIAK A. W. Executive control functions in degenerative dementias: a comparative review. *Neuropsychol. Rev.*, v.10, n.2, p.75-99,2000.

44. DUNCAN, J.; OWEN A. M. Common regions of the human frontal lobe recruited by diverse cognitive demands. *Trends Neurosci.*, v.23, n.10, p.475-483,2000.
45. EHIRI, J. E.; PROWSE J. M. Child health promotion in developing countries: the case for integration of environmental and social interventions? *Health Policy Plan.*, v.14, n.1, p.1-10,1999.
46. EICHNER, J. E. et al. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.*, v.155, n.6, p.487-495,2002.
47. EPKER, M. O.; LACRITZ L. H.;MUNRO C. C. Comparative analysis of qualitative verbal fluency performance in normal elderly and demented populations. *J Clin Exp. Neuropsychol.*, v.21, n.4, p.425-434,1999.
48. EPSTEIN, H. T. Stages in human brain development. *Brain Res.*, v.395, n.1, p.114-119,1986.
49. ETUKUDO, M. H. et al. Plasma electrolytes, total cholesterol, liver enzymes, and selected antioxidant status in protein energy malnutrition. *Afr. J Med. Med. Sci.*, v.28, n.1-2, p.81-85,1999.
50. EWING-COBBS, L. et al. Children's narratives following traumatic brain injury: linguistic structure, cohesion, and thematic recall. *Brain Lang.*, v.61, n.3, p.395-419,1998.
51. FAMA, R. et al. Structural brain correlates of verbal and nonverbal fluency measures in Alzheimer's disease. *Neuropsychology.*, v.14, n.1, p.29-40,2000.
52. FEIGELSON, H. S. et al. Determinants of DNA yield and quality from buccal cell samples collected with mouthwash. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v.10, n.9, p.1005-1008,2001.
53. FINCH, C. E.; SAPOLSKY R. M. The evolution of Alzheimer disease, the reproductive schedule, and apoE isoforms. *Neurobiol. Aging*, v.20, n.4, p.407-428,1999.

54. FRIEDMAN, G. et al. Apolipoprotein E-epsilon4 genotype predicts a poor outcome in survivors of traumatic brain injury. *Neurology*, v.52, n.2, p.244-248,1999.
55. FUKUDA, M. T.; FRANCOLIN-SILVA A. L.; ALMEIDA S. S. Early postnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris water maze. *Behav. Brain Res.*, v.133, n.2, p.271-277,2002.
56. FUNAHASHI, S. Neuronal mechanisms of executive control by the prefrontal cortex. *Neurosci. Res*, v.39, n.2, p.147-165,2001.
57. GAMBOA, R. et al. [Polymorphism of apolipoprotein E and its association with cardiovascular disease]. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.*, v.69, n.4, p.375-382,1999.
58. GARCES, C. et al. Influence of birth weight on the apo E genetic determinants of plasma lipid levels in children. *Pediatr. Res*, v.52, n.6, p.873-878,2002.
59. GARCIA-CLOSAS, M. et al. Collection of genomic DNA from adults in epidemiological studies by buccal cytobrush and mouthwash. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v.10, n.6, p.687-696,2001.
60. GARDNER, J. M.; GRANTHAM-MCGREGOR S.; BADDELEY A. Trichuris trichiura infection and cognitive function in Jamaican school children. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.90, n.1, p.55-63,1996.
61. GENIS, I. et al. Phosphorylation of tau in apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci. Lett.*, v.199, n.1, p.5-8,1995.
62. GERDES, L. U. The common polymorphism of apolipoprotein E: geographical aspects and new pathophysiological relations. *Clin. Chem. Lab Med.*, v.41, n.5, p.628-631,2003.
63. GERDES, L. U. et al. The apolipoprotein E polymorphism in Greenland Inuit in its global perspective. *Hum. Genet.*, v.98, n.5, p.546-550,1996.
64. GERDES, L. U. et al. Apolipoprotein E polymorphism in a Danish population compared to findings in 45 other study populations around the world. *Genet. Epidemiol.*, v.9, n.3, p.155-167,1992.

65. GLEISSNER, U.; ELGER C. E. The hippocampal contribution to verbal fluency in patients with temporal lobe epilepsy. *Cortex*, v.37, n.1, p.55-63,2001.
66. GOLDBLUM, M. C. et al. The influence of semantic and perceptual encoding on recognition memory in Alzheimer's disease. *Neuropsychologia*, v.36, n.8, p.717-729,1998.
67. GORDON, N. Nutrition and cognitive function. *Brain Dev.*, v.19, n.3, p.165-170,1997.
68. GORITZ, C. et al. Role of glia-derived cholesterol in synaptogenesis: new revelations in the synapse-glia affair. *J. Physiol Paris*, v.96, n.3-4, p.257-263,2002.
69. GRAHAM, D. I. et al. Apolipoprotein E and the response of the brain to injury. *Acta Neurochir. Suppl (Wien.)*, v.73, p.89-92,1999.
70. GRANTHAM-MCGREGOR, S. M.; ANI C. C. Undernutrition and mental development. *Nestle. Nutr. Workshop Ser. Clin. Perform. Programme.*,n.5, p.1-14,2001.
71. GRANTHAM-MCGREGOR, S. M.; WALKER S. P.; CHANG S. Nutritional deficiencies and later behavioural development. *Proc. Nutr. Soc.*, v.59, n.1, p.47-54,2000.
72. GREENWALD, A. G. et al. Long-term semantic memory versus contextual memory in unconscious number processing. *J Exp. Psychol. Learn. Mem. Cogn*, v.29, n.2, p.235-247,2003.
73. GRESSENS, P. et al. Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, v.103, n.1, p.21-35,1997.
74. GUERRANT, D. I. et al. Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function four-seven years later in a poor urban community in northeast Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.61, n.5, p.707-713,1999.
75. GUERRANT, R. L. et al. Updating the DALYs for diarrhoeal disease. *Trends Parasitol.*, v.18, n.5, p.191-193,2002a.

76. GUERRANT, R. L. et al. Magnitude and impact of diarrheal diseases. *Arch. Med. Res.*, v.33, n.4, p.351-355,2002b.
77. GUERRANT, R. L. et al. Long-term impact of diarrheal diseases on cognitive, physical and educational development in the Northeast Brazil: More than doubling the diarrhea DALYs. *In: III International Symposium in Biomedicine, Federal University of Ceara, Fortaleza-Ce, Brazil*,p.6-2003.
78. GUTMAN, C. R. et al. Apolipoprotein E binds to and potentiates the biological activity of ciliary neurotrophic factor. *J. Neurosci.*, v.17, n.16, p.6114-6121,1997.
79. HAN, S. H. et al. Apolipoprotein E is localized to the cytoplasm of human cortical neurons: a light and electron microscopic study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, v.53, n.5, p.535-544,1994.
80. HANDELMANN, G. E. et al. Effects of apolipoprotein E, beta-very low density lipoproteins, and cholesterol on the extension of neurites by rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro. *J. Lipid Res.*, v.33, n.11, p.1677-1688,1992.
81. HANLON, C. S.; RUBINSZTEIN D. C. Arginine residues at codons 112 and 158 in the apolipoprotein E gene correspond to the ancestral state in humans. *Atherosclerosis*, v.112, n.1, p.85-90,1995.
82. HANSEN, D.; LOU H. C. Brain development, head circumference and medication. *Acta Paediatr.*, v.89, n.5, p.505-507,2000.
83. HARDY, S. C.; KLEINMAN R. E. Fat and cholesterol in the diet of infants and young children: implications for growth, development, and long-term health. *J Pediatr.*, v.125, n.5 Pt 2, p.S69-S77,1994.
84. HELBECQUE, N.; AMOUYEL P. Very low density lipoprotein receptor in Alzheimer disease. *Microsc. Res. Tech.*, v.50, n.4, p.273-277,2000.
85. HENDERSON, A. S. et al. Environmental risk factors for Alzheimer's disease: their relationship to age of onset and to familial or sporadic types. *Psychol. Med.*, v.22, n.2, p.429-436,1992.
86. HENKE, K. et al. Human hippocampus associates information in memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, v.96, n.10, p.5884-5889,1999.

87. HERNANDEZ, M. T. et al. Deficits in executive functions and motor coordination in children with frontal lobe epilepsy. *Neuropsychologia*, v.40, n.4, p.384-400,2002.
88. HERRMANN, W. et al. The influence of apolipoprotein E polymorphism on plasma concentrations of apolipoprotein B and A-I during the first year of life. *Pediatrics*, v.93, n.2, p.296-302,1994.
89. HINCHLIFFE, F. J. et al. Cognitive-linguistic subgroups in closed-head injury. *Brain Inj.*, v.12, n.5, p.369-398,1998.
90. HIXSON, J. E.; VERNIER D. T. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J. Lipid Res.*, v.31, n.3, p.545-548,1990.
91. HOFKER, M. H.; VAN VLIJMEN B. J.;HAVEKES L. M. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v.137, n.1, p.1-11,1998.
92. HORNER, P. J.; GAGE F. H. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature*, v.407, n.6807, p.963-970,2000.
93. HORSBURGH, K. et al. Intraventricular infusion of apolipoprotein E ameliorates acute neuronal damage after global cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, v.20, n.3, p.458-462,2000.
94. HOUSSAINI, F. Z. et al. Lipids, lipoproteins, and fatty acids during infantile marasmus in the Fes area of Morocco. *Biomed. Pharmacother.*, v.53, n.5-6, p.278-283,1999.
95. HUANG, Y. et al. Apolipoprotein E fragments present in Alzheimer's disease brains induce neurofibrillary tangle-like intracellular inclusions in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, v.98, n.15, p.8838-8843,2001.
96. HUNG, M. C. et al. Cerebral protein kinase C and its mRNA level in apolipoprotein E- deficient mice. *Life Sci.*, v.69, n.12, p.1419-1427,2001.
97. HUSSAIN, M. M.; STRICKLAND D. K.;BAKILLAH A. The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu. Rev. Nutr.*, v.19, p.141-172,1999.

98. IRWIN, J. J.; KIRCHNER J. T. Anemia in children. *Am. Fam. Physician*, v.64, n.8, p.1379-1386,2001.
99. IVANOVIC, D. M. et al. Nutritional status, brain development and scholastic achievement of Chilean high-school graduates from high and low intellectual quotient and socio-economic status. *Br. J. Nutr.*, v.87, n.1, p.81-92,2002.
100. JI, Z. S. et al. Apolipoprotein E4 potentiates amyloid beta peptide-induced lysosomal leakage and apoptosis in neuronal cells. *J. Biol. Chem.*, v.277, n.24, p.21821-21828,2002.
101. JORDAN, B. D. et al. Apolipoprotein E epsilon4 associated with chronic traumatic brain injury in boxing. *JAMA*, v.278, n.2, p.136-140,1997.
102. JURADO, M. A. et al. Phonemic and semantic fluencies in traumatic brain injury patients with focal frontal lesions. *Brain Inj.*, v.14, n.9, p.789-795,2000.
103. JUREVICS, H. A.; KIDWAI F. Z.; MORELL P. Sources of cholesterol during development of the rat fetus and fetal organs. *J Lipid Res*, v.38, n.4, p.723-733,1997.
104. KIM, M. J. et al. Increases in cell proliferation and apoptosis in dentate gyrus of anorexia (anx/anx) mice. *Neurosci. Lett.*, v.302, n.2-3, p.109-112,2001.
105. KITABAYASHI, Y. et al. Relationship between regional cerebral blood flow and verbal fluency in Alzheimer's disease. *Psychiatry Clin Neurosci.*, v.55, n.5, p.459-463,2001.
106. KIVIPELTO, M. et al. Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. *Ann. Intern. Med.*, v.137, n.3, p.149-155,2002.
107. KOSEK, M.; BERN C.; GUERRANT R. L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull. World Health Organ*, v.81, n.3, p.197-204,2003.
108. KOUDINOV, A. R.; KOUDINOVA N. V. Essential role for cholesterol in synaptic plasticity and neuronal degeneration. *FASEB J*, v.15, n.10, p.1858-1860,2001.

109. KVALSVIG, J. D.; COOPAN R. M.; CONNOLLY K. J. The effects of parasite infections on cognitive processes in children. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.85, n.5, p.551-568,1991.
110. LAATU, S. et al. Visual object recognition in early Alzheimer's disease: deficits in semantic processing. *Acta Neurol. Scand.*, v.108, n.2, p.82-89,2003.
111. LADU, M. J. et al. Lipoproteins in the central nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.903, p.167-175,2000.
112. LAFOSSE, J. M. et al. Fluency and memory differences between ischemic vascular dementia and Alzheimer's disease. *Neuropsychology.*, v.11, n.4, p.514-522,1997.
113. LAGERCRANTZ, H.; RINGSTEDT T. Organization of the neuronal circuits in the central nervous system during development. *Acta Paediatr.*, v.90, n.7, p.707-715,2001.
114. LAMBON RALPH, M. A. et al. Semantic memory is impaired in both dementia with Lewy bodies and dementia of Alzheimer's type: a comparative neuropsychological study and literature review. *J Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, v.70, n.2, p.149-156,2001.
115. LASKOWITZ, D. T. et al. Apolipoprotein E-deficient mice have increased susceptibility to focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v.17, n.7, p.753-758,1997.
116. LE MARCHAND, L. et al. Feasibility of collecting buccal cell DNA by mail in a cohort study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v.10, n.6, p.701-703,2001.
117. LEBLANC, A. C.; PODUSLO J. F. Regulation of apolipoprotein E gene expression after injury of the rat sciatic nerve. *J. Neurosci. Res.*, v.25, n.2, p.162-171,1990.
118. LEVIN, H. S. et al. Semantic memory following pediatric head injury: relationship to age, severity of injury, and MRI. *Cortex*, v.32, n.3, p.461-478,1996.

119. LEVIN, H. S. et al. Word fluency in relation to severity of closed head injury, associated frontal brain lesions, and age at injury in children. *Neuropsychologia*, v.39, n.2, p.122-131,2001.
120. LEVITSKY, D. A.; STRUPP B. J. Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns. *J. Nutr.*, v.125, n.8 Suppl, p.2212S-2220S,1995.
121. LIBERMAN, J. N. et al. Apolipoprotein E epsilon 4 and short-term recovery from predominantly mild brain injury. *Neurology*, v.58, n.7, p.1038-1044,2002.
122. LICHTMAN, S. W. et al. Apolipoprotein E and functional recovery from brain injury following postacute rehabilitation. *Neurology*, v.55, n.10, p.1536-1539,2000.
123. LIMA, A. A. et al. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. *J Infect Dis*, v.181, n.5, p.1643-1651,2000.
124. LOMNITSKI, L. et al. Antioxidant mechanisms in apolipoprotein E deficient mice prior to and following closed head injury. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1453, n.3, p.359-368,1999a.
125. LOMNITSKI, L. et al. Reduced levels of antioxidants in brains of apolipoprotein E-deficient mice following closed head injury. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.56, n.4, p.669-673,1997.
126. LOMNITSKI, L. et al. Distinct alterations in phospholipid metabolism in brains of apolipoprotein E-deficient mice. *J. Neurosci. Res.*, v.58, n.4, p.586-592,1999b.
127. LONDON, S. J. et al. Collection of buccal cell DNA in seventh-grade children using water and a toothbrush. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v.10, n.11, p.1227-1230,2001.
128. LUJAN, H. D. et al. Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.93, n.15, p.7628-7633,1996.

129. LUKOYANOV, N. V.; ANDRADE J. P. Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. *Behav. Brain Res.*, v.112, n.1-2, p.85-97,2000.
130. MAEKAWA, B. et al. Apolipoprotein E genotyping methods for the clinical laboratory. *J. Clin. Lab Anal.*, v.9, n.1, p.63-69,1995.
131. MAHLEY, R. W.; HUANG Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Curr. Opin. Lipidol.*, v.10, n.3, p.207-217,1999.
132. MAHLEY, R. W.; JI Z. S. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J. Lipid Res.*, v.40, n.1, p.1-16,1999.
133. MAHLEY, R. W.; RALL S. C., Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, v.1, p.507-537,2000.
134. MARTIN, A. et al. Word retrieval to letter and semantic cues: a double dissociation in normal subjects using interference tasks. *Neuropsychologia*, v.32, n.12, p.1487-1494,1994.
135. MARTIN, R. C. et al. The effects of lateralized temporal lobe dysfunction on formal and semantic word fluency. *Neuropsychologia*, v.28, n.8, p.823-829,1990.
136. MASLIAH, E. et al. Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice. *Exp. Neurol.*, v.136, n.2, p.107-122,1995.
137. MAUCH, D. H. et al. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science*, v.294, n.5545, p.1354-1357,2001.
138. MCCARRON, M. O. et al. Intracerebral hemorrhage outcome: apolipoprotein E genotype, hematoma, and edema volumes. *Neurology*, v.53, n.9, p.2176-2179,1999.
139. MCCARRON, M. O. et al. The apolipoprotein E epsilon4 allele and outcome in cerebrovascular disease. *Stroke*, v.29, n.9, p.1882-1887,1998.

140. MOCERI, V. M. et al. Early-life risk factors and the development of Alzheimer's disease. *Neurology*, v.54, n.2, p.415-420,2000.
141. MOLERO, A. E.; PINO-RAMIREZ G.; MAESTRE G. E. Modulation by age and gender of risk for Alzheimer's disease and vascular dementia associated with the apolipoprotein E-varepsilon4 allele in Latin Americans: findings from the Maracaibo Aging Study. *Neurosci. Lett.*, v.307, n.1, p.5-8,2001.
142. MONSCH, A. U. et al. Category fluency is also predominantly affected in Swiss Alzheimer's disease patients. *Acta Neurol. Scand.*, v.95, n.2, p.81-84,1997.
143. MOORE, S. R. et al. Early childhood diarrhoea and helminthiases associate with long-term linear growth faltering. *Int. J. Epidemiol.*, v.30, n.6, p.1457-1464,2001.
144. MOORE, S. R. et al. Changes over time in the epidemiology of diarrhea and malnutrition among children in an urban Brazilian shantytown, 1989 to 1996. *Int. J. Infect. Dis.*, v.4, n.4, p.179-186,2000.
145. MORELL, P.; JUREVICS H. Origin of cholesterol in myelin. *Neurochem. Res*, v.21, n.4, p.463-470,1996.
146. MORGANE, P. J. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev*, v.17, n.1, p.91-128,1993.
147. MORLEY, R.; LUCAS A. Nutrition and cognitive development. *Br. Med. Bull.*, v.53, n.1, p.123-134,1997.
148. NATHAN, B. P. et al. Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science*, v.264, n.5160, p.850-852,1994.
149. NATHAN, B. P. et al. The inhibitory effect of apolipoprotein E4 on neurite outgrowth is associated with microtubule depolymerization. *J. Biol. Chem.*, v.270, n.34, p.19791-19799,1995.
150. NATHAN, B. P. et al. Apolipoprotein E4 inhibits, and apolipoprotein E3 promotes neurite outgrowth in cultured adult mouse cortical neurons through the low-density lipoprotein receptor-related protein. *Brain Res.*, v.928, n.1-2, p.96-105,2002.

151. NDAMBA, J. et al. The physical fitness and work performance of agricultural workers infected with *Schistosoma mansoni* in Zimbabwe. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.87, n.6, p.553-561,1993.
152. NEBES, R. D.; BRADY C. B. Integrity of semantic fields in Alzheimer's disease. *Cortex*, v.24, n.2, p.291-299,1988.
153. NELLHAUS, G. Head circumference from birth to eighteen years. Practical composite international and interracial graphs. *Pediatrics*, v.41, n.1, p.106-114,1968.
154. NELSON, K. B.; DEUTSCHBERGER J. Head size at one year as a predictor of four-year IQ. *Dev. Med. Child Neurol.*, v.12, n.4, p.487-495,1970.
155. NEWMAN, R. D. et al. A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east Brazilian children. *Trop. Med. Int. Health*, v.6, n.8, p.624-634,2001.
156. NEWMAN, R. D. et al. Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in an urban community in northeast Brazil. *Ann. Intern. Med.*, v.120, n.6, p.500-505,1994.
157. NGUYEN, L. et al. Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res.*, v.305, n.2, p.187-202,2001.
158. NIEHAUS, M. D. et al. Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive function 4 to 7 years later in children in a northeast Brazilian shantytown. *Am. J Trop. Med. Hyg.*, v.66, n.5, p.590-593,2002.
159. NOKES, C. et al. Moderate to heavy infections of *Trichuris trichiura* affect cognitive function in Jamaican school children. *Parasitology*, v.104 (Pt 3), p.539-547,1992.
160. NOSEWORTHY, M. D.; BRAY T. M. Effect of oxidative stress on brain damage detected by MRI and in vivo ³¹P-NMR. *Free Radic. Biol Med.*, v.24, n.6, p.942-951,1998.
161. OWEN, C. G. et al. Infant feeding and blood cholesterol: a study in adolescents and a systematic review. *Pediatrics*, v.110, n.3, p.597-608,2002.

162. PAGE, K. J.; HOLLISTER R. D.; HYMAN B. T. Dissociation of apolipoprotein and apolipoprotein receptor response to lesion in the rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience*, v.85, n.4, p.1161-1171,1998.
163. PAUS, T. et al. Structural maturation of neural pathways in children and adolescents: in vivo study. *Science*, v.283, n.5409, p.1908-1911,1999.
164. PIEDRAHITA, J. A. et al. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.89, n.10, p.4471-4475,1992.
165. PLANEL, E. et al. Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, v.24, n.10, p.2401-2411,2004.
166. POIRIER, J. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.*, v.17, n.12, p.525-530,1994.
167. POIRIER, J. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. A role in amyloid catabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.924, p.81-90,2000.
168. POIRIER, J. et al. Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience*, v.55, n.1, p.81-90,1993.
169. POIRIER, J. et al. Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, v.11, n.2, p.97-106,1991.
170. POLLITT, E. Developmental sequel from early nutritional deficiencies: conclusive and probability judgements. *J. Nutr.*, v.130, n.2S Suppl, p.350S-353S,2000.
171. POLLITT, E. et al. Effects of an energy and micronutrient supplement on mental development and behavior under natural conditions in undernourished children in Indonesia. *Eur. J. Clin. Nutr.*, v.54 Suppl 2, p.S80-S90,2000.

172. PRENTICE, A. M.; PAUL A. A. Fat and energy needs of children in developing countries. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.72, n.5 Suppl, p.1253S-1265S,2000.
173. RAPOPORT, J. L. et al. Imaging normal and abnormal brain development: new perspectives for child psychiatry. *Aust. N. Z. J. Psychiatry*, v.35, n.3, p.272-281,2001.
174. RAUSSENS, V. et al. NMR Structure and Dynamics of a Receptor-active Apolipoprotein E Peptide. *J. Biol. Chem.*, v.277, n.32, p.29172-29180,2002.
175. REICH, E. E. et al. Interactions between apolipoprotein E gene and dietary alpha-tocopherol influence cerebral oxidative damage in aged mice. *J. Neurosci.*, v.21, n.16, p.5993-5999,2001.
176. RIBAUT-BARASSIN, C. et al. Alzheimer's disease proteins in cerebellar and hippocampal synapses during postnatal development and aging of the rat. *Neuroscience*, v.120, n.2, p.405-423,2003.
177. RICCI, P. T. et al. Functional neuroanatomy of semantic memory: recognition of semantic associations. *Neuroimage.*, v.9, n.1, p.88-96,1999.
178. RICE, D.; BARONE S JR. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.*, v.108 Suppl 3, p.511-533,2000.
179. RIVA, D.; NICHELLI F.; DEVOTI M. Developmental aspects of verbal fluency and confrontation naming in children. *Brain Lang*, v.71, n.2, p.267-284,2000.
180. ROHRER, D. et al. The disparate effects of Alzheimer's disease and Huntington's disease on semantic memory. *Neuropsychology.*, v.13, n.3, p.381-388,1999.
181. ROHRER, D. et al. Retrieval from semantic memory and its implications for Alzheimer's disease. *J. Exp. Psychol. Learn. Mem. Cogn*, v.21, n.5, p.1127-1139,1995.
182. ROSENZWEIG, M. R.; BENNETT E. L. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav. Brain Res.*, v.78, n.1, p.57-65,1996.

183. ROSES, A. D. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu. Rev Med.*, v.47, p.387-400,1996.
184. ROSSER, A.; HODGES J. R. Initial letter and semantic category fluency in Alzheimer's disease, Huntington's disease, and progressive supranuclear palsy. *J Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, v.57, n.11, p.1389-1394,1994.
185. ROYALL, D. R. et al. Executive control function: a review of its promise and challenges for clinical research. A report from the Committee on Research of the American Neuropsychiatric Association. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.*, v.14, n.4, p.377-405,2002.
186. RUFF, R. M. et al. The psychological construct of word fluency. *Brain Lang*, v.57, n.3, p.394-405,1997.
187. SABO, T. et al. Susceptibility of transgenic mice expressing human apolipoprotein E to closed head injury: the allele E3 is neuroprotective whereas E4 increases fatalities. *Neuroscience*, v.101, n.4, p.879-884,2000.
188. SALVATI, S. et al. Dietary prenatal lipids affect myelin gene expression in postnatal undernourished rats. *Nutr. Neurosci.*, v.5, n.4, p.243-250,2002.
189. SATIA, A. et al. Buccal Cell DNA Yield, Quality, and Collection Costs: Comparison of Methods for Large-scale Studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v.11, n.10, p.1130-1133,2002.
190. SCHWARTZ, S. et al. Pervasive influence of semantics in letter and category fluency: a multidimensional approach. *Brain Lang*, v.87, n.3, p.400-411,2003.
191. SCIARMA, T. et al. [The verbal fluency test for the diagnosis of dementia]. *Riv. Neurol.*, v.60, n.5, p.194-197,1990.
192. SIMEON, D. T. School feeding in Jamaica: a review of its evaluation. *Am. J Clin Nutr.*, v.67, n.4, p.790S-794S,1998.
193. SIMEON, D. T.; GRANTHAM-MCGREGOR S. M.; WONG M. S. Trichuris trichiura infection and cognition in children: results of a randomized clinical trial. *Parasitology*, v.110 (Pt 4), p.457-464,1995.

194. SKLAVOUNOU, E. et al. Apolipoprotein E polymorphism in the Greek population. *Clin. Genet.*, v.52, n.4, p.216-218,1997.
195. SNOWDON, D. A. et al. Linguistic ability in early life and cognitive function and Alzheimer's disease in late life. Findings from the Nun Study. *JAMA*, v.275, n.7, p.528-532,1996.
196. SOUZA, D. R. et al. Association of apolipoprotein E polymorphism in late-onset Alzheimer's disease and vascular dementia in Brazilians. *Braz. J Med. Biol Res*, v.36, n.7, p.919-923,2003.
197. SOUZA, D. R. S. Polimorfismo da apolipoproteína E na doença de Alzeihmer tipo tardio: resultados preliminares. *Rev Psiq Clínica*, v.25, p.98-103,1998.
198. SPARKS, D. L. et al. Increased density of cortical apolipoprotein E immunoreactive neurons in rabbit brain after dietary administration of cholesterol. *Neurosci. Lett.*, v.187, n.2, p.142-144,1995.
199. STEINER, T. S. et al. Enteroaggregative Escherichia coli produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. *J. Infect. Dis.*, v.177, n.1, p.88-96,1998.
200. STENGARD, J. H.; WEISS K. M.; SING C. F. An ecological study of association between coronary heart disease mortality rates in men and the relative frequencies of common allelic variations in the gene coding for apolipoprotein E. *Hum. Genet.*, v.103, n.2, p.234-241,1998.
201. STEPHENSON, L. S. et al. Physical fitness, growth and appetite of Kenyan school boys with hookworm, *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides* infections are improved four months after a single dose of albendazole. *J. Nutr.*, v.123, n.6, p.1036-1046,1993.
202. STEVENS, T. L. et al. Uptake and cellular localization of exogenous lipids by *Giardia lamblia*, a primitive eukaryote. *Exp. Parasitol.*, v.86, n.2, p.133-143,1997.
203. STRITTMATTER, W. J.; BOVA H. C. Molecular biology of apolipoprotein E. *Curr. Opin. Lipidol.*, v.13, n.2, p.119-123,2002.

204. TAMM, L.; MENON V.; REISS A. L. Maturation of brain function associated with response inhibition. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*, v.41, n.10, p.1231-1238,2002.
205. TAMMI, A. et al. Apolipoprotein E4 phenotype increases non-fasting serum triglyceride concentration in infants - the STRIP study. *Atherosclerosis*, v.152, n.1, p.135-141,2000.
206. TEASDALE, G. M. et al. Association of apolipoprotein E polymorphism with outcome after head injury. *Lancet*, v.350, n.9084, p.1069-1071,1997.
207. TETER, B. et al. Defective neuronal sprouting by human apolipoprotein E4 is a gain-of- negative function. *J. Neurosci. Res.*, v.68, n.3, p.331-336,2002.
208. THOMPSON-SCHILL, S. L. et al. Verb generation in patients with focal frontal lesions: a neuropsychological test of neuroimaging findings. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, v.95, n.26, p.15855-15860,1998.
209. TIERNEY, M. C. et al. Recognition memory and verbal fluency differentiate probable Alzheimer disease from subcortical ischemic vascular dementia. *Arch. Neurol.*, v.58, n.10, p.1654-1659,2001.
210. TSUKAMOTO, K. et al. Determination by PCR-RFLP of apo E genotype in a Japanese population. *J. Lab Clin. Med.*, v.121, n.4, p.598-602,1993.
211. TURIC, D. et al. No association between apolipoprotein E polymorphisms and general cognitive ability in children. *Neurosci. Lett.*, v.299, n.1-2, p.97-100,2001.
212. UAUY, R.; MENA P.; PEIRANO P. Mechanisms for nutrient effects on brain development and cognition. *Nestle. Nutr. Workshop Ser. Clin. Perform. Programme.*,n.5, p.41-70,2001.
213. WALLECH, C. W. et al. The neuropsychology of blunt head injury in the early postacute stage: effects of focal lesions and diffuse axonal injury. *J Neurotrauma*, v.18, n.1, p.11-20,2001.
214. WARBURTON, E. et al. Noun and verb retrieval by normal subjects. Studies with PET. *Brain*, v.119 (Pt 1), p.159-179,1996.

215. WASANTWISUT, E. Nutrition and development: other micronutrients' effect on growth and cognition. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, v.28 Suppl 2, p.78-82,1997.
216. WATSON, J. M.; BALOTA D. A.; SERGENT-MARSHALL S. D. Semantic, phonological, and hybrid veridical and false memories in healthy older adults and in individuals with dementia of the Alzheimer type. *Neuropsychology*, v.15, n.2, p.254-267,2001.
217. WEISGRABER, K. H. Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112. *J. Lipid Res.*, v.31, n.8, p.1503-1511,1990.
218. WEISGRABER, K. H. Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv. Protein Chem.*, v.45, p.249-302,1994.
219. WEISGRABER, K. H.; MAHLEY R. W. Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection. *FASEB J.*, v.10, n.13, p.1485-1494,1996.
220. WHO. WHO global database on child growth and malnutrition. 1997.
221. WILSON, C. et al. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science*, v.252, n.5014, p.1817-1822,1991.
222. WOZNIAK, M. A. et al. Does apolipoprotein E polymorphism influence susceptibility to malaria? *J Med. Genet.*, v.40, n.5, p.348-351,2003.
223. WOZNIAK, M. A. et al. Apolipoprotein E-epsilon 4 protects against severe liver disease caused by hepatitis C virus. *Hepatology*, v.36, n.2, p.456-463,2002.
224. WRIGHT, R. O. et al. Apolipoprotein E genotype predicts 24-month bayley scales infant development score. *Pediatr. Res.*, v.54, n.6, p.819-825,2003.
225. XIANG, M. et al. Long-chain polyunsaturated fatty acids in human milk and brain growth during early infancy. *Acta Paediatr.*, v.89, n.2, p.142-147,2000.
226. YAMAUCHI, K. et al. Apolipoprotein E in cerebrospinal fluid: relation to phenotype and plasma apolipoprotein E concentrations. *Clin. Chem.*, v.45, n.4, p.497-504,1999.

227. YANAGISAWA, M. et al. Starvation induces tau hyperphosphorylation in mouse brain: implications for Alzheimer's disease. *FEBS Lett.*, v.461, n.3, p.329-333,1999.
228. YOUDIM, M. B. Nutrient deprivation and brain function: iron. *Nutrition*, v.16, n.7-8, p.504-508,2000.
229. ZAIYOU, M. et al. Apolipoprotein E;-low density lipoprotein receptor interaction. Influences of basic residue and amphipathic alpha-helix organization in the ligand. *J. Lipid Res.*, v.41, n.7, p.1087-1095,2000.
230. ZAROW, C.; VICTOROFF J. Increased apolipoprotein E mRNA in the hippocampus in Alzheimer disease and in rats after entorhinal cortex lesioning. *Exp. Neurol.*, v.149, n.1, p.79-86,1998.
231. ZEMEL, B. S.; RILEY E. M.; STALLINGS V. A. Evaluation of methodology for nutritional assessment in children: anthropometry, body composition, and energy expenditure. *Annu. Rev Nutr.*, v.17, p.211-235,1997.
232. ZETTERBERG, H. et al. Influence of the apolipoprotein E epsilon4 allele on human embryonic development. *Neurosci. Lett.*, v.324, n.3, p.189-192,2002.
233. ZHENG, S. et al. Whole genome amplification increases the efficiency and validity of buccal cell genotyping in pediatric populations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v.10, n.6, p.697-700,2001.