

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

CAROLINA AKKARI TORRES

**Glicogênio Sintase Quinase3B e Proteína Precursora do
Amilóide em plaquetas de indivíduos com
comprometimento cognitivo leve e doença de Alzheimer**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Psiquiatria
Orientador: Orestes Vicente Forlenza

São Paulo
2009

CAROLINA AKKARI TORRES

**Glicogênio Sintase Quinase3B e Proteína Precursora do
Amilóide em plaquetas de indivíduos com
comprometimento cognitivo leve e doença de Alzheimer**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Psiquiatria
Orientador: Orestes Vicente Forlenza

São Paulo
2009

Dedico este trabalho a toda minha família:
meus pais, Modesto e Claudete,
minha irmã, Beatriz, e
meu namorado, Edu,
por todos os ensinamentos,
todo amor e apoio
constantemente na minha vida.

Agradecimentos

Ao Dr. Orestes, exemplo de pesquisador, pela oportunidade de ser sua aluna e pelos seus ensinamentos que foram fundamentais para a execução deste trabalho ao longo destes três anos.

Ao Prof. Gattaz pela oportunidade de trabalhar e aprender no LIM-27, um laboratório de pesquisa modelo.

A Leda, por toda ajuda, participação e parceria no meu trabalho além de todas as discussões científicas que foram extremamente importantes para a conclusão deste estudo.

A Isis, pela ajuda na parte experimental deste trabalho assim como também por sua paciência e dedicação, que permitiram que eu conseguisse desenvolver este trabalho com toda técnica e empenho necessários.

A equipe do LIM-27 pelo companheirismo e colaboração, cada um da sua maneira, pelos cafezinhos com muitas risadas entre um experimento e outro, fazendo o dia-a-dia ser muito mais agradável! E...principalmente pelos poucos “happy-hours” que fizemos para tentar manter uma vida paralela ao mestrado!

Á Lele, minha super amiga, por todas as risadas, as discussões (fossem elas científicas ou não...)! Obrigada por estar por perto durante todo esse tempo, independente dos motivos, fossem estes fáceis ou difíceis, e pelo sacrifício de dias (ou pelo menos parte deles certamente!) sempre que preciso para me ajudar: Enfim, OBRIGADA por todos os momentos dentro ou fora do lab e pela amizade única que temos uma com a outra!

Á Paty, por muitas discussões e muitas conversas ao longo desse tempo, onde em muitas, senão todas às vezes, era a pessoa que melhor entendia qualquer dificuldade que eu tinha durante o desenvolvimento desse trabalho! Sem dúvidas crescemos com isso e aprendemos muuuuuuuuuita coisa juntas prá poder aplicar na vida daqui prá frente!!! Né miga?!

Á Helô, minha Loira querida, que mesmo um pouco mais ausente sempre esteve a disposição para me ajudar sempre que fosse preciso!

“Aqui ó!” Agradeço à Aline, mineirinha, por todos os pedidos de socorro “estatísticos” e pela sua obsessão por correções, rs, principalmente nesta fase final do mestrado! Sempre muito prestativa! Um “brigadão” oficial agora!

A duas amigas, de faculdade, minhas irmãs, “Lilis” e “Nana”, que mesmo nos encontrando apenas “uma vez por ano” em virtude dos diferentes rumos que tivemos, passando madrugadas em claro somente pra dar risadas (e chorar também, né?) me ajudaram absurdamente com o desenvolvimento deste

trabalho e, mais do que tudo, pessoalmente, mostrando que nossa amizade pode superar mais coisas do que nós mesmas acreditamos! OBRIGADA!

Ao meu namorado, Edu, pela compreensão durante momentos em que estive ausente por dedicação a este trabalho, pela infinita preocupação e paciência em todos os meus períodos de aflição desde que estamos juntos e mais ainda por estar comigo nesses momentos decisivos da minha vida! Certamente esse apoio foi indispensável e único! Simplesmente OBRIGADA por existir! TQM! Lembra?

A toda a minha família, por compreenderem minha ausência em aniversários e almoços dominicais com a família reunida por conta do meu mestrado e pelo constante pensamento positivo para o meu sucesso profissional.

Ao vovô Maurício, querido, que continua me acompanhando de algum lugar lá em cima e está ao meu lado a cada momento de sucesso e a cada momento difícil na minha vida! Comemoramos juntos o meu ingresso no mestrado e, certamente comemoraremos juntos novamente por logo...somente de uma maneira diferente! Saudades absurdas, inexplicáveis!

A toda a equipe de médicos/neuropsicólogas, por toda ajuda no esclarecimento de dúvidas sobre os diagnósticos de todos os pacientes, sempre que necessário.

A Eliza, secretária da Pós-Graduação, por toda paciência em me explicar inúmeras vezes sobre prazos, regras, condições, necessidades que deveriam ser cumpridas durante a execução do meu mestrado!

A todos os meus amigos que estiveram envolvidos de alguma forma na minha vida durante estes três anos de trabalho.

A todos os pacientes envolvidos neste estudo! Criar um vínculo com cada um deles, com cada história de vida é simplesmente inevitável! Certamente aprendi muitas coisas além de ciência com cada um deles! Sem eles tudo seria muito mais difícil, senão impossível! Obrigada!!!

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

A FAPESP, CNPq e ABADHS pelo financiamento de projetos que possibilitaram a execução desta pesquisa.

(...) Aprendi que não importa o quanto certas coisas sejam importantes para mim, tem gente que não dá a mínima e eu jamais conseguirei convencê-las.

(...) Aprendi que vai demorar muito para me transformar na pessoa que quero ser, e devo ter paciência. Mas, aprendi também, que posso ir além dos limites que eu próprio coloquei. Aprendi que preciso escolher entre controlar meus pensamentos ou ser controlado por eles.

(...) Aprendi que perdoar exige muita prática. Que há muita gente que gosta de mim, mas não consegue expressar isso. Aprendi que nos momentos mais difíceis a ajuda veio justamente daquela pessoa que eu achava que iria tentar piorar as coisas.

(...) Eu aprendi que meu melhor amigo vai me machucar de vez em quando, que eu tenho que me acostumar com isso.

(...) Aprendi que, não importa o quanto meu coração esteja sofrendo o mundo não vai parar por causa disso. Eu aprendi que as circunstâncias de minha infância são responsáveis pelo que eu sou, mas não pelas escolhas que eu faço quando adulto.

(...) Aprendi também que diplomas na parede não me fazem mais respeitável ou mais sábio.

(...) Aprendi que certas pessoas vão embora da nossa vida de qualquer maneira, mesmo que desejemos retê-las para sempre.

(...) Se amanhã sentires saudades, lembra-te da fantasia e sonha com tua próxima vitória.

(...) Não faças do amanhã o sinônimo de nunca, nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais. Teus passos ficaram! Olhes para trás...mas vá em frente pois há muitos que precisam que chegues para poderem seguir-te.

Trecho extraído do poema *Aprendi*, de Charles Chaplin

Normalização adotada

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

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

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

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

SUMARIO

Resumo

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Doença de Alzheimer e Comprometimento Cognitivo Leve.....	1
1.2 Mecanismos patogênicos da DA: APP e TAU:	4
1.3 Glicogênio sintase quinase 3B.....	13
1.4 Biomarcadores para DA.....	17
1.5 Avaliação clínica dos pacientes.....	23
2 OBJETIVOS.....	25
3. MÉTODOS.....	26
3.1. Casuística.....	26
3.1.1. Caracterização clínica dos pacientes e controles.....	26
3.1.2. Cálculo amostral.....	28
3.1.3. Recrutamento de pacientes.....	29
3.2. Procedimentos laboratoriais.....	30
3.2.1. Obtenção e preparo de plaquetas.....	31
3.2.2. Determinação da quantidade de proteínas nas amostras.....	32
3.2.3. <i>Western Blot</i>	34
3.2.4. Lista de reagentes e soluções.....	37
3.3. Análise estatística.....	39
4 RESULTADOS.....	40
4.1. Otimização do protocolo de <i>Western Blot</i>	40

4.2. <i>Immunoblotting</i> – APP.....	41
4.3. Preparo de amostra 1.....	42
4.3.1. <i>Immunoblotting</i> – GSK3B total.....	42
4.3.2. <i>Immunoblotting</i> – GSK3B fosforilada.....	44
4.4. Preparo de amostra 2.....	48
4.4.1. <i>Immunoblotting</i> – GSK3B total.....	48
4.4.2. <i>Immunoblotting</i> – GSK3B fosforilada.....	49
4.5. Correlação entre APPr e rGSK3B.....	51
4.5.1. Preparo de amostra 1.....	51
4.5.2. Preparo de amostra 2.....	52
4.6. Correlações da APPr e rGSK3B com parâmetros cognitivos.....	53
5 DISCUSSÃO.....	55
6 CONCLUSÕES.....	65
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

Lista de figuras

Figura 1 – Esquema da APP e suas três principais isoformas.....	7
Figura 2 – Esquema do processamento proteolítico da APP.....	8
Figura 3 – Clivagem da APP pela enzima γ -secretase.....	10
Figura 4 – GSK3B e TAU em neurônios.....	13
Figura 5 – Mecanismo molecular de inibição da GSK3B.....	15
Figura 6 – Linha do tempo hipotética da progressão da DA esporádica e da DA familiar.....	19
Figura 7 – <i>Blot</i> para APP.....	41
Figura 8 – Médias da razão da APP entre os grupos.....	42
Figura 9 – <i>Blot</i> para a enzima GSK3B, porção total, de acordo com o preparo de amostra 1.....	44
Figura 10 – <i>Blot</i> para a porção fosforilada da enzima GSK3B de acordo com o preparo de amostra 1.....	46
Figura 11 – Determinação da densitometria de GSK3B total e fosforilada em cada um dos grupos seguido do preparo de amostra 1.....	47
Figura 12 – Determinação da razão da GSK3B (pGSK/tGSK) em cada um dos grupos estudados, seguido do preparo de amostra 1.....	48
Figura 13 – <i>Blot</i> para a enzima GSK3B, porção total, utilizando o preparo de amostra 2.....	49
Figura 14 – <i>Blot</i> para a porção fosforilada da enzima GSK3B de acordo com o preparo de amostra 2.....	49
Figura 15 – Densitometria de GSK3B total e fosforilada em cada um dos grupos estudados segundo preparo de amostra 2.....	50
Figura 16 – Determinação da rGSK3B em cada um dos grupos estudados de acordo com preparo de amostra 2.....	51
Figura 17 – (A) Correlação da APP com a razão da GSK3B em plaquetas, de acordo com o preparo de amostra 1, (B) Comparação entre APPr e rGSK de acordo com os diferentes diagnósticos	52

Figura 18 – (A) Correlação da APP_r e rGSK segundo os diferentes diagnósticos, segundo o preparo de amostra 2; (B) Comparação entre razão dos fragmentos de APP e GSK3B..... 53

Figura 19 – Gráfico mostrando correlação entre o subescore memória (CAMCOG) e a rGSK3B..... 54

Lista de tabelas

Tabela 1 – Descrição da amostra e distribuição dos indivíduos.....	29
Tabela 2 – Medicamentos em uso por pacientes do estudo.....	30
Tabela 3 – Protocolo de <i>Immunoblotting</i> para APP.....	37
Tabela 4 – Protocolo de <i>Immunoblotting</i> para GSK3B total.....	43
Tabela 5 – Protocolo de <i>Immunoblotting</i> para GSK3B fosforilada.....	45

RESUMO

Glicogênio Sintase Quinase3B e Proteína Precursora do Amilóide em plaquetas de indivíduos com comprometimento cognitivo leve e doença de Alzheimer [dissertação]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2009. 96p.

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa caracterizada pelo declínio progressivo da memória e de outras funções cognitivas, acometendo, sobretudo, indivíduos idosos. A anormalidade do metabolismo da proteína precursora do amilóide (APP) e a hiperfosforilação da proteína TAU são processos celulares característicos desta doença. A enzima glicogênio sintase quinase 3B (GSK3B) é altamente expressa no sistema nervoso central e apresenta grande importância na regulação da plasticidade neuronal e também nos mecanismos de sobrevivência celular. Estudos têm associado a GSK3B aos mecanismos que levam à formação das placas senis e dos emaranhados neurofibrilares na DA. Diante da dificuldade para se estabelecer com precisão o diagnóstico clínico da DA, sobretudo nas fases iniciais da doença, a identificação de biomarcadores se torna particularmente importante, principalmente em tecidos periféricos. Este trabalho avaliou, por meio de dois preparos distintos, dois possíveis candidatos a marcadores bioquímicos para a DA. Em plaquetas de pacientes com DA, comprometimento cognitivo leve (CCL) e idosos saudáveis, determinamos: (1) a razão de APP (APP_r), que consiste na proporção entre fragmentos de 130kDa e 110kDa da APP; e (2) a expressão das formas fosforilada (fosfo-GSK3B) e total (total-GSK3B) da enzima GSK3B, possibilitando o cálculo da razão de GSK3B (fosfo-GSK3B/total-GSK3B). Ambas as razões foram avaliadas por *Western Blot* utilizando anticorpos específicos. Não observamos diferença estatisticamente significativa nos valores de APP_r entre os três grupos estudados ($p=0,847$). Para o cálculo da razão de GSK3B, foram necessárias adaptações do protocolo de preparo e análise de plaquetas, prevenindo a ativação plaquetária durante o procedimento, bem como a degradação do substrato pela ação de proteases e fosfatases presentes nesta matriz biológica; deste modo foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos nas médias de GSK3B total e da razão de GSK3B ($p=0,05$ e $p=0,06$ respectivamente). Não foi encontrada correlação entre a razão de APP e a razão de GSK3B. Contudo, a razão de GSK3B mostrou correlação com o desempenho em testes de memória, segundo o escore na bateria cognitiva CAMCOG. Estes resultados sugerem que a razão de GSK3B em plaquetas sinaliza algumas alterações biológicas que ocorrem na progressão do CCL para a demência na DA.

Descritores: 1.Doença de Alzheimer 2.Plaquetas 3.Proteína precursora do amilóide 4. Glicogênio sintase 5. Marcadores biológicos 6. Biomarcadores

SUMMARY

Glycogen Synthase kinase 3B and Amyloid precursor protein in adults' platelets with cognitive impairment and Alzheimer's disease. [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 96p.

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by progressive decline of memory and other cognitive functions, affecting mainly elderly. The abnormal metabolism of amyloid precursor protein (APP) and protein TAU hyperphosphorylation are cellular hallmarks of this disease. Glycogen synthase kinase 3B (GSK3B) is an enzyme highly expressed in the central nervous system and of great importance in the regulation of neuronal plasticity and also the mechanisms of cell survival. Studies have associated GSK3B with the mechanisms that lead to the formation of senile plaques and neurofibrillary tangles in AD. Given the difficulty to establish the precise clinical diagnosis of AD, especially in the early stages of the disease, identification of biomarkers is particularly important, especially in peripheral tissues. This work evaluated two candidate biochemical markers for AD, using two different preparations. We investigated the ratio between 130kDa and 110kDa APP fragments (APP_r) and between phosphorylated and total GSK3B (phospho-GSK3B / total-GSK3B) in platelets of patients with AD and mild cognitive impairment (MCI), comparing their results with those from healthy older adults (controls). The expression of APP fragments and GSK3B was assessed by Western blot using specific antibodies. No statistically significant differences in APP_r were found between the study groups ($p=0.847$). We found statistically significant differences in mean total GSK3B and GSK3B ratio across diagnostic groups ($p=0.05$ and $p=0.06$, respectively). APP_r and GSK3B ratio were not correlated, but the latter parameter did correlate with the performance on memory tests, as shown by the CAMCOG sub-score. The present data indicate that platelet GSK3B ratio may indicate biological changes that occur in the MCI-AD continuum.

Descriptors: 1. Alzheimer disease 2. Platelets 3. Amyloid precursor protein 4. Glycogen synthase 5. Biological markers 6. Biomarkers

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Alzheimer e comprometimento cognitivo leve:

Descrita pela primeira vez, no começo do século XX, por Alois Alzheimer, a doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda progressiva de memória e outras funções cognitivas e comportamentais do indivíduo (Maccioni et al, 2001; Irvine et al, 2008). É o tipo mais comum de demência, representando mais da metade dos casos desta doença (Francis et al, 1999; Thomas et al, 2008).

Trata-se de uma doença com grande impacto sócio-econômico e acomete aproximadamente 2% da população de países industrializados (Thomas et al, 2008). Atualmente, mais de 24 milhões de pessoas no mundo são acometidas pela doença, com 4,6 milhões de novos casos por ano (Irvine et al, 2008). Nos próximos anos, é previsto um aumento dos casos, acompanhado pelo desenvolvimento demográfico, para 63 milhões de pessoas no mundo em 2030 (Thomas et al, 2008).

A idade é um conhecido fator de risco para o desenvolvimento desta neuropatologia, uma vez que a incidência da doença aumenta em idosos acima de 65 anos, e mais ainda em idosos acima de 85 anos (Annaert e Strooper, 2002; Walsh e Selkoe, 2004; Zhu et al, 2006; Irvine et al, 2008).

A forma mais comum desta demência, conhecida como DA esporádica ou de início tardio, acomete principalmente idosos acima de 65

anos. Nestes casos, a identificação, o diagnóstico inicial e a eliminação dos fatores de risco poderiam diminuir potencialmente a ocorrência da doença (Sadowski et al, 2004). Já a DA de início precoce, também identificada como DA familiar (DAF) é bastante rara, correspondendo a aproximadamente 2% dos casos de DA, e acometendo adultos entre 40 e 60 anos. Mutações em três diferentes genes têm sido descritas nos casos de DA familiar: proteína precursora do amilóide (APP), presinilina 1 (PS1) e presinilina 2 (PS2) (Annaert e Strooper, 2002; Wolfe e Guénette, 2007; Mohs e Haroutunian, 2002; Waldau e Shetty, 2008). Juntas, estas mutações correspondem a aproximadamente 50% dos casos de DAF. Os fatores genéticos que predisõem à DA de início tardio são dificilmente identificados porque a presença destes não determina, necessariamente, o fenótipo da doença (Irvine et al, 2008). Nestes casos, destaca-se o papel dos polimorfismos da apolipoproteína E, sendo o genótipo ϵ -4 associado ao risco e o genótipo ϵ -2, à proteção (Corder et al, 1998).

A progressão da doença é similar tanto na forma esporádica quanto na familiar, onde a queixa de memória é o sintoma mais frequente. O diagnóstico desta doença em vida é uma formulação probabilística que depende da caracterização do quadro clínico e da exclusão de outras causas de demência. Não existe um marcador clínico ou laboratorial patognomônico, sendo que o diagnóstico de DA definitiva depende da comprovação histopatológica das placas senis e emaranhados neurofibrilares. Testes neuropsicológicos e testes para avaliação do estado

mental são ferramentas importantes para a definição do diagnóstico do paciente (Swerdlow, 2007; Irvine et al, 2008).

O conceito de comprometimento cognitivo leve (CCL) corresponde a uma das tentativas de se caracterizar a transição entre o envelhecimento normal e o início da doença, identificando-se os indivíduos com alto risco de evoluírem para a DA (Petersen et al, 1999; Tabert et al, 2006; Nordlund et al, 2008). Estes pacientes apresentam queixas consistentes de memória, declínio no desempenho cognitivo maior do que o esperado para a sua idade e nível de escolaridade, mas sem evidência de prejuízos funcionais, ou dificuldades para a realização das atividades da vida diária; portanto, não há subsídios para o diagnóstico de um quadro demencial (Winblad et al, 2004; Gainotti et al, 2008). Os critérios diagnósticos mais utilizados atualmente correspondem aos de Petersen e colaboradores (1999). O diagnóstico de CCL implica um risco aumentado de evolução para DA em relação idosos sem comprometimento cognitivo (6% a 25% vs. 1% a 2% ao ano, respectivamente) (Petersen et al, 2001; Tabert et al, 2006; Nordlund et al, 2008). Recentemente, os subtipos de CCL têm sido caracterizados: no CCL amnésico (CCL-A), o indivíduo apresenta somente déficit de memória episódica; no CCL de múltiplas funções acometidas (CCL-M), o paciente apresenta déficit em mais de um domínio cognitivo além da memória; e no CCL não-amnésico (CCL-NA), observa-se déficit em outra habilidade cognitiva, não sendo memória (Petersen et al, 2004). O CCL-A e o CCL-M são fatores de risco para DA (Diniz et al, 2009). Embora vários estudos tenham sugerido uma taxa de conversão anual de CCL-A para DA em torno

de 10% (Lehrner et al, 2005), outras estimativas mostraram-se mais conservadoras (Forlenza e Chiu, 2008). Isso porque os critérios diagnósticos atuais ainda geram um grupo muito heterogêneo de pacientes, muitos dos quais permanecem estáveis em seus déficits ou até mesmo retornam a um funcionamento cognitivo normal ao longo da evolução (Petersen et al, 2004; Gainotti et al, 2008; Nordlund et al, 2008).

Apesar dos 100 anos da descoberta da doença de Alzheimer, a pesquisa básica tem identificado diversos mecanismos e cascatas de sinalização que contribuem para a evolução desta doença, gerando inéditas oportunidades de desenvolvimento de biomarcadores contribuindo para o diagnóstico precoce (ou até mesmo pré-clínico) e tratamentos para as causas desta neuropatologia (Petersen et al, 1999; Roberson e Mucke, 2006; Nordlund et al, 2008).

1.2. Mecanismos patogênicos da doença de Alzheimer - APP e Tau:

O declínio das funções cognitivas é caracterizado por alterações bioquímicas e estruturais que ocorrem no cérebro dos pacientes acometidos, levando à perda neuronal, à degeneração das sinapses e comprometimento da neurotransmissão (Gandy, 2005; Thomas et al, 2008). Em seu primeiro relato de caso de DA em 1907, Alois Alzheimer descreveu duas lesões patológicas, como agrupamentos proteicos, no cérebro, que se mostraram características da doença (Goedert e Spillantini, 2006; Nixon, 2007): as placas senis e os emaranhados neurofibrilares (Forlenza e Caramelli, 2000;

Annaert e Strooper, 2002; Mudher e Lovestone, 2002; Waldau e Shetty, 2008). Estes agregados proteicos são encontrados nas mesmas proporções dos observados em ambas as formas desta doença (Annaert e Strooper, 2002).

A DA é uma doença de etiologia multifatorial, sendo a sua patogenia acompanhada de modificações em inúmeros processos homeostáticos. Diversos estudos independentes têm proposto uma ligação entre as lesões patológicas e citopatologia neuronal com, entre outros, o genótipo da apolipoproteína E, hiperfosforilação das proteínas do citoesqueleto, estresse oxidativo, divisão celular anormal, desajustes do metabolismo lipídico e energético, inflamação e metabolismo da proteína precursora do amilóide (APP) (Kar et al, 2004; Zhu et al, 2006). Estudos recentes têm também associado esses mecanismos neuropatológicos a um desequilíbrio da ação da enzima glicogênio sintase quinase 3B (GSK3B) (Grimes e Jope, 2001; Padovani et al, 2001^a, Irizarry, 2004).

As placas senis correspondem a lesões extracelulares e têm, como principal componente, os peptídeos de beta-amilóide (A β), originados a partir da clivagem da APP pela enzima β -secretase (Wolfe e Guénette, 2007). Estas placas são formadas anos antes do aparecimento dos sintomas clínicos da doença (Waldau e Shetty, 2008). A APP é uma proteína transmembrana tipo I constituída por um largo domínio extracelular e um curto domínio citoplasmático (Annaert e Strooper, 2002), o que sugere que esta proteína pode agir como um receptor (Neve et al, 2000; Gralle e Ferreira, 2007). É uma das proteínas mais abundantes do sistema nervoso

central, expressa predominantemente em neurônios. A alta concentração da APP nas células da glia, que direciona futuros neurônios para as posições corretas no córtex embrionário, sugere que esta adesão é promovida pela APP, conferindo importante papel no desenvolvimento cerebral e na comunicação intercelular cerebral. Além disso, é descrita a importância da APP na formação das sinapses funcionais e também na maturação dos subtipos específicos de neurônios assim como também em mecanismos fisiológicos (transporte e sinalização neurotrófica, adesão e sinalização celular) (Gralle e Ferreira, 2007; Nixon, 2007). Danos no tecido cerebral induzem a expressão da APP, sugerindo que esta proteína exerce também um papel no reparo celular, além de servir como molécula de adesão: se liga a proteínas da matriz extracelular, como heparina e colágeno. (Wolfe e Guénette, 2007).

Periféricamente, a APP também ocorre em outros tecidos, como células musculares, epiteliais e sanguíneas. Dentre estas, as plaquetas são uma importante fonte, pois contêm mais de 95% da APP circulante (Di Luca et al, 2000; Padovani et al, 2001b; Evin et al, 2003; Kar et al, 2004; Zainaghi et al, 2007). Esta proteína apresenta múltiplas isoformas (APP695, APP751 e APP770) derivadas de um mesmo gene localizado no cromossomo 21, derivadas a partir de um único mRNA (figura 1). As plaquetas também apresentam concentrações das isoformas da APP equivalentes às encontradas no tecido cerebral, com exceção da isoforma 695, que é abundante no cérebro e praticamente indetectável em plaquetas, onde a mais abundante é a isoforma 770 (Padovani et al, 2001b).

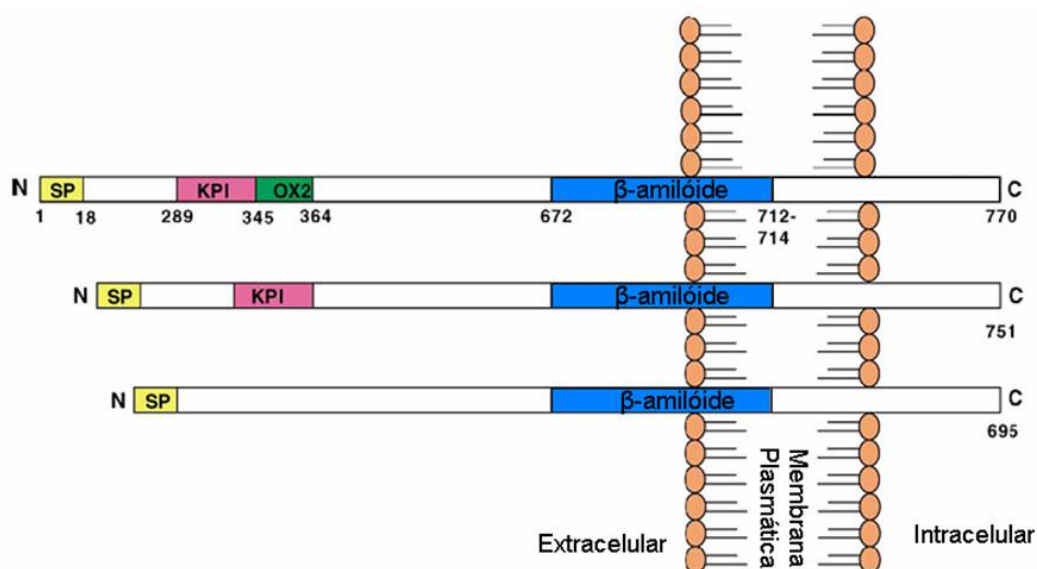


Figura 1 - Esquema da APP e suas três principais isoformas. APP apresenta um extenso prolongamento extracelular amino-terminal, uma porção transmembrana e uma curta porção carboxi-terminal intracelular. Fonte: Andreasen e Blennow, 2002.

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

A clivagem da APP pode ocorrer por duas vias metabólicas alternativas — via amiloidogênica e via não-amiloidogênica — sendo mediada pelo menos por três enzimas proteolíticas: α , β e γ -secretases (Racchi e Govoni 2003). Na via não-amiloidogênica, a clivagem da APP ocorre sob ação da enzima α -secretase na superfície celular. Uma porção N-terminal grande e solúvel (sAPP α) é liberada e, esta, posteriormente clivada pela enzima γ -secretase liberando um pequeno peptídeo. Esta via de metabolismo é a mais comum em indivíduos saudáveis. Na via amiloidogênica,

a clivagem da APP ocorre sob ação da enzima β -secretase na porção aminoterminal onde um fragmento β -sAPP é liberado. O fragmento carboxiterminal é clivado pela γ -secretase, originando o peptídeo A β . (Kar et al, 2004) (figura 2).

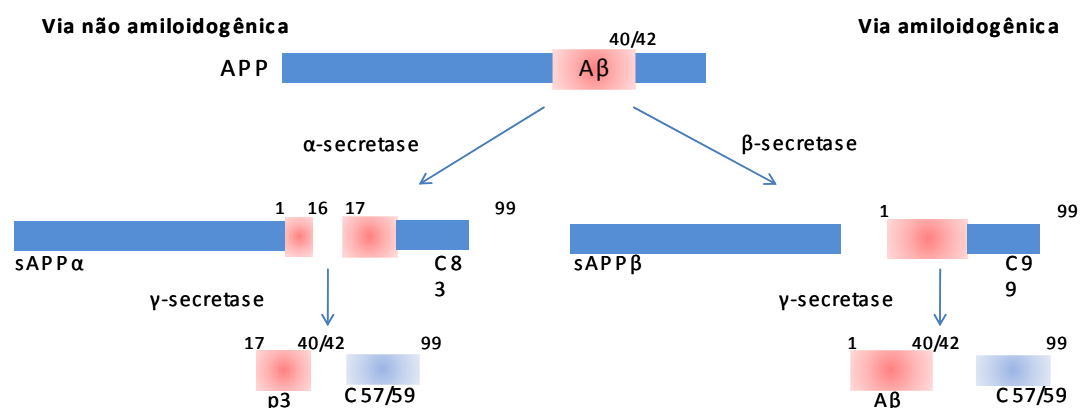


Figura 2 - Esquema do processamento proteolítico da APP, evidenciando as vias amiloidogênica e não-amiloidogênica. Fonte: www.bioinformatics.leeds.ac.uk

Na maior parte das células periféricas, a APP é clivada pela α -secretase entre o resíduo de lisina 16 e leucina 17 (o primeiro aspartato da sequência do peptídeo amilóide recebe o número 1), na via não-amiloidogênica. Diversos estudos mostram que membros da família de metaloproteases (ADAM) podem estar envolvidos no processamento da APP pela α -secretase (Annaert e Strooper, 2002; Evin et al, 2003; Racchi e Govoni, 2003; Turner et al, 2004). A ADAM10 é a maior candidata por esta clivagem já que a partir dela, a liberação e secreção do ectodomínio da APP encontram-se aumentados (Annaert e Strooper, 2002).

A liberação do peptídeo A β requer a atividade da β - e γ - secretases (Turner et al, 2004). A atividade da β -secretase é caracterizada pela BACE:

proteína de membrana tipo I altamente expressa no cérebro e no pâncreas, diferindo dos outros tecidos periféricos, onde sua expressão é menor (Racchi e Govoni, 2003). Alguns autores utilizam o nome BACE-1 porque reflete a atividade da proteína e seu gene está localizado no cromossomo 11. Uma segunda β -secretase identificada como BACE-2 é codificada pelo gene localizado na região do cromossomo 21, apresentando 64% de homologia com a BACE-1 (Annaert e Strooper, 2002). Em estudos em animais deficientes em BACE-1 mostram que a atividade de BACE-2 pode compensar a atividade de BACE-1 já que os animais permaneceram normais até um ano de idade. Por outro lado, a atividade de β -secretase mostrou-se completamente abolida, confirmando que a BACE-1 é a principal β -secretase (Annaert e Strooper, 2002).

A última etapa da via amiloidogênica consiste na ação da γ -secretase sobre o resíduo transmembrana da APP clivada pela BACE, ocorrendo assim a liberação do peptídeo A β . Esta clivagem ocorre dentro da membrana plasmática e pode produzir dois diferentes fragmentos C-terminais com 40 ou 42 aminoácidos (de acordo com a sequência numérica do A β) (Racchi e Govoni, 2003), sugerindo a existência de múltiplas variações desta ação (Turner et al, 2004).

A γ -secretase é uma aspartil protease complexa composta por quatro componentes centrais: i) PS-1 e PS-2 (presenilina-1 e presenilina-2); ii) Nct (nicastrina); iii) APH-1 (*anterior pharynx-defective phenotype*) e iv) PEN2 (presenilina enhancer-2) (Cohen e Goedert, 2004) (Figura 3). Aparentemente as duas presenilinas, PS1 e PS2, são de extrema importância para a

atividade da γ -secretase (Turner et al, 2004). Alguns autores têm sugerido que as presenilinas estejam diretamente relacionadas à atividade da γ -secretase ou ainda que sejam a própria γ -secretase, uma vez que animais *knockout* para o gene da PS1 apresentam importante redução na geração do peptídeo A β , e *knockouts* para os genes da PS1 e PS2 não apresentam nenhuma geração de A β . A importância das presenilinas na atividade da γ -secretase também é evidenciada quando inibidores da γ -secretase se ligam diretamente às presenilinas, mostrando que provavelmente as presenilinas forneçam o sítio catalítico central para a atividade do tipo aspartil protease da γ -secretase (Wolfe e Haass, 2001; Haass, 2004).

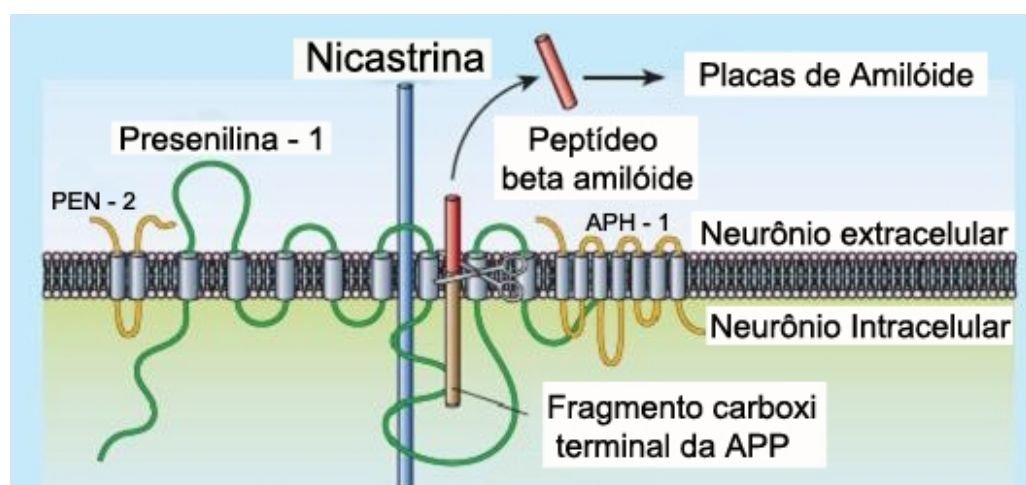


Figura 3 - Ilustração da enzima γ -secretase clivando a APP e liberando o peptídeo β -amilóide. Fonte: De Strooper e Woodgett, 2003.

Um distúrbio no processamento da APP pode favorecer a formação do A β , em detrimento da formação de formas solúveis de APP (APPs), que são originadas a partir da clivagem da APP pela enzima α -secretase. Como essas duas vias metabólicas são mutuamente exclusivas, a ativação da via amiloidogênica leva à produção excessiva e à agregação dos peptídeos A β

em tecidos cerebrais, desencadeando a “cascata do amilóide”, que conduz à formação das placas senis e dos emaranhados neurofibrilares (Haass e Selkoe, 1993; Skovronsky et al, 2001). Portanto, as anormalidades bioquímicas do metabolismo da APP que levam à formação de agregados de A β levam também à desregulação de sinais intracelulares que contribuem adicionalmente para a hiperfosforilação da proteína TAU (Lovestone et al, 2002; Kar et al, 2004).

A proteína TAU é predominantemente expressa em axônios e é um componente normal do citoesqueleto neuronal, tendo grande importância na estabilização dos microtúbulos, função esta, regulada a níveis protéico e genético. A hiperfosforilação da TAU resulta na perda de função desta proteína nos microtúbulos, contribuindo para a vulnerabilidade dos neurônios e induzindo a degeneração celular (Frame et al, 2001; Lovestone et al, 2002; Kar et al, 2004; Ballatore et al, 2007). Os microtúbulos são necessários para a extensão e manutenção dos neurônios, assim como também são necessários para o transporte de materiais ao longo do axônio e dendritos em ambas as direções (Strittmatter et al, 1995).

Esta proteína é o principal componente dos emaranhados neurofibrilares. Esses emaranhados são caracterizados pela presença de filamentos localizados no citoplasma das células contendo a forma anormal hiperfosforilada da proteína TAU. O estado de hiperfosforilação da proteína TAU na DA pode causar a dissociação desta nos microtúbulos (Grimes e Jope, 2001). De acordo com a densidade e tamanho destes filamentos, estes podem distorcer o corpo da célula e também distorcer seu núcleo

alterando sua atividade, podendo levar o neurônio à morte (Strittmatter et al, 1995; Kar et al, 2004). A fosforilação desta proteína diminui com o decorrer da idade, mostrando-se mais fosforilada em fetos (TAU fetal) que a TAU adulta, em sujeitos saudáveis (Frame et al, 2001). O conhecimento dos produtos do metabolismo da APP e a determinação da proteína TAU em diferentes estados de fosforilação têm proporcionado o desenvolvimento de testes laboratoriais que melhoram a acurácia do diagnóstico clínico. Esses testes podem ser baseados em diferentes matrizes biológicas, tais como o líquido cefalorraquidiano (LCR), soro e plaquetas. (Rosenberg et al, 1997; Di Luca et al, 1998; Blennow, 2004;).

Muitas evidências sugerem que os processos que levam às anormalidades encontradas na DA, isto é, a formação de placas senis e emaranhados neurofibrilares, estão ligados aos efeitos da enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) sobre a sinalização intracelular. A fosforilação da proteína TAU é regulada predominantemente pela GSK3 *in vitro*, em células e em modelos animais (figura 4). Estudos mais recentes sobre o metabolismo da APP resultaram em um aumento da forma patogênica de A β , mostrando que este processo pode ser GSK3 dependente (Hye et al, 2005).

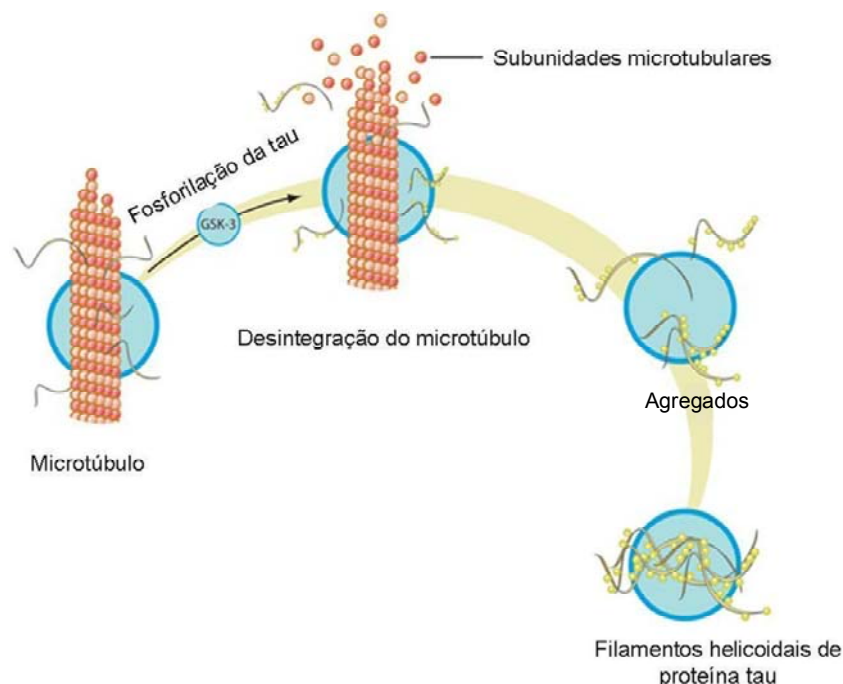


Figura 4 - Inibição da GSK3 regula a fosforilação da tau em neurônios
 Fonte: <http://www.geriaticsandaging.ca/images/2008/CCD4/ccdgsksfig1.jpg>

1.3. Glicogênio sintase quinase 3B:

A glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) é uma serina-treonina cinase multifuncional, originalmente identificada como enzima reguladora do metabolismo do glicogênio (Chin et al, 2005; Balaraman et al, 2006; Peineau et al, 2008). Está presente em vários sistemas biológicos (Gould e Manji, 2005; Forde e Dale, 2007) e influencia mecanismos de sinalização celular, controle metabólico, embriogênese, morte celular, oncogênese, organização do citoesqueleto e controle transcricional (Balaraman et al, 2006; Jope et al, 2007; Muylleert et al, 2008). As várias funções reguladas pela GSK3 (através da fosforilação de diversos substratos) sugerem que a atividade da GSK3 deve ser finamente regulada (Jope et al, 2007).

A GSK3 apresenta duas isoformas descritas em mamíferos, e ambas estão presentes em plaquetas humanas: GSK3A e GSK3B, com pesos moleculares de 51KDa e 47KDa, respectivamente. Estas duas proteínas são codificadas de maneiras diferentes, porém reguladas de forma semelhante (Frame et al, 2001; Barry et al, 2003; Fuentealba et al, 2004).

Diversas vias de sinalização contribuem para a regulação da GSK3 (Jope e Johnson, 2004). A atividade de ambas as isoformas da GSK é regulada fundamentalmente pela fosforilação, num processo dependente do balanço entre diversas cinases e fosfatases protéicas. A atividade da GSK é também regulada pela formação de complexos protéicos e por sua distribuição intracelular. A forma ativa da GSK corresponde à sua forma não fosforilada, sendo esta enzima *inativada* pela fosforilação em resíduos de serina 9, no caso da GSK3B, ou no resíduo de serina 21 no caso da GSK3A (Klein e Melton, 1996; Doble e Woodgett, 2003). Por outro lado, a fosforilação de resíduos de tirosina 216 (ou 279 para GSK3A) leva à ativação da enzima. A fosforilação do resíduo tirosina 216 da GSK3B também é favorecido por níveis fisiológicos de cálcio e por mensageiros da cascata da apoptose, que aumentam, portanto, a atividade da GSK3B (Kaytor e Orr, 2002) (figura 5).

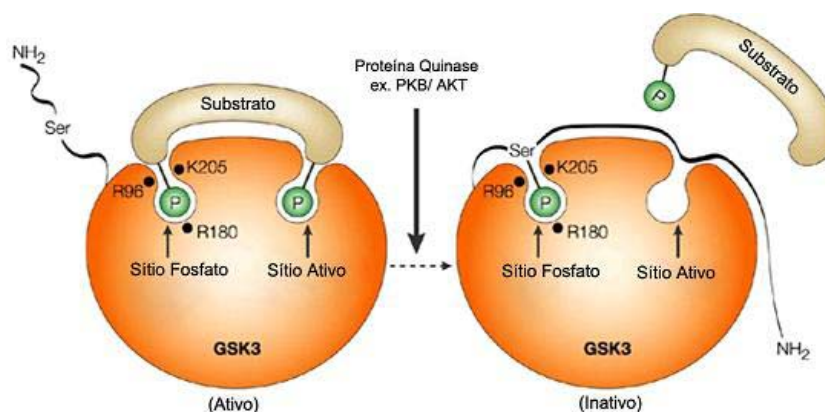


Figura 5 – Mecanismo molecular de inibição da GSK3B
 Fonte: Cohen e Frame, 2001.

A GSK3B é altamente expressa no sistema nervoso central, principalmente no cérebro, e tem importante papel homeostático nas diversas cascatas bioquímicas como regulação da plasticidade e sobrevivência neuronal (Grimes e Jope, 2001; Planel et al, 2002). Além disso, ela é um importante modulador da apoptose, fenômeno precedido por aumento da atividade enzimática. A atividade da GSK3B parece estar inversamente relacionada à viabilidade neuronal. Especula-se que a ativação inadequada da enzima pode comprometer a habilidade do neurônio regular sua expressão gênica em resposta a vários estímulos (Kaytor e Orr, 2002).

Durante o processo de desenvolvimento cerebral, a GSK3B encontra-se mais expressa quando comparada ao cérebro adulto. Nos neurônios, onde é mais abundante do que nos astrócitos, a GSK3B modula uma série de processos de sinalização intracelular, e regula fatores de transcrição que controlam a expressão gênica. Logo, a enzima exerce funções que englobam desde a sobrevivência celular, o metabolismo e processamento de proteínas, até processos cognitivos. Um grande número de vias de

sinalização converge sobre a GSK, destacando-se aquelas desencadeadas pela estimulação de receptores de insulina e do fator de crescimento insulina-símile (ILGF) (Gould e Manji, 2005). A GSK3A tem uma participação preponderante no metabolismo energético, regulando a síntese do glicogênio em hepatócitos. Aliás, a enzima recebe esse nome devido a sua capacidade de fosforilar e, conseqüentemente, inativar a enzima glicogênio sintase, necessária para desencadear esse processo.

Devido à ampla distribuição tecidual da GSK e o envolvimento desta cinase em diferentes vias de sinalização celular, a GSK tem sido objeto de estudos em doenças sistêmicas (diabetes, câncer, inflamação) e cerebrais, incluindo transtornos neurodegenerativos e psiquiátricos (Dugo et al, 2007). Alterações da atividade da GSK3B podem estar relacionadas ao desenvolvimento do transtorno bipolar e da demência de Alzheimer.

Estudos imuno-histoquímicos mostraram associação da GSK3B com os emaranhados neurofibrilares no cérebro de pacientes com DA, com aumento da expressão e atividade da enzima. Além disso, diversos estudos têm demonstrado que a GSK3B interage com a APP, favorecendo a clivagem amiloidogênica. O A β , por sua vez, é capaz de favorecer a ativação da GSK3B, o que por sua vez leva à hiperfosforilação da TAU, contribuindo assim para a formação das placas senis e dos emaranhados neurofibrilares (Grimes e Jope, 2001). Portanto, no que se refere à neurobiologia desta demência, a GSK3B exerce um papel importante nos dois principais mecanismos patogênicos, ou seja, na regulação do metabolismo da APP e da fosforilação da proteína TAU. Perturbações do ajuste de sua função

levam à hiperatividade da GSK3B, contribuindo para a produção excessiva do peptídeo A β e para a hiperfosforilação da proteína TAU. Esses dois processos bioquímicos são os pontos de partida para a formação, respectivamente, das placas senis e dos emaranhados neurofibrilares (Klein e Melton 1996).

1.4. Biomarcadores para DA:

A escassez de ferramentas diagnósticas de maior precisão para o diagnóstico da doença de Alzheimer compromete a predição e o acompanhamento da evolução desta doença. O uso dos biomarcadores poderia aumentar potencialmente a especificidade do diagnóstico e consequentemente tornar este grupo de sujeitos mais homogêneo (Lovestone et al, 2007). Os biomarcadores fornecem, ao menos, uma direção no processo de evolução da doença ou idealmente, se relaciona com o mecanismo primário da mesma e refletindo aspectos gerais da sua patogenia (Blennow, 2004; Borroni et al, 2006). Além disso, um marcador diagnóstico deve ter sensibilidade e especificidade mínimas de 80% para ter aplicação clínica (Blennow, 2004).

Atualmente o diagnóstico da doença de Alzheimer é baseado na exclusão de outras causas de demência realizados por meio de avaliações clínicas e neuropsiquiátricas (Andreasen e Blennow, 2005).

O processo degenerativo desta neuropatologia provavelmente se inicia 20 a 30 anos antes do aparecimento dos sintomas clínicos (Andreasen

e Blennow, 2005; Borroni et al, 2006). Com isso, se um biomarcador pudesse refletir a progressão da doença, refletindo, por exemplo, a degeneração neuronal, o metabolismo da APP e a degradação do citoesqueleto neuronal, isto teria grande importância na prática clínica uma vez que nesta fase da doença, os sintomas são bastante vagos (Andreasen e Blennow, 2005; Lovestone et al, 2007). Durante o período pré-clínico, a quantidade de placas senis e emaranhados neurofibrilares aumenta até o considerado “limiar” para os primeiros sintomas que normalmente é caracterizado pelo comprometimento da memória episódica (Borroni et al, 2006).

Atualmente, o principal objetivo da pesquisa sobre a DA é a identificação de biomarcadores no sentido de facilitação do desenvolvimento de ferramentas para a detecção precoce da doença (Racchi et al, 2008).

O uso de biomarcadores do LCR é considerado o mais fidedigno uma vez que o LCR está em contato direto com o (espaço extracelular do) cérebro, além de apresentar o maior potencial de aplicação clínica num futuro próximo. Alterações bioquímicas características do processo patológico do cérebro refletem nesta matriz, considerada “uma janela do cérebro” (Andreasen e Blennow, 2005). As concentrações diminuídas de fragmentos do peptídeo beta-amilóide ($A\beta_{42}$) e aumentadas da proteína TAU no LCR, ao lado de métodos de neuroimagem funcional, como a tomografia por emissão de pósitrons (PET) permitindo a identificação *in vivo* dos acúmulos de $A\beta$ nos tecidos cerebrais, abriram uma nova perspectiva para o diagnóstico precoce desta doença (Hampel et al, 2004; Irizarry et al, 2004).

Entretanto, sua aplicabilidade na prática clínica apresenta algumas limitações como a necessidade de punção lombar para a obtenção das amostras, ao lado de restrições inerentes aos métodos de análise, o que limita sua utilização mais ampla em pacientes com CCL e DA (Lewczuk et al, 2006).

Todavia, a identificação de biomarcadores no sangue é uma alternativa desejável, por ser menos invasiva e mais tolerável para os pacientes, favorecendo a realização de determinações prospectivas, com múltiplas determinações (Hampel et al, 2004; Irizarry et al, 2004; Hansson et al, 2006; Diniz et al, 2008) (figura 6).

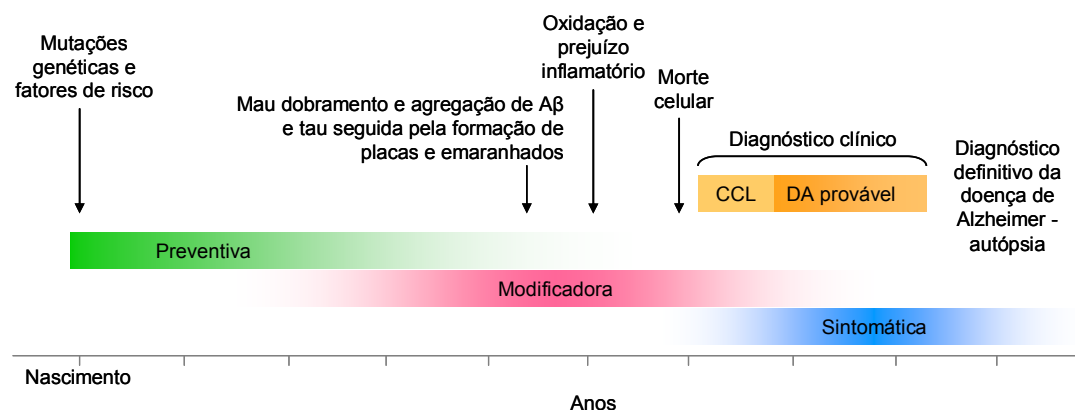


Figura 6 – Linha do tempo hipotética da progressão da DA esporádica e DA familiar. Fonte: Shaw et al, 2007.

A determinação da atividade da enzima GSK3B em células sanguíneas também representa um possível marcador do processo patogênico desta doença, já que as duas isoformas da GSK (A e B) estão presentes em plaquetas (Barry et al, 2003) e leucócitos humanos (Hye et al, 2005). Em leucócitos de pacientes com DA, observa-se um aumento da proporção da forma ativa (não-fosforilada) em relação à forma inativa

(fosforilada) da enzima, sugerindo um desvio da regulação desta cinase favorecendo a hiperfosforilação da proteína TAU. Como esse achado também foi registrado em pacientes com CCL, é possível que esta desregulação seja um evento precoce na patogenia da doença de Alzheimer, sendo o achado em leucócitos um possível correlato periférico das alterações que ocorrem em tecidos cerebrais, e sustentando o potencial dessa análise laboratorial como um novo biomarcador periférico da doença (Hye et al, 2005).

Os produtos da clivagem da APP plaquetária têm sido considerados candidatos a biomarcadores para a DA. Além disso, a presença das mesmas formas de APP secretadas no cérebro e nas plaquetas, mostram que estas possuem atividade das 3 enzimas envolvidas no processo de clivagem da APP: α -, β - e γ - secretases, sugerindo que podem processar a APP via dois mecanismos fisiológicos: as vias amiloidogênica e não-amiloidogênica (Evin et al, 2003). A maior parte de estudos neste modelo demonstram que a razão entre fragmentos de APP de 120-130kDa e fragmentos de 110kDa está diminuída em pacientes com DA (Di Luca et al, 1998; Tang et al, 2006; Zainaghi, 2006; Zainaghi et al, 2007).

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados presentes no sangue e produzidos a partir de megacariócitos da medula óssea e estão diretamente envolvidas em diversas patologias importantes, sejam estas síndromes ou quadros trombóticos graves como trombose arterial. A membrana plaquetária é rica em glicoproteínas, que servem como alvos para as reações de adesão, ou como receptores, desencadeando a ativação

plaquetária. Na zona periférica, encontram-se os fosfolipídeos de membrana, importantes para a coagulação. As plaquetas contêm três tipos de grânulos: grânulos densos, α -grânulos e lisossomos (componentes celulares). (Castro et al, 2006). O citoesqueleto plaquetário é responsável por manter a forma discóide da plaqueta que, sob ativação, juntamente com o sistema contrátil, permite a mudança desta forma exibindo prolongamentos de pseudópodos, contração interna e a liberação dos constituintes granulares (Castro et al, 2006; Mohammed e Rosado, 2009). Os principais ativadores plaquetários fisiológicos são: trombina, colágeno, adrenalina, vasopressina e serotonina. A membrana das plaquetas contém vários tipos de receptores em sua superfície, que respondem aos estímulos externos, podendo ser uma resposta inibitória ou de ativação (Holmsen, 1991). As plaquetas podem ser também ativadas por diversos agonistas que são liberados na circulação durante algumas condições patológicas, como diabetes e hipertensão (Mohammed e Rosado, 2009).

O uso das plaquetas como um marcador periférico do metabolismo cerebral é baseado nas similaridades entre plaquetas e neurônios: plaquetas estocam e liberam neurotransmissores nos grânulos densos, como 5-HT, ADP e ATP; a liberação dos grânulos densos é controlada pela concentração intracelular de cálcio (a concentração de Ca^{2+} controla diferentes aspectos da função plaquetária como a sua ativação, alteração da forma, secreção e agregação); as plaquetas expressam algumas proteínas de membrana relacionada com neurônios como os receptores N-metil D-aspartato (NMDA); e as plaquetas são capazes de modificar a membrana

plasmática, gerando processos semelhantes à neuritos (Bush e Tanzi, 1998; Di Luca et al, 2000; Mohammed e Rosado, 2009). Estudos realizados em plaquetas de pacientes com DA moderada e grave mostraram anormalidades citoesqueléticas, fluxo citoplasmático anormal de cálcio, atividade anormal no transportador de glutamato, atividade diminuída de fosfolipases e aumento os níveis citoplasmáticos de proteína quinase C. Além disto, vários laboratórios descrevem alterações no metabolismo e na concentração de APP em plaquetas de pacientes com DA (Di Luca et al, 2000; Casoli et al, 2008).

De acordo com estas observações, as plaquetas podem ser consideradas uma célula ideal para se estudar mecanismos metabólicos, espelhando num compartimento periférico, a evolução de processos bioquímicos relacionados com a DA, que ocorrem no sistema nervoso central. Também devem ser mencionadas a facilidade e conveniência na obtenção das plaquetas, que também é característica de um candidato a marcador bioquímico (Padovani et al, 2001a). A manipulação de plaquetas humanas exige cuidados metodológicos especiais, em função do risco de modificação desse sistema biológico pela ativação *in vitro*. Nosso grupo tem grande conhecimento e experiência na experimentação com plaquetas, na pesquisa de correlatos biológicos dos achados clínicos em pacientes com transtornos neuropsiquiátricos (Gattaz et al, 2004). Desse modo, justificam-se as propostas do presente estudo.

1.5. Avaliação clínica dos pacientes:

Segundo o DSM-IV, o critério para o diagnóstico da doença de Alzheimer requer o comprometimento do desempenho em dois ou mais domínios cognitivos, um dos quais deve ser a memória, e incluindo linguagem, cálculo, orientação, julgamento ou funções executivas (Irvine et al, 2008).

A comprovação do diagnóstico de demência depende de avaliação objetiva das funções cognitivas e um dos testes de avaliação global mais empregado é o Mini Exame do Estado Mental (MEEM) de Folstein et al, (1975). O MEEM permite avaliar a orientação espacial e temporal, memória de fixação, atenção e cálculo, linguagem, praxia e habilidades construtivas. (Diniz et al, 2007). A limitação do MEEM é a influência da escolaridade. Desta forma, dependendo do nível de escolaridade do paciente, pontos de cortes específicos devem ser utilizados. A associação de outros testes ao MEEM, como testes de memória e fluência verbal aumentam a sensibilidade do diagnóstico. A investigação complementar da demência inclui exames de sangue, exames de neuroimagem e em algumas situações especiais podem ser realizados exames no LCR e eletroencefalograma (Caramelli e Nitrini, 1997).

O CAMDEX é um questionário estruturado baseado em três principais sessões: (1) entrevista clínica estruturada com o paciente para obtenção de informações sobre seu histórico e situação presente, além do histórico familiar; (2) testes cognitivos que constituem uma mini bateria

neuropsicológica; (3) entrevista estruturada com um parente ou outro informante a fim de obter informações independentes sobre o histórico, situação presente e histórico familiar do paciente. O CAMDEX é aceitável para os pacientes e apresenta alta sensibilidade inter-observador e também em relação aos testes cognitivos (Roth et al, 1986). O CAMCOG é a seção B do CAMDEX (Cambridge Examination for Mental Disorders of the Elderly), uma entrevista estruturada para o diagnóstico de doenças neuropsiquiátricas relativas ao envelhecimento, principalmente o diagnóstico de demência em estágios iniciais. É um teste neuropsicológico que inclui, além dos 19 itens do MEEM, questões que se referem à percepção e ao pensamento abstrato. Neste teste são avaliadas as seguintes áreas da cognição: orientação, linguagem, memória, atenção, cálculo, praxia, pensamento abstrato e percepção. O CAMCOG consiste em 60 itens com escore máximo de 107 pontos, sendo o ponto de corte sugerido pelos autores 79/80 para discriminar entre pacientes com demência e sujeitos normais (Nunes et al, 2008).

2. OBJETIVOS

Otimização da técnica de *Western blot* para GSK3B (GSK total e fosfo-GSK) e determinação, em plaquetas de pacientes com doença de Alzheimer, comprometimento cognitivo leve e idosos normais: (1) a razão entre os fragmentos de APP de 110kDa e 130kDa (APP_r); (2) a proporção entre as formas inativa e ativa da GSK3B (fosfo-GSK : GSK total); (3) a correlação entre estes achados; e (4) correlação entre parâmetros bioquímicos e parâmetros cognitivos, sobretudo o desempenho em testes de memória.

3. MÉTODOS

3.1. Casuística

3.1.1. Caracterização clínica dos pacientes e controles

Todos os sujeitos deste estudo foram recrutados a partir de coorte de idosos em seguimento regular no Ambulatório de Psicogeriatria do LIM-27 do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, como parte de um estudo longitudinal sobre envelhecimento e memória.

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

A avaliação neuropsicológica foi realizada por neuropsicólogos do ambulatório de Psicogeriatria do LIM-27 e incluiu os testes RBMT (*Rivermead Behavioral Memory Test*, Wilson, 1985; Oliveira, 1999), FOME (*Fuld Object-Memory Evaluation*, Fuld, 1980), SKT (*Short Cognitive Test*, Erzigkeit, 1991; Flaks, 2006), Trilhas A e B (Army, 1944), WAIS-R (*Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised*) – vocabulário e cubos (Wechsler, 1981).

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

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

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

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (nº do protocolo: 1204/05).

O diagnóstico clínico de consenso foi realizado por uma equipe multidisciplinar, incluindo médicos (psiquiatras, neurologista e geriatra), neuropsicólogas, fonoaudióloga, fisioterapeuta e terapeuta ocupacional. Nesses encontros foram discutidos os dados clínicos, psicométricos, laboratoriais e de neuroimagem, através dos quais foram estabelecidos os diagnósticos de consenso. Os pacientes foram divididos em três grupos de acordo com o diagnóstico: (1) idosos cognitivamente saudáveis (controles); (2) portadores de comprometimento cognitivo leve; e de (3) doença de Alzheimer.

3.1.2. Cálculo amostral

O cálculo do tamanho da amostra considerou um desvio-padrão de 0,21 para APP_r, conforme avaliado no estudo de Zainaghi et al, (2007). Foi considerado um valor $\alpha=0,05$ (intervalo de confiança de 95%), para detectar uma diferença média de 0,15 entre os grupos, sendo estimada uma amostra mínima de 18 indivíduos em cada grupo. Como não existem estudos de GSK3B em plaquetas, utilizaremos a amostra mínima definida para determinação de APP também para determinação de GSK3B. Sendo assim, foi proposto o recrutamento de 25 indivíduos com DA leve ou moderada, 25 indivíduos com CCL e 25 indivíduos idosos para o grupo controle.

3.1.3. Recrutamento de pacientes

Foram colhidas amostras de sangue de 65 sujeitos em seguimento no Ambulatório de Psicogeriatria do LIM-27, sendo 22 pacientes com DA, 21 com CCL e 22 controles.

A idade média dos indivíduos envolvidos no estudo foi estatisticamente diferente entre os grupos. Quanto ao sexo, todos os grupos também apresentaram diferenças estatísticas. A escolaridade foi avaliada quanto aos anos de estudo e os grupos DA e CCL apresentaram médias próximas diferente do grupo controle que apresentou aproximadamente 14 anos de escolaridade (tabela 1).

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

	Controle (n = 22)	CCL (n = 21)	DA (n = 22)	p-valores
Idade (média ± DP) ^a	71,3 ± 4,6	70,2 ± 6,1	77,2 ± 6,5	0,001
Sexo (n) ^b	16 F, 6 M	19 F, 2 M	12 F, 10 M	0,05
Escolaridade (média dos anos de estudo ± DP) ^c	14,5 ± 4,9	7,9 ± 4,5	7,3 ± 5,4	0,000

CCL, comprometimento cognitivo leve; DA, doença de Alzheimer; F, feminino; M, masculino; *One-way ANOVA, teste Bonferroni post-hoc, valores significativos: (a) Controle x DA, p = 0,006; CCL x DA, p = 0,001; (b) CCL x DA, p = 0,019; (c) Controle x CCL, p < 0,001; Controle x DA, p < 0,001.

Foram analisados os prontuários dos pacientes participantes do estudo para consulta dos medicamentos em uso na ocasião da coleta de sangue. O objetivo deste procedimento foi classificar os medicamentos com

potencial efeito modificador da atividade da GSK3B. Essas informações são apresentadas na tabela 2, abaixo, sendo que a categoria 'diversos' envolve medicamentos com menor potencial de interferência na atividade enzimática, ou cuja ocorrência foi esporádica (inclui anti-hipertensivos, antilipemiantes, reposição tireoideana e do metabolismo ósseo, antiulcerosos, indutores de sono, anti-parkinsonianos e fitoterápicos).

Tabela 2: Medicamentos em uso por pacientes dos três grupos diagnósticos em estudo.

Medicamentos/Diagnóstico	DA	CCL	Controle
Antidepressivos	11	2	2
Hipoglicemiantes	1	-	1
Inibidores de Colinesterase	17	-	-
Antipsicóticos	5	-	-
Antiepiléticos	1	-	-
Diversos	11	10	18

3.2. Procedimentos laboratoriais

As análises laboratoriais deste projeto de pesquisa foram realizadas no Laboratório de Neurociências (LIM-27) do Departamento e Instituto de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da USP.

3.2.1. Obtenção e preparo das plaquetas:

Nos procedimentos de coleta de sangue e preparo das plaquetas, foram tomados cuidados especiais para prevenir a agregação e a ativação das mesmas (tais como a coleta e o manuseio das amostras em tubos plásticos, uso do *scalp* 21 e mínima permanência do torniquete no momento da punção). As amostras foram processadas no máximo 30 minutos após as coletas e foram mantidas a temperatura ambiente, durante o procedimento.

Foram utilizados dois diferentes protocolos para o preparo das amostras, descritos abaixo:

Preparo 1 - Foram coletados de cada sujeito 15 mL de sangue em tubos a vácuo tipo *monovet* contendo anticoagulante citrato de sódio. Adicionou-se 200 µL de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 0,09 M para cada 10 mL de sangue. Os tubos foram homogeneizados delicadamente por inversão e centrifugados por 10 minutos a 1300 rpm a 20°C. O sobrenadante PRP (plasma rico em plaquetas) foi então transferido para tubo com capacidade de 15 mL (tipo cônico) e centrifugado por 15 minutos a 2400 rpm a 20°C, recuperando-se o *pellet* de plaquetas, que em seguida foi lavado com 5 mL de Tris 10 mM, pH = 7,4 e, novamente centrifugado a 2400 rpm por 5 min. O novo *pellet* foi então ressuspendido com uma solução contendo: 800 µL de tampão de lise, 8 µL de inibidor de protease e 8 µL de PMSF (fenilmetilsulfonilflúor). Em seguida, a amostra foi congelada por 30 minutos a -70°C para otimização do processo de lise. Depois deste tempo, a amostra

foi descongelada por 30 minutos, a temperatura ambiente e foi aliquoteada em criotubos, cada um com 400 μ L de amostra e foram armazenadas à -70°C até o momento do uso.

Preparo 2 - Foram coletados 20 mL de sangue em tubos à vácuo do tipo *monovet* contendo anticoagulante citrato de sódio. Em cada tubo foi adicionado 1 mL de ACD-NH. Homogeneizou-se delicadamente por inversão e centrifugou-se durante 15 minutos a 1600 rpm a 20°C . O sobrenadante PRP foi transferido para tubo com capacidade de 50 mL (tipo cônico) e o pH ajustado para 6,5 com ACD-NH. Transferiu-se o PRP para 2 tubos de poliestireno. Centrifugou-se durante 10 minutos a 2400 rpm a 20°C . O sobrenadante foi removido cuidadosamente por inversão. Adicionou-se 2,5 mL de solução de lavagem e deixou-se descansar 10 minutos. As plaquetas foram cuidadosamente homogeneizadas com pipeta e adicionou-se mais 2,5 mL de solução de lavagem. Centrifugou-se por 8 minutos a 2400 rpm. Removeu-se cuidadosamente o sobrenadante e cada *pellet* foi ressuspensa delicadamente com 500 μ L de tris-sacarose. As plaquetas foram armazenadas em criotubos e mantidas em freezer -70°C .

3.2.2. Determinação da quantidade de proteínas nas amostras

Após os preparos da amostra conforme citado anteriormente, uma alíquota de 50 μ L foi destinada à determinação de proteínas totais. As proteínas foram quantificadas utilizando o kit Bio-Rad *DC Protein assay* (Bio-

Rad Hercules) que é um ensaio colorimétrico para a determinação de proteínas, baseado no método de *Lowry* (Lowry et al, 1951). O ensaio consiste na reação de proteínas com uma solução alcalina de tartarato de cobre (Reagente A) e com o reagente de Folin (*1,2-naphthoquinone-4-sulfonate*) (Reagente B). Como no ensaio de *Lowry*, existem duas etapas que levam ao desenvolvimento da cor: 1) a reação entre proteínas e o cobre em um meio alcalino, e 2) a subsequente ligação do reagente de Folin às proteínas tratadas com cobre. Quando o reagente de Folin liga-se a essas proteínas, ele é reduzido pela perda de 1, 2 ou 3 átomos de oxigênio, e muda a cor do amarelo para um azul característico, cuja absorbância é lida entre 405 e 750 nm (Lowry et al, 1951).

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

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

3.2.3. *Western blot*

Após a determinação da concentração das proteínas, as mesmas foram diluídas com tampão de amostra a fim de atingir as concentrações ideais para o *Western Blot*.

As amostras foram diluídas em tampão de amostra (*Laemmli buffer*) para atingir concentrações de proteína entre 0,65 mg/mL a 1,0 mg/mL. Antes da aplicação das amostras no gel, as alíquotas foram fervidas por 5 minutos em banho seco (*DRI-BLOCK DB-3*, Techne), desnaturando as proteínas, desenovelando-as completamente, a fim de facilitar a separação das mesmas durante a corrida eletroforética. Foram aplicados, em média, 25 µL dessas amostras em cada canaleta do gel de poliacrilamida 10%, correspondendo a 25 µg de proteínas totais. Foram selecionados marcadores de peso molecular, condizentes às faixas das proteínas estudadas, entretanto por não serem quimioluminiscetes, não eram visualizados nas fotografias, somente na tela do computador por meio de marcações manuais baseadas nos pesos moleculares em questão (130/110 kDa para APP e 47 e 51 kDa para GSK3B).

A corrida eletroforética das proteínas APP, GSK3B e fosfo-GSK3B foi realizada em tampão de corrida por 90 minutos a 150 V. Durante o tempo da eletroforese, as membranas de nitrocelulose, as folhas de papel-filtro e as “esponjas” (*fiber pads* – Bio-Rad) que foram utilizadas na transferência permaneceram imersas no tampão de transferência para a otimização do método. Terminada a eletroforese, gel foi colocado em contato com a

membrana de nitrocelulose a ser analisada, e o conjunto foi acondicionado entre os papéis-filtro, e estes, entre as esponjas do sistema de transferência que ocorreu por 90 minutos a 250mA. Tanto para a realização da corrida de eletroforese como também da transferência das proteínas, foi utilizado o sistema de mini-géis verticais *Mini-Protean III* (Bio-Rad).

Ao término da transferência, as membranas foram submetidas à técnica de *immunoblotting*: técnica responsável pela detecção das proteínas na membrana de nitrocelulose a partir da utilização de anticorpos específicos. A fim de se evitar interações inespecíficas do anticorpo primário, as membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com leite desnatado a 5% em TBS-Tween 0,2%, sob condições variáveis de acordo com o substrato em questão. As membranas foram lavadas com TBS-Tween 0,2% por 4 vezes durante 5 minutos entre cada uma das incubações realizadas.

Nas etapas seguintes da técnica de *immunoblotting*, as membranas de nitrocelulose foram incubadas com anticorpo primário e secundário em condições correspondentes à proteína analisada. No caso do anticorpo secundário não ser conjugado a peroxidase, uma terceira incubação da membrana era realizada com um composto conjugado de *horseradish*-peroxidase, para que a detecção do complexo antígeno-anticorpo fosse feita mediante reação de quimioluminescência amplificada (ECL). As lavagens foram realizadas em agitador do tipo *Roto Mix* – 50800 da Barnstead/Thermolyne. Para o bloqueio e as incubações com os anticorpos foi utilizado o agitador *Platform Vari Mix*, também da Barnstead/Thermolyne. A revelação ocorreu dentro do equipamento de imagem *ChemiimagerTM*

4000 da Alpha Innotech, *Multimage Light Cabinet*. Sobre a membrana foi adicionado o reagente ECL (GE, UK) que, após reagir por 15 minutos com a peroxidase, emitiu luz e foi captada pelo equipamento de imagem. Através de software específico (*Chemiiager v5.5*), a imagem foi salva no computador.

A revelação dentro deste gabinete só foi possível por que este modelo tem a capacidade de captar quimioluminescência. Este modo de revelação apresenta como vantagem a inexistência de *background* que ocorre nas revelações tradicionais, além da facilidade e rapidez na execução. O valor da densitometria foi obtido com a seleção das bandas, realizada por ferramentas do software, onde foi possível delimitar um retângulo ao redor das bandas, com a mesma área.

Foi preparado um *pool* de amostras de plaquetas, de indivíduos sadios que foram aliqüotadas e armazenadas a -70°C , a fim de serem utilizadas como um padrão no experimento. Em cada gel foi aplicada esta amostra padrão. Esta amostra foi chamada de padrão interno (Pi), sendo utilizada para corrigir variações analíticas entre os dias de análise. Por exemplo, se a densitometria das bandas do padrão estiver aumentada ou diminuída comparando-se entre os dias, é possível saber que não foi devido à maior ou menor quantidade de proteína e sim por alguma variação analítica.

O protocolo de *Western Blot* para a APP foi previamente padronizado pelo nosso grupo (Zainaghi, et al, 2007), sendo feita, portanto, apenas a replicação desta metodologia (tabela 3).

Tabela 3: Condições específicas para incubação de *immunoblotting* para a proteína precursora do amilóide (APP) em plaquetas humanas, segundo Zainaghi et.al, 2007.

APP	Anticorpo	Diluição	Temperatura	Tempo
Bloqueio		Leite desnatado a 5% em TBS-Tween 0,2%	temperatura ambiente	1 hora sob agitação suave
1ª reação	22C11 (CHEMICON International)	1:1500 em TBS	temperatura ambiente	2 horas sob agitação suave
2ª reação	Anti-mouse IgG conjugado a peroxidase (Sigma)	1:10000 em TBS	temperatura ambiente	1 hora sob agitação suave
ECL				15 minutos

3.2.4. Lista de reagentes e soluções

- 1) EDTA 0,09 M em solução fisiológica;
- 2) Tris 10mM;
- 3) Tampão de Lise: Tris-HCl 10 mM, pH=7,4, EGTA 1mM. Adicionar no momento do uso, para cada 800 μ L de tampão: 8 μ L de PMSF 100 mM e 8 μ L do coquetel de inibidor de protease (AEBSF, aprotinina, bestatina, E64, leupeptina, da AMRESCO);
- 4) ACD-NH: Glicose 124 mM, citrato de sódio dihidratado 84 mM, ácido cítrico 41 mM;

- 5) Solução de Lavagem: Citrato de sódio 0,1 M, KCl 0,155 M, MgCl₂ 0,1 M, glicose 0,33 M, CaCl₂ 0,1 M, albumina 200mg/mL, NaCl 0,9% e apyrase 2U/mL;
- 6) Tris – sacarose: Tris-HCL 50 mM pH = 7,4, sacarose 233 mM;
- 7) Tampão de amostra (*Laemmli Buffer*): Tris 0,8 M, Mercaptoetanol 12%, glicerol 10%, SDS 8%, azul de bromofenol 0,2%;
- 8) Gel de poliacrilamida a 10%: 5,9 mL de água, 5 mL de Acrilamida:bisacrilamida (30:0,8), 3,8 mL de Tris 1 M pH=8,8, 150 µL de SDS 10%, 150 µL de persulfato de amônio e 15 µL de TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina); Gel de acomodação a 3%: 3,9 mL de água, 600 µL de Acrilamida:bisacrilamida (30:0,8), 1,5 mL de Tris 1 M pH=6,8, 60 µL de SDS 10%, 60 µL de persulfato de amônio e 10 µL de TEMED;
- 9) Tampão de corrida: Tris 25 mM, glicina 160 mM, SDS 10% (m/v);
- 10) Tampão de transferência: Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (m/v);
- 11) TBS 10X: Tris 250 mM, NaCl 1,4 M, KCl 50 mM;
- 12) TBS 1X;
- 13) TBS - Tween: Tris 25 mM, NaCl 140 mM, KCl 5 mM, Tween 0,2%.

3.3. Análise estatística

As médias das medidas bioquímicas da APP, GSK3B total e GSK3B fosforilada em cada um dos três grupos de interesse foram comparadas por meio de análise de variância (ANOVA), corrigindo-se pelo método de Bonferroni quando atendidos os pressupostos de normalidade e homocedasticidade. Nos casos em que a análise indicou diferenças significantes entre as médias (com $p < 0,05$), comparações entre dois grupos foram feitas com teste t para amostras independentes. Foi verificada a correlação de Pearson entre as razões de GSK e APP e entre estas e os parâmetros cognitivos (CAMCOG e MEEM). A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 11.0 para Windows.

4. RESULTADOS

4.1. Otimização do protocolo de Western Blot

Os protocolos para GSK3B total e GSK3B fosforilada foram desenvolvidos a partir do protocolo de APP e do estudo de Zainaghi et al, 1996. Foram realizados testes de concentração do gel, das condições de corrida eletroforética e transferência e das condições de *immunoblotting* utilizando plaquetas de voluntários sadios. Por ser uma técnica semi-quantitativa, foi considerado um coeficiente de variação de 20% entre as replicatas, estabelecendo-se que as amostras que apresentassem coeficiente de variação superior ou igual ao estabelecido seriam refeitas.

A concentração do gel de poliacrilamida de 10% mostrou-se mais eficiente para as três proteínas de interesse neste estudo, tendo sido adotada esta alteração no protocolo anterior a fim de otimizar o tempo e a execução deste trabalho.

Com a concentração do gel definida em 10%, foram testadas diferentes condições de tempo e voltagem/amperagem para as etapas seguintes do experimento. A corrida eletroforética foi realizada por 120 minutos, a 120V e, em um segundo teste, por 90 minutos, a 150V; a transferência foi submetida por 90 min, a 200mA e 90 minutos, a 250mA.

Para a corrida, optou-se pela utilização da condição de 90 minutos a 150V; na transferência, optou-se pelo tempo de 90 minutos a 250mA.

4.2. *Immunoblotting - APP:*

De acordo com o protocolo estabelecido, a razão da APP foi obtida dividindo-se os resultados da densitometria das bandas de 130 kDa pelos resultados da densitometria das bandas de 110 kDa (figura 7). Abaixo mostramos o perfil das bandas encontradas para 3 diferentes sujeitos e para o Pi.

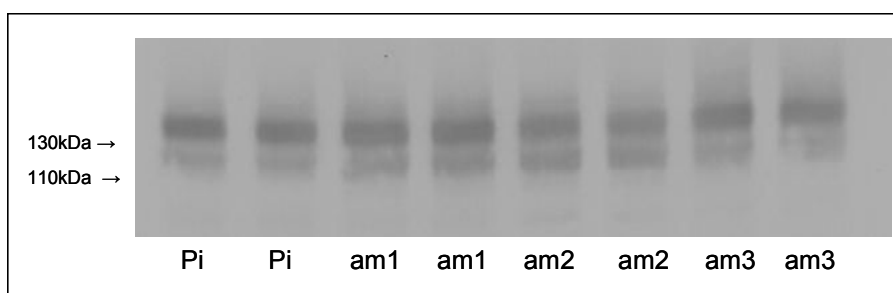


Figura 7 - Blot para a APP. 130 e 110 kDa são os pesos moleculares aparente das bandas.

Foram analisadas amostras de 65 pacientes e não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as médias das densitometrias obtidas para os sujeitos dos três grupos, conforme mostra a figura 8: DA $0,98 (\pm 0,27)$; CCL $1,03 (\pm 0,24)$ e controles $1,04 (\pm 0,45)$ ($p=0,84$, ANOVA).

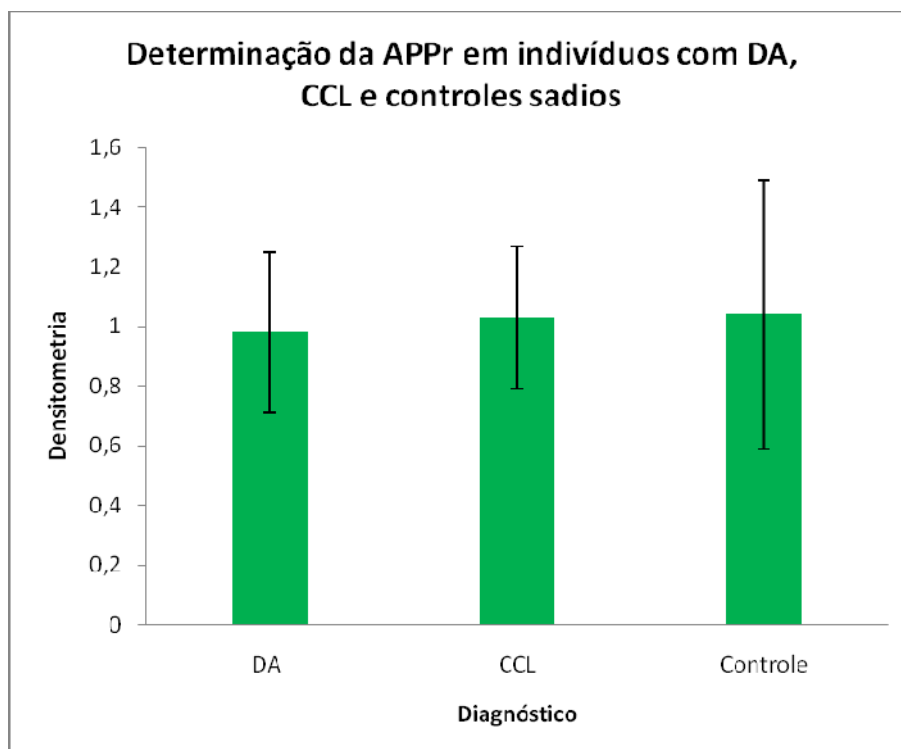


Figura 8 - Médias da razão da APP 130/110 kDa entre os grupos.

4.3. Preparo de amostra 1:

4.3.1. *Immunoblotting* - GSK3B total

Como parte da padronização das condições de *immunoblotting* de GSK3B total, foram testados diferentes tempos de incubação para bloqueio da membrana: 1 hora, temperatura ambiente (T.A.), 2 horas, T.A, 3 horas, T.A. e *overnight*, 4°C. Para a definição das diluições dos anticorpos utilizados, em tampão TBS 1X ou tampão TBS-Tween 0,2%, foi considerado como ponto de partida dos testes, a diluição mínima recomendada pelo fabricante: anticorpo primário: 1:500 (Monoclonal Anti-Glycogen Synthase Kinase-3 β , clone GSK-4B, Mouse ascites fluid, Sigma); anticorpo secundário: 1:400 (Anti-Mouse Ig, biotinylated species-specific whole

antibody, from sheep, GE) e Conjugado: 1:1000 – 1:5000 (ECL streptavidin horseradish peroxidase conjugate, GE). A partir destes testes, as condições adotadas para o protocolo de GSK3B estão descritas na tabela 4.

Tabela 4: Condições específicas para incubação de *immunoblotting* para a GSK3B, porção total, total em plaquetas humanas.

GSK3B	Anticorpo	Diluição	Temperatura	Tempo
Bloqueio		Leite desnatado a 5% em TBS-Tween 0,2%	4°C	<i>Overnight</i>
1ª reação	Monoclonal anti-GSK-3 β , Clone GSK-4B, mouse (<i>Sigma</i>)	1:3000 em TBS-Tween 0,2%	Temperatura ambiente	1 hora sob agitação suave
2ª reação	Anti-mouse Ig biotinilado (<i>GE</i>)	1:400 em TBS-Tween 0,2%	Temperatura ambiente	1 hora sob agitação suave
3ª reação	Composto conjugado de horseradish-peroxidase (<i>GE</i>)	1:3000 em TBS-Tween 0,2%	Temperatura ambiente	1 hora sob agitação suave
ECL				15 minutos

De acordo com o protocolo definido para GSK3B total, a figura 9 mostra o perfil de banda encontrada para os diferentes pacientes e para o Pi.

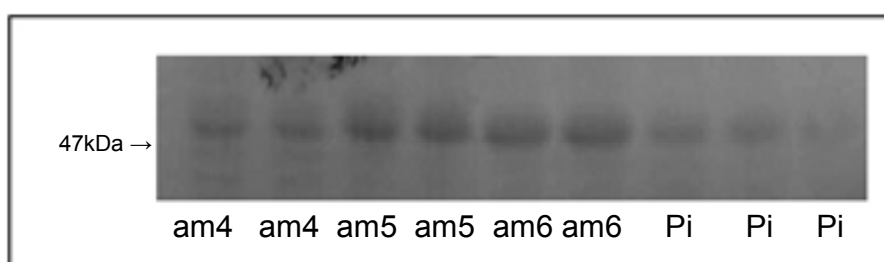


Figura 9 - Blot para a enzima GSK3B, porção total, de acordo com o preparo de amostra 1.

A média de GSK3B do grupo controle foi 1,38 (\pm 0,49) e para o grupo DA foi 1,42 (\pm 0,65). Já o grupo CCL apresentou a menor média para a GSK3B de 1,34 (\pm 0,74) entre os grupos. Essas diferenças não se mostraram estatisticamente significantes ($p= 0,931$). A figura 11 mostra a representação gráfica dos resultados médios das bandas de GSK3B total representadas em azul.

4.3.2. Immunoblotting - GSK3B fosforilada:

Assim como na padronização da GSK3B total, foram testados 3 diferentes tempos de bloqueio para a GSK3B fosforilada: 1 hora, T.A, 2 horas, T.A, 3 horas, T.A. Para os anticorpos correspondentes à porção fosforilada da GSK3B também foram realizados testes com diferentes tampões e com base nas informações cedidas pelo fabricante: anticorpo primário: 1:100 – 1:1000 (p-GSK-3 β (ser 9), Santa Cruz Biotechnology); anticorpo secundário: 1:400 (Anti-sheep/goat Ig Biotinylated whole antibody from donkey), GE); Conjugado: 1:1000 – 1:5000 (ECL streptavidin horseradish peroxidase conjugate, GE) (tabela 5).

Tabela 5: Condições específicas para incubação de *immunoblotting* para a GSK3B, porção fosforilada, em plaquetas humanas.

Fosfo-GSK3B	Anticorpo	Diluição	Temperatura	Tempo
Bloqueio		Leite desnatado a 5% em TBS-Tween 0,2%	Temperatura ambiente	1 hora sob agitação suave
1ª reação	Fosfo-GSK-3 β (policlonal de cabra) epítipo Ser9 (<i>Cell Signalling</i>)	1:5000 em TBS-Tween 0,2% - leite desnatado a 5%	4°C	<i>Overnight</i>
2ª reação	Anti-cabra Ig biotilado (<i>GE</i>)	1:400 em TBS-Tween 0,2% - leite desnatado a 5%	Temperatura ambiente	1 hora sob agitação suave
3ª reação	Composto conjugado de horseradish-peroxidase (<i>GE</i>)	1:3000 em TBS-Tween 0,2%	Temperatura ambiente	1 hora sob agitação suave
ECL				15 minutos

Baseado no protocolo definido para GSK3B fosforilada, a figura 10 mostra o perfil de banda encontrada para os diferentes pacientes e para o Pi.

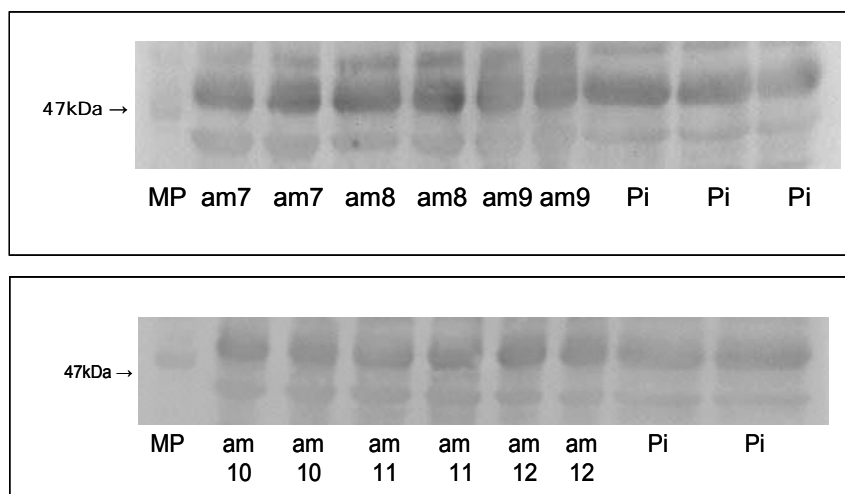


Figura 10 - Blot para porção fosforilada da enzima GSK3B, de acordo com o preparo de amostra 1.

Para a GSK3B fosforilada, o grupo controle apresentou o maior valor médio entre os grupos 1,21 (\pm 0,31), seguido do grupo CCL 1,07 (\pm 0,24) e DA 1,03 (\pm 0,26), porém estes dados não foram estatisticamente significantes ($p=$ 0, 081). A figura 11 apresenta, em roxo, a representação gráfica dos resultados médios das bandas de GSK3B fosforilada.

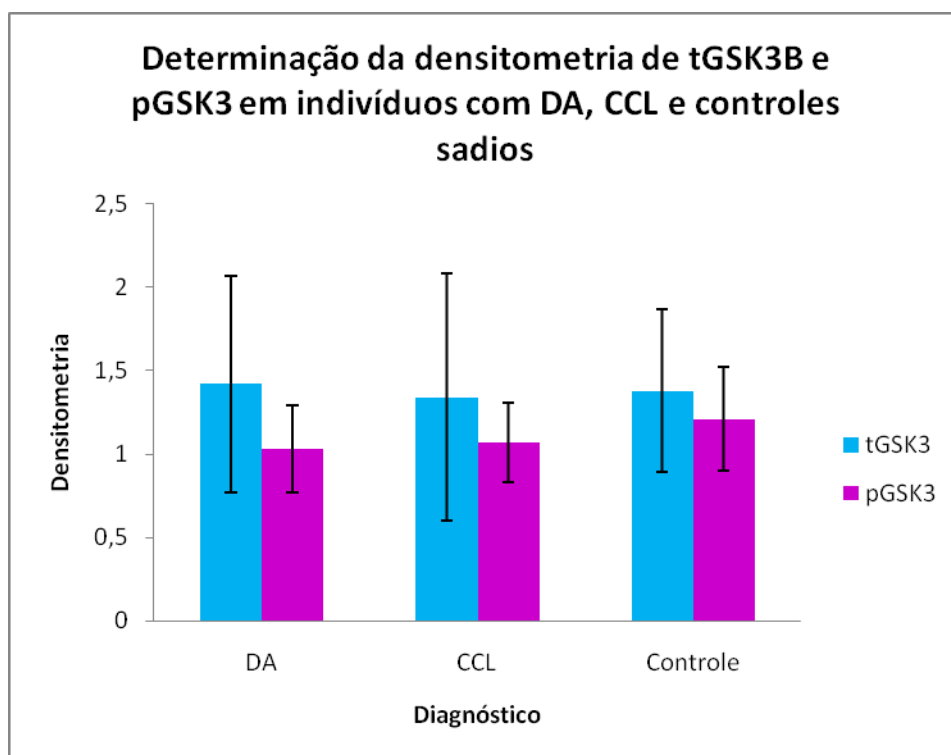


Figura 11 – Determinação da densitometria de GSK3B total e fosforilada em cada um dos grupos estudados, seguido do preparo de amostra 1.

A razão das duas formas de GSK3B (fosforilada/total) não apresentou diferença estatística entre os grupos ($p=0,479$), onde o grupo CCL apresentou maior média quando comparado aos outros grupos, como mostra a figura 12.

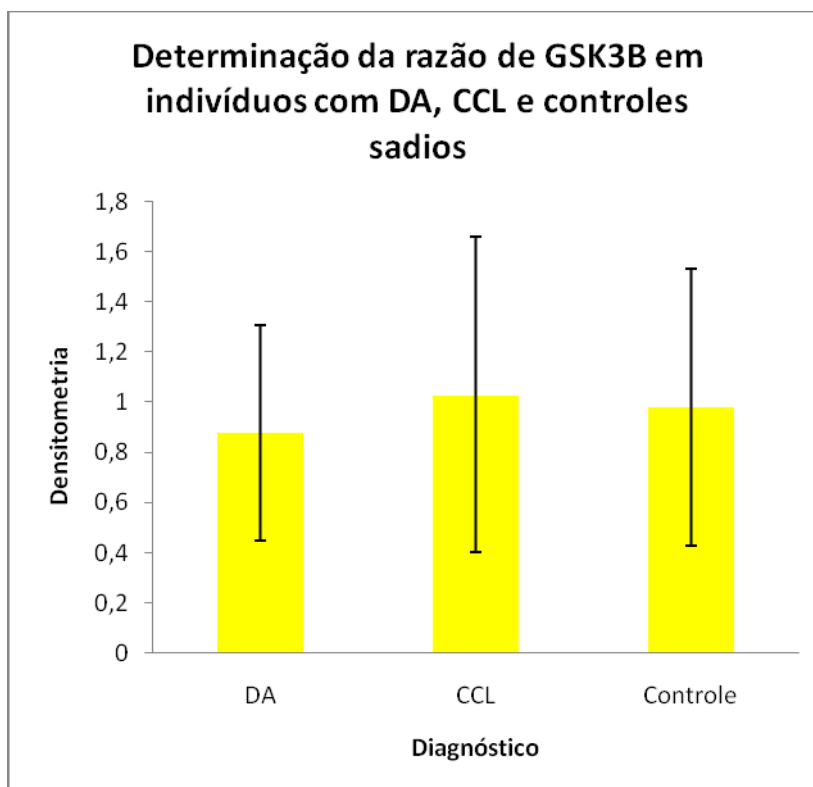


Figura 12 – Determinação da rGSK3B (PGSK/TGSK) em cada um dos grupos estudados, seguido do preparo de amostra 1.

4.4. Preparo de amostra 2:

4.4.1 Immunoblotting - GSK3B total:

Foram analisadas amostras de 58 pacientes (dentre os mesmos já analisados pelo preparo 1, descritos na tabela 6): 21 pacientes com a DA, 18 com CCL e 19 controles sadios.

Baseado no mesmo protocolo de *Western Blot*, a figura 13 mostra as bandas correspondentes à porção total da GSK3B depois da utilização do preparo 2.

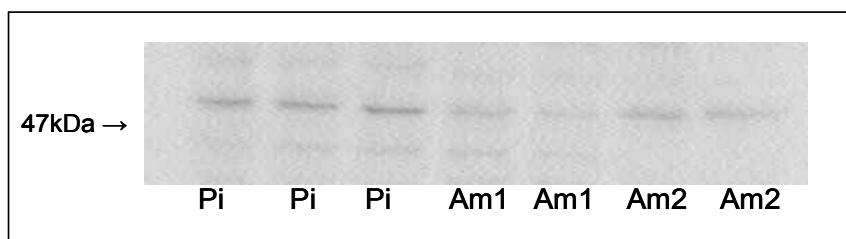


Figura 13 - Blot para a enzima GSK3B, porção total, utilizando o preparo de amostra 2.

Com o preparo 2, as médias de GSK3B total (controle= $0,79 \pm 0,30$; CCL= $1,10 \pm 0,42$; DA= $0,94 \pm 0,39$), apresentaram médias estatisticamente diferentes entre os grupos ($p = 0,052$) (figura 15).

4.4.2. Immunoblotting - GSK3B fosforilada:

A figura 14 mostra as bandas correspondentes à porção fosforilada da GSK3B resultantes da utilização do preparo de amostra 2.

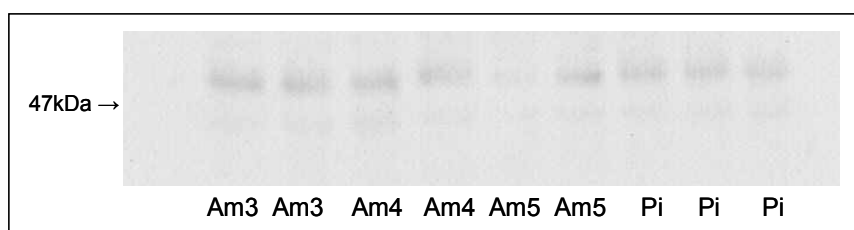


Figura 14 – Blot para a porção fosforilada de GSK3B de acordo com o preparo de amostra 2.

As médias de GSK3B fosforilada (controle= $1,25 \pm 0,54$; CCL= $1,13 \pm 0,26$; DA= $1,00 \pm 0,39$) não apresentaram médias estatisticamente diferentes, $p = 0,186$ (ANOVA) (figura 15).

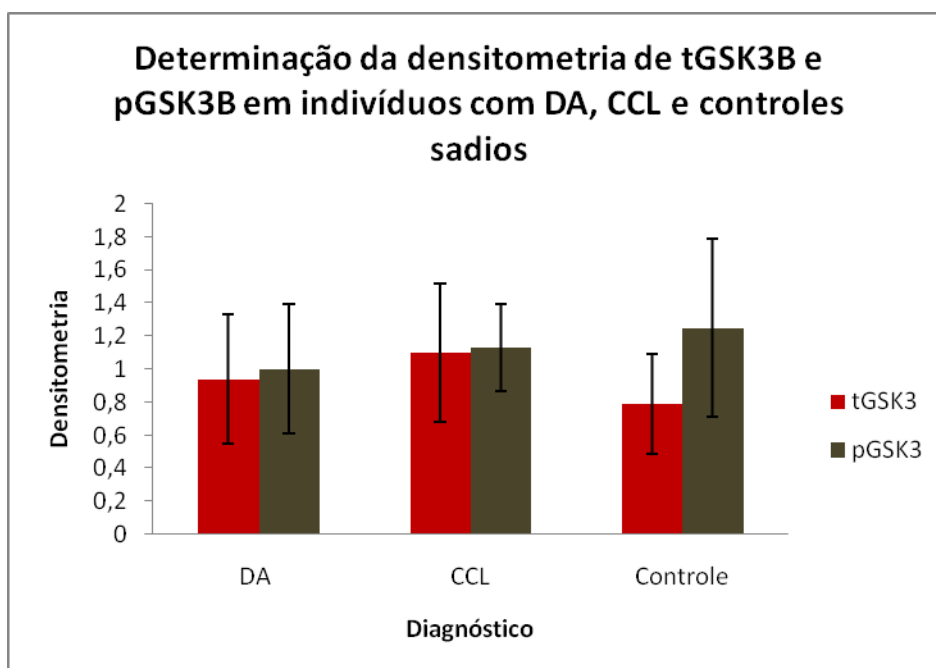


Figura 15 – Densitometria de GSK3B total e fosforilada em cada um dos grupos estudados, segundo o preparo de amostra 2.

A razão entre as duas formas da enzima GSK3B (fosforilada/total) apresentou diferença estatisticamente significante entre os grupos (controle= $1,65 \pm 0,54$; CCL= $1,09 \pm 0,44$; DA= $1,19 \pm 0,59$), $p = 0,006$ (ANOVA). A figura 16 mostra a representação gráfica dos resultados da razão entre as duas isoformas da enzima.

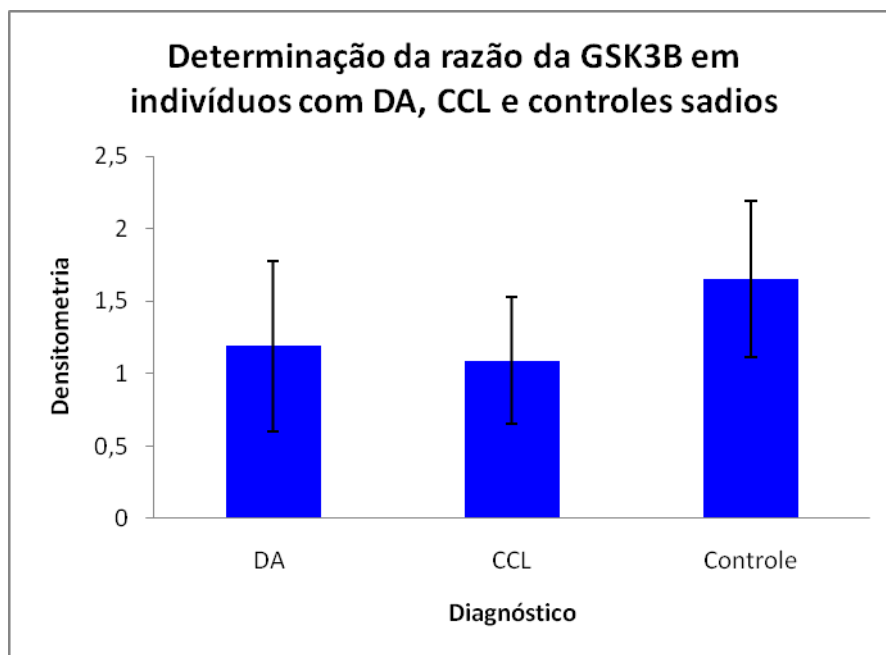


Figura 16 – Determinação da rGSK3B em cada um dos grupos estudados, segundo o preparo de amostra 2 (*p = 0,006).

4.5. Correlação entre APPr e rGSK3B

4.5.1. Preparo de amostra 1:

Foram realizadas correlações entre a razão dos fragmentos da APP e da razão da GSK3B (porção fosforilada/ porção total), nas plaquetas, inferindo a atividade da enzima *in vivo*, segundo os dois preparos de amostra utilizados. A figura 17 (A) mostra a correlação de Pearson entre essas razões; e (B) compara as médias de ambas as razões nos grupos estudados.

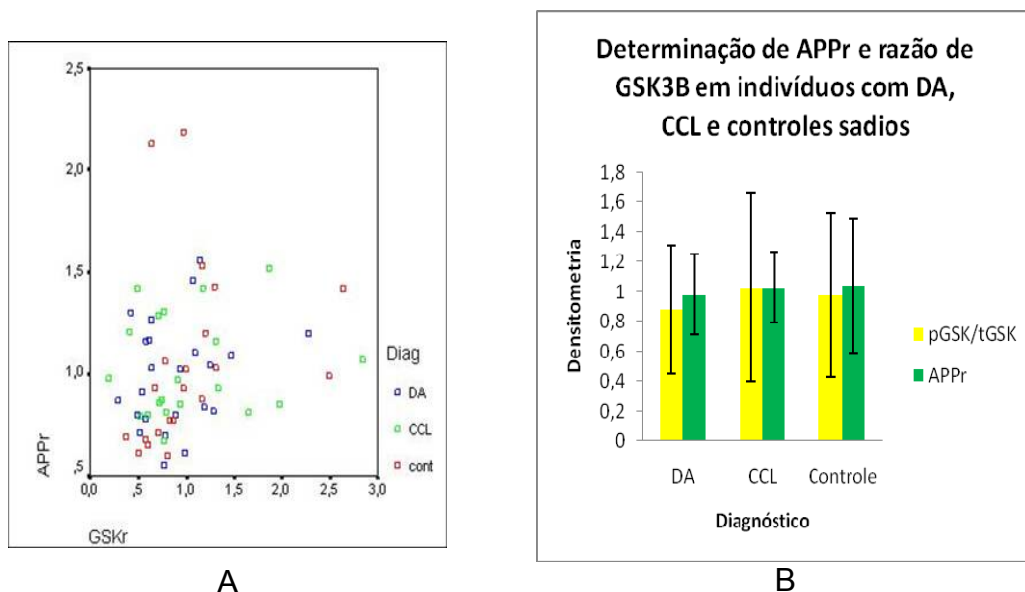


Figura 17 – (A) Gráfico mostrando correlação da APP com a razão da GSK3B em plaquetas, de acordo com o preparo de amostra 1, e diagnósticos ($r=0,21$, $p= 0,09$). **(B)** Comparação entre APPr e rGSK baseado nos diferentes diagnósticos.

4.5.2. Preparo de amostra 2:

A figura 18 mostra o perfil das duas proteínas (APPr e rGSK), nos três grupos em estudos, analisadas pelo preparo de amostra 2. A correlação dessas duas razões, utilizando o preparo 2, apresentou $r= 0,61$, $p= 0,65$.

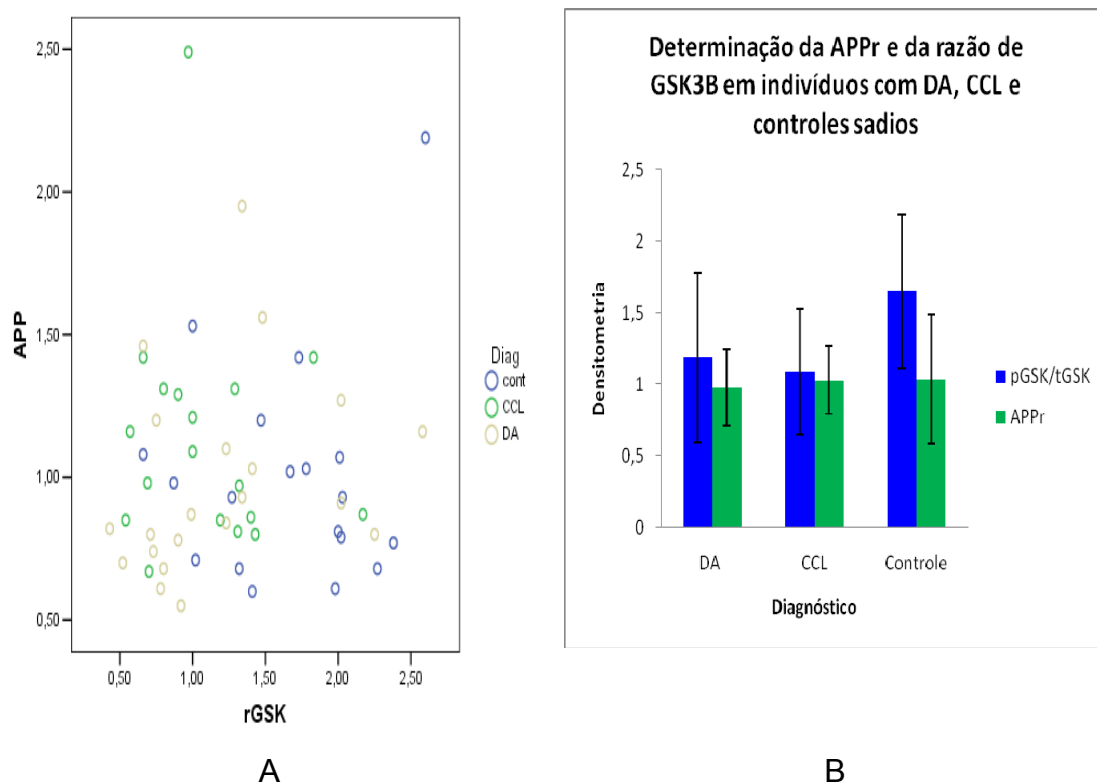


Figura 18 – (A) Correlação da APPr e rGSK segundo os diferentes diagnósticos, segundo o preparo de amostra 2. (B) Comparação entre APPr e rGSK.

4.6. Correlações da APPr e rGSK3B com parâmetros cognitivos

Foram realizadas correlações com os resultados de APP e de GSK3B com parâmetros cognitivos, como os escores do MEEM (Mini exame do estado mental), escores de memória do CAMCOG e CAMCOG Total.

Esta avaliação não mostrou correlação significativa da rAPP com o MEEM ($r= 0,15$, $p= 0,308$), com os escores de memória do CAMCOG ($r= 0,10$, $p= 0,492$) e com os escores totais do CAMCOG ($r= 0,13$, $p= 0,375$).

A razão da GSK3B (pGSK3B/tGSK3B) mostrou uma correlação significativamente positiva com o escore de memória do CAMCOG ($r= 0,32$, $p=0,034$). Entretanto, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre GSK3B total, GSK3B fosforilada e entre a razão (pGSK3B/tGSK3B) com os valores globais do desempenho cognitivo destes indivíduos (escores totais do CAMCOG e MEEM).

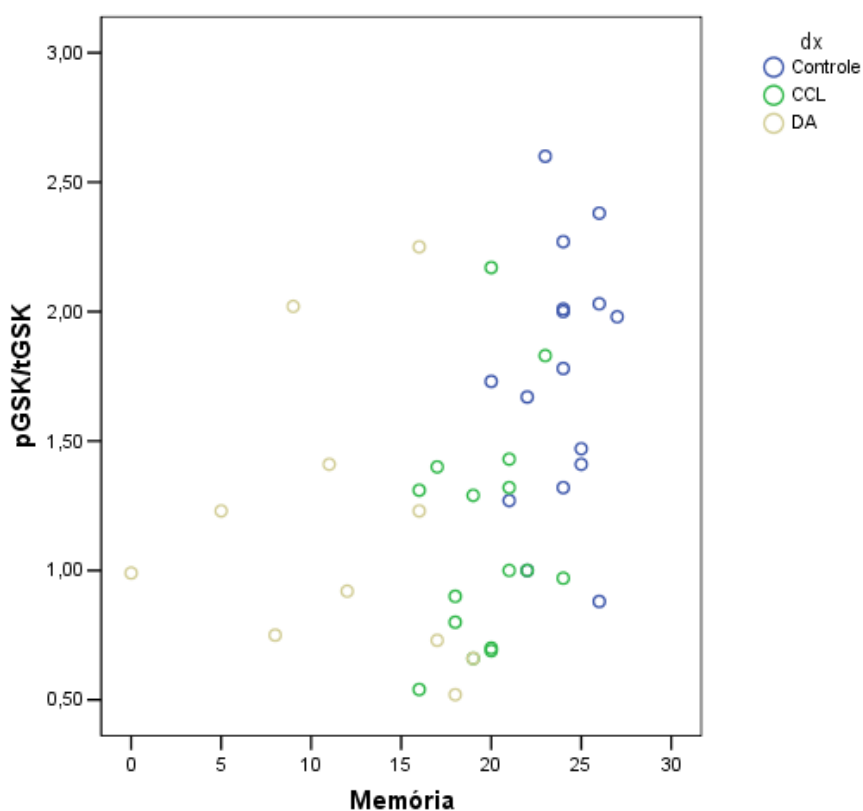


Figura 19 – Gráfico mostrando a correlação entre o subescore memória (CAMCOG) e a rGSK3B. ($r= 0,32$; $p= 0,034$).

5. DISCUSSÃO

O diagnóstico da doença de Alzheimer ainda é um grande desafio em muitos aspectos. A busca de marcadores biológicos ideais (tanto em fluídos periféricos como o líquido cefalorraquidiano e sangue, como também por métodos de neuroimagem funcional) permanece sendo alvo de estudos (Racchi et al, 2008).

O biomarcador ideal deve ser capaz de detectar, mesmo que indiretamente, precocemente as alterações fisiológicas provocadas pela doença, ser capaz de estabelecer diferenças entre a DA e outras formas de demência, ser preciso, barato e principalmente conveniente e não invasivo ao paciente (Borroni et al, 2006).

O LCR está em contato direto com o espaço extracelular cerebral, refletindo, portanto, as alterações bioquímicas presentes no cérebro (Blennow, 2004). Entretanto, a necessidade de novas punções lombares torna a metodologia inconveniente aos pacientes, e também invasiva comparando-se a outras matrizes que poderiam ser utilizadas.

A utilização de plaquetas para tal objetivo é justificada pela sua fácil obtenção a partir de amostras de sangue periférico. Entretanto, cuidados com manuseio, coleta e processamento das amostras são indispensáveis para evitar a ativação plaquetária, visto que esta ativação pode alterar a cascata natural do seu metabolismo.

Sendo assim, este trabalho teve o objetivo de avaliar, em plaquetas, certas características bioquímicas supostamente relacionadas com a doença de Alzheimer. Entre as características estudadas, a razão dos fragmentos da APP em plaquetas é um candidato a biomarcador biológico, como citado por (Rosenberg et al, 1997; Di Luca et al, 1998). Já a determinação de GSK3B, total e fosforilada, descritas em leucócitos humanos, podem apontar alterações presentes em pacientes com DA e ser um novo marcador biológico (Lovestone et al, 2007).

Estas proteínas foram avaliadas por meio da técnica de *Western Blot*, amplamente utilizada e descrita para análise de proteínas. Temperatura ambiente, tempo de incubação, diluições dos anticorpos e tempos de reação (eletroforese e transferência) foram variáveis testadas durante a padronização. Em virtude do aumento da concentração do gel a ser utilizado, aumentou-se a voltagem da eletroforese e em conseqüência, diminuiu-se o tempo de experimento. Com esta mudança do protocolo, a amperagem da transferência também foi aumentada a fim de que todas as proteínas fossem transferidas por completo, já que elas têm tamanhos diferentes. Com relação à concentração de proteínas aplicadas em cada gel de poliácridamida, esta foi mantida de acordo com o protocolo de APP, desenvolvido pelo nosso grupo (Zainaghi et al, 2007).

Diversos grupos têm descrito diferenças na rAPP entre pacientes com DA e indivíduos controles (Rosenberg et al, 1997; Di Luca et al, 1998; Borroni et al, 2002; Padovani et al, 2002; Zainaghi et al, 2007). Esses achados não puderam ser confirmados neste grupo, ora estudado, já que não foram

encontradas diferenças estatisticamente significantes ($p= 0,87$; figura 8). Aproximadamente 77% dos pacientes com DA estão em uso de inibidores de colinesterase justificando assim este resultado: a fisiologia natural da doença já pode ter sofrido alterações não mostrando as reais alterações nas cascatas fisiológicas destes pacientes. É difícil que pacientes diagnosticados como DA, independente do nível de comprometimento da doença, não estejam em uso de inibidores de colinesterase desde o início do tratamento, justificando a grande proporção de pacientes em uso desta medicação.

O preparo das amostras foi baseado no protocolo de APP já definido pelo nosso grupo e foi a partir deste que foram desenvolvidos os protocolos para ambas as porções da GSK3B, total e fosforilada. A APP, sendo uma proteína transmembrana, está localizada na membrana plaquetária e a lise desta membrana durante o preparo das plaquetas não altera a sua fisiologia natural (Annaert e Strooper, 2002).

Por outro lado, a GSK3B é uma enzima bastante importante no organismo e está envolvida com a síntese de glicogênio e, portanto, com o metabolismo energético além de outras diversas cascatas fisiológicas (Gould e Manji, 2005; Forde e Dale, 2007). Sendo assim, esta enzima pode ter suas condições naturais alteradas facilmente ao sofrer influência de outros fatores. A lise das plaquetas durante o preparo da amostra pode ser um destes fatores. Manipulações que levem a ativação plaquetária, promovem a liberação de seus componentes e enzimas no meio extracelular. Além disso, tendo em vista o fato de um dos mecanismos de regulação da enzima ser a sua própria fosforilação, a ausência de reagentes que regulassem este

mecanismo, seria suficiente para alterar a atividade da enzima, uma vez que ela na sua forma fosforilada, está inativa (Klein e Melton, 1996; Doble e Woodgett, 2003).

Baseado nestes argumentos, somente as porções da GSK3B foram re-analisadas de acordo com o segundo protocolo, previamente descrito em materiais e método, já que este supria as carências metodológicas do manuseio das enzimas. A escolha deste novo preparo foi baseada na utilização de reagentes fundamentais para a conservação das suas condições fisiológicas *in vivo* e otimização dos resultados, como inibidores de protease e fosfatases e reagentes que mantenham a integridade plaquetária.

As médias de GSK3B total das amostras preparadas de acordo com o preparo 1, mostraram que os sujeitos controles apresentaram a menor média referente à essa proteína, ao contrário dos pacientes com DA, que apresentaram a maior média.

A porção total da GSK3B apresentou, nos três grupos, médias com valores aproximados. Baseado nisso, podemos dizer que a expressão desta proteína é semelhante, independente do grupo diagnóstico no qual o paciente é classificado onde, o que difere entre os mesmos é o estado de fosforilação da proteína que, por consequência, altera sua atividade, como mostrado na figura 11 (Petersen et al, 2004; Gainotti et al, 2008; Nordlund et al, 2008). Esta figura ainda mostra as médias correspondentes à porção fosforilada da GSK3B nos três grupos, também de acordo com o preparo de amostra 1, mostrando que os indivíduos do grupo controle apresentam maior

média de GSK3B fosforilada, confirmando a hipótese de que inativação da enzima pode ter um efeito neuroprotetor. De acordo com estudos realizados com lítio, sabidamente um inibidor da GSK3B, descrevem uma melhora na cognição, de pacientes idosos portadores de transtorno bipolar (aonde o lítio é amplamente utilizado), apresentam menor incidência de DA (Nunes et al, 2007). Dentro desta amostragem, os pacientes com DA somente utilizam inibidores de colinesterase para o seu tratamento.

Por meio de uma razão estabelecida entre as duas formas da GSK3B, podemos estabelecer uma relação entre as duas porções da enzima, GSK3B fosforilada/ GSK3B total, para assim, inferir a sua atividade na amostra. Sendo assim, quanto maior for esta razão, maior é a fosforilação da proteína. A figura 12 mostra as médias de razão encontradas para os três grupos em estudo, onde o grupo controle apresenta a maior média quando comparada ao grupo DA.

Existem evidências da associação do metabolismo de APP e a GSK3B, sugerindo que a clivagem do APP é GSK3B dependente. A atividade desta é regulada pela Wnt e pela insulina, fatores que também alteram o metabolismo da APP, bem como da hiperfosforilação da proteína TAU *in vitro*. Podemos, baseando-se nessas informações, inferir que essa associação pode ocorrer *in vivo*, apesar da fraca correlação encontrada entre a regulação destas duas proteínas (figura 17A) (Hye et al, 2005).

A liberação do peptídeo A β favorece a ativação da GSK3B, iniciando, a cascata de hiperfosforilação da proteína TAU e, contribuindo, por sua vez, para a formação das placas senis e emaranhados neurofibrilares,

característicos da DA. Sendo assim, é dito que a GSK3B atua na regulação do metabolismo da APP e também na fosforilação da proteína TAU (Grimes e Jope, 2001). A baixa rAPP encontrada nos pacientes com DA é justificada em virtude da clivagem amiloidogênica: a APP intacta encontra-se diminuída em função de um favorecimento da via amiloidogênica. A atividade da GSK3B corrobora com estes achados, uma vez que ela favorece a clivagem amiloidogênica da APP.

Como resultados seguidos do preparo de amostra nº2, mostramos que o grupo controle apresentou a menor média de GSK3B total comparado ao grupo DA sugerindo que a porção ativa da enzima está aumentada neste último grupo de pacientes (figura 15).

Em relação à porção fosforilada da GSK3B, podemos dizer que a média correspondente ao grupo controle foi a maior entre os três grupos e a média do grupo DA foi a menor delas. Pudemos ainda mostrar uma diferença significativa na razão da GSK3 (p= 0,022) entre os grupos DA e controle, estando mais uma vez de acordo com a nossa hipótese de que quanto maior é a esta razão, maior é a inativação da enzima (figura 16). Com estes resultados, podemos novamente sugerir que a porção inativa da enzima pode exercer um papel neuroprotetor.

Podemos verificar também, graficamente, que o grupo DA apresentou valores médios para a rGSK3B e rAPP diminuídos quando comparados às médias do grupo controle, apesar da ausência de significância desta correlação, $r= 0,21$, $p= 0,09$ (figura 17B). Da mesma maneira que a correlação entre as médias das razões de GSK3B e APP obtidas através do

preparo de amostra nº2, também não se mostrou estatisticamente significativa ($r= 0,61$, $p= 0,65$) (figura 18). A razão da GSK3B e a quantidade de APP seriam inversamente proporcionais, isto é, quanto maior a quantidade de APP intacta, menor é a atividade da GSK3B uma vez que há menos fragmentos A β liberados. Ambos os achados, do grupo controle e do grupo DA, corroboram com a fisiopatologia da doença (Hye et al, 2005). Visto que o metabolismo da APP está alterado nas plaquetas de pacientes com DA, como já é descrito na literatura, podemos dizer que a GSK3B pode estar alterada nas plaquetas em consequência desta via fisiológica, além de suas outras cascatas.

Quando comparados aos parâmetros cognitivos, a razão da GSK3B (GSK3-fosfo/GSK3B-total) apresentou uma correlação positiva com o escore de memória do CAMCOG, sugerindo que quanto maior a atividade da enzima, maior será o comprometimento da memória do paciente.

O comprometimento cognitivo leve é um estágio limite ou transitório entre o envelhecimento normal e a demência. A taxa de conversão de CCL para DA é em torno de 10 a 15% ao ano, contudo esta porcentagem pode variar muito, refletindo as diferenças nos critérios de diagnóstico, diferenças nos instrumentos de medida e também resultados obtidos em amostras pequenas (Petersen et al, 1999).

Não podemos deixar de levar em conta que a heterogeneidade dentro do grupo CCL eleva o desvio, o que dificulta a análise e diminui a significância dos testes. Os critérios diagnósticos utilizados para a distinção dos pacientes neste grupo ainda é bastante abrangente provocando estas

alterações. Além disso, não existem mecanismos de avaliação específicos para um determinado estágio da doença, sendo assim, não podemos afirmar se todos os pacientes, mesmo que no mesmo grupo diagnóstico, estejam fisiologicamente nas mesmas condições.

No presente estudo o grupo CCL apresentou resultados discrepantes dos outros dois grupos em análise o que mostra a grande heterogeneidade do grupo quando comparado aos outros e seus critérios de inclusão (Petersen et al, 2004; Gainotti et al, 2008; Nordlund et al, 2008). Como mostra a figura 11, a média de GSK3B total do grupo CCL foi ainda menor do que a média do grupo controle. Entretanto quando analisamos as médias de rGSK3, a média do grupo CCL foi ainda maior dentre todas, podendo indicar também, que dentro deste grupo indivíduos já pudessem estar em fase de conversão para DA. Baseado nestas informações podemos dizer que esta variação entre os perfis dos pacientes classificados dentro do mesmo grupo diagnóstico ainda podem apresentar diferentes padrões fisiológicos comuns para a doença (figura 15).

Além da heterogeneidade do ponto de vista clínico, fatores biológicos também podem influenciar a fisiologia das proteínas. Medicamentos ou comorbidades, além das características particulares, associados interagem na cascata destas proteínas e, com isso, “mascaram” as reais alterações provocadas pela DA. Por conta disso, foi realizado um levantamento de todos os medicamentos em uso pelos pacientes, além das doenças associadas, diretamente nos prontuários médicos, para verificar o que pode contaminar e, por consequência, desviar os valores médios das proteínas.

As amostras muito discrepantes foram excluídas do estudo, como por exemplo, pacientes diabéticos em uso de insulina, visto que a mesma interfere o metabolismo da GSK3B.

Outro viés que deve ser considerado pela ausência de significância é a metodologia empregada. A técnica de *Western blot* é uma técnica semi-quantitativa e de execução bastante manual, o que aumenta a possibilidade de erros em cada uma das etapas, sendo por isso, estabelecido um coeficiente de variação aceitável para a validação do resultado da amostra; caso contrário, uma nova análise é feita. Por conta disso, todas as análises foram realizadas pela mesma pessoa, seguindo também o coeficiente de variação máximo estabelecido neste trabalho (20%). Mesmo com as amostras identificadas durante o seu processamento, esta informação poderia não ser indicativa de alguma alteração porque algumas vezes as alterações entre grupos não era visualizada a olho nu. As alterações eram identificadas por meio das médias estabelecidas pelas densitometrias.

A ausência de resultados significantes para a rGSK3B nas plaquetas pode ser justificada baseada na matriz utilizada para tal análise. Não há estudos prévios na literatura em que tenha sido estabelecida esta razão em plaquetas de pacientes com a doença de Alzheimer, o que nos permite sugerir que este pode não ser um modelo periférico ideal para a análise desta proteína.

Quanto aos parâmetros cognitivos, o grupo CCL apresentou média intermediária no CAMCOG quando comparada aos outros grupos e apresentou média mais próxima do grupo DA no MEEM. É também válido

ressaltar que CCL ainda não é bem estabelecido como uma entidade clínica distinta, dada sua heterogeneidade biológica e neuropsicológica.

Estudos longitudinais, neuropatológicos e estudos de marcadores biológicos sugerem que o diagnóstico de CCL está associado com maiores riscos de desenvolvimento de demências. Desta forma, o uso de biomarcadores poderia aumentar a especificidade diagnóstica, fornecendo ao menos, uma direção no processo evolutivo da doença. Desta maneira, a identificação de um marcador periférico, obtido por meio de técnicas não-invasivas ao paciente, sangue, por exemplo, seria de grande utilidade na prática clínica.

6. CONCLUSÕES

Estabelecemos um protocolo para a determinação da expressão, no nível protéico, da enzima GSK3B (total e sua forma inativa, fosforilada) em plaquetas humanas pelo método de *Western Blot*,

Não observamos diferenças estatisticamente significantes da razão de APP entre os grupos estudados, na presente amostra;

A razão entre as formas inativa e total da enzima GSK3B em plaquetas mostrou-se diminuída no grupo DA e CCL, quando comparada com os controles;

Não foram encontradas correlações estatisticamente significantes entre a razão de APP e a razão de GSK3B;

Na amostra total, observamos correlação estatisticamente significativa entre os valores da razão de GSK3B e os subescores em testes de memória, segundo o CAMCOG.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Andreasen N, Blennow K. CSF biomarkers for mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Clin Neurol Neurosurg*. 2005; 107(3):165 – 73.

Annaert W, De Strooper B. A cell biological perspective on Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2002; 18:25 – 51.

Arnáiz E, Almkvist O, Ivnik RJ, Tangalos EG, Wahlund LO, Winblad B, Petersen RC. Mild cognitive impairment: a cross national comparison. *J Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2004; 75:1275 – 1280.

Balaraman Y, Limaye ER, Levey AI, Srinivasan S. Glycogen synthase kinase 3B and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance. *Cell. Mol. Life Sci*. 2006; 63:1226 – 1235.

Ballatore C, Lee V-Y, Trojanowski JQ. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007; 8:663 – 672.

Barry FA, Graham GJ, Fry MJ, Gibbins JM. Regulation of glycogen synthase kinase 3 in humans platelets: a possible role in platelet function? *FEBS Letters*. 2003; 553:173 – 178.

Blennow K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *The Journal of the American society for Experimental*

Neurotherapeutics. 2004; 1:213 – 225.

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

Borroni B, Colciaghi F, Pastorino L, Pettenati C, Cottini E, Rozzini L, Monastero R, Lenzi GL, Cattabeni F, Di Luca M, Padovani A. Amyloid precursor protein in platelets of patients with Alzheimer Disease. Effect of acetylcholinesterase inhibitor treatment. *Arch Neurol*. 2001; 58:442 – 446.

Borroni B, Di Luca M, Padovani, A. Predicting Alzheimer dementia in mild cognitive impairment patients: are biomarkers useful? *Eur J of Pharmacology*. 2006; 545:73 – 80.

Bottino CMC, Almeida OP, Tamai S, Forlenza OV, Scalco MZ, Carvalho IAM. CAMDEX - *Entrevista Estruturada para Diagnóstico de Transtornos Mentais em Idosos*. Edição brasileira (tradução e adaptação para o português). *Cambridge: Cambridge University Press*; 1999.

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

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

Casoli T, Di Stefano G, Giorgetti B, Baliotti M, Recchioni R, Moroni F, Marcheselli F, Bernardini G, Fattoretti P, Bertoni-Freddari C. Platelet as a physiological model to investigate apoptotic mechanisms in Alzheimer β -

amyloid peptide production. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2008; 129:154 – 162.

Castro HC, Ferreira BLA, Nagashima T, Schueler A, Rueff C, Camisasca D, Moreira G, Scovino G, Borges L, Leal M, Filgueira M, Paschoal P, Bernardo V, Bourguinhon S, Rodrigues CR, Santos DO. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. *J Bras Patol Med Lab*. 2006; 42 (5):321 – 332.

Chin PC, Majdzadeh N, D'Mello SR. Inhibition of GSK3 β is a common event in neuroprotection by different survival factors. *Molecular Brain Research*. 2005; 137:193 – 201.

Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001; 2:769-776.

Cohen P, Goedert M. GSK3 inhibitors: development and therapeutic potencial. *Nature Reviews*. 2004; 3:479 – 487.

Corder EH, Lannfelt L, Bogdanovic N, Fratiglioni L, Mori H, The role of *APOE* polymorphisms in late-onset dementias. *CMLS*. 1998; 54:928 – 934.

Di Luca M, Pastorino L, Cattabeni F, Zanardi R, Scarone S, Racagni G, Smeraldi E, Perez J. Abnormal pattern of platelet APP isoforms in Alzheimer disease and Down Syndrome. *Arch Neurol*. 1996; 53:1162 – 1166.

Di Luca M, Pastorino L, Bianchetti A, Perez J, Viagnolo LA, Lenzi GL, Trabucchi M, Cattabeni F, Padovani A. Differential level of platelet amyloid β precursor protein isoforms – an early marker for Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 1998; 55:1195 – 1200.

Di Luca M, Colciaghi F, Pastorino L, Borroni B, Padovani A, Cattabeni

F. Platelets as a peripheral district were to study pathogenetic mechanisms of Alzheimer disease: the case of amyloid precursor protein. *European Journal of Pharmacology*. 2000; 405:277 – 283.

Diniz BSO, Yassuda MS, Nunes PV, Radanovic M, Forlenza OV. Minimal state examination performance in mild cognitive impairment subtypes. *Int Psychogeriatr*. 2007; 19 (4):647 – 56.

Diniz BSO, Pinto Jr, JA, Forlenza OV. Do CSF total Tau, phospho-Tau, and β -amyloid 42 help to predict progression of mild cognitive impairment to Alzheimer's disease? A systematic review and meta-analysis of the literature. *World J Biol Psychiatry*. 2008; 9 (3):172 – 82.

Diniz BSO, Nunes PV, Yassuda MS, Forlenza OV. Diagnosis of mild cognitive impairment revisited after one year: preliminary results of a prospective study. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2009; 27 (3):224 – 231.

Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of Cell Science*. 2003; 116:1175 – 1186.

Dugo L, Collin M, Thiemermann C, Glycogen synthase kinase 3 β as a target for the therapy of shock and inflammation. *Shock*. 2007; 27 (2):113 – 123.

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

Evin G, Zhu A, Damian Holsinger RM, Masters CL, Li Q-X. Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein in brain and platelets. *Journal of Neuroscience Research*. 2003; 74:386 – 392.

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

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

Forde JE, Dale TC. Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cell fate. *Cell. Mol. Life Sci*. 2007; 64 (15):1930 – 44.

Forlenza OV, Caramelli P. Neuropsiquiatria Geriátrica. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2000; v. 1:715 p.

Forlenza OV, Chiu E. Mild cognitive impairment: a concept ready to move on? *Current Opinion in Psychiatry*. 2008; 21:529 – 532.

Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J*. 2001; 359:1 – 16.

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

Fuentealba RA, Farias G, Scheu J, Bronfman M, Marzolo MP, Inestrosa NC. Signal transduction during amyloid β peptide neurotoxicity: role in Alzheimer's Disease. *Brain Research Reviews*. 2004; 47:275 – 289.

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

Gainotti G, Ferraccioli M, Vita MG, Marra C. Patterns of neuropsychological impairment in MCI patients with small subcortical infarcts or hippocampal atrophy. *JINS*. 2008; 14:611 – 619.

Gandy S. The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer Disease. *J. Clin Invest*. 2005; 115 (5):1121 – 1129.

Gasparini L, Netzer WJ, Greengard P, Xu H. Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 2002; 23 (6):288 – 293.

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

Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's disease. *Science*. 2006; 314(5800):777 – 81.

Gould TD, Manji H. K, Glycogen synthase kinase-3: a putative molecular target for lithium mimetic drugs. *Neuropsychopharmacology*. 2005; 30:1223 – 1237.

Gralle M, Ferreira ST. Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. *Progress in neurobiology*. 2007; 82:11 – 32.

Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of GSK3 β in cellular signaling. *Progress in Neurobiology*. 2001; 65:391 – 426.

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

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

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

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

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

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

Holmsen H. Signal transducing mechanisms in platelets. *Proc Natl Sci Counc Repub China B*. 1991; Jul; 15 (3):147 – 152.

Hye A, Kerr F, Archer N, Foy C, Poppe M, Brown R, Hamilton G, Poweel J, Anderson B, Lovestone S. Glycogen synthase kinase 3 is increased in white cells early in Alzheimer's Disease. *Neuroscience Letters*. 2005; 373:1 – 4.

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

– 234.

Irvine GB, El-Agnaf OM, Shankar GM, Walsh DM. Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's disease. *Mol Med.* 2008; 14 (7-8):451 – 464.

Jope RS, Johnson GVW. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *TRENDS in Biochemical Sciences.* 2004; 29 (2):95 – 102.

Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Inflammation, Diseases, and Therapeutics. *Neurochem Res.* 2007; 32:577 – 595.

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

Kar S, Slowikowski SPM, Westaway D, Mount HTJ. Interactions between β amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J. Psychiatry Neurosci.* 2004; 29 (6):427 - 441.

Kaytor MD, Orr HT. The GSK3 β signaling cascade and neurodegenerative disease. *Current Opinion in Neurobiology.* 2002; 12:275 – 278.

Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93:8455 – 8459.

Lehrner J, Gufler R, Guttman G, Maly J, Gleib A, Auff E, Dal-Bianco P. Annual conversion to Alzheimer disease among patients with memory complaints attending an outpatient memory clinic: the influence of amnesic mild cognitive impairment and the predictive value of neuropsychological

testing. *Wien Klin Wochenschr.* 2005; 117/18:629 – 635.

Lewczuk P, Beck G, Ganslandt O, Esselmann H, Deisenhammer F, Regeniter A, Petereit HF, Tumani H, Gerritzen A, Oschmann P, Schröder J, Schönknecht P, Zimmermann K, Hampel H, Bürger K, Otto M, Haustein S, Herzog K, Dannenberg R, Wurster U, Bibl M, Maler JM, Reubach U, Kornhuber J, Wiltfang J. International quality control survey of neurochemical dementia diagnostics. *Neurosci Lett.* 2006; 409 (1):1 – 4.

Lovestone S, McLoughlin DM. Protein aggregates and dementia: is there a common toxicity? *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry.* 2002; 72:152 – 161.

Lovestone S, Francis P, Strandgaard K. Biomarkers for disease modification trials – the innovative medicines initiative and addneuromed. *The journal of nutrition, health and aging.* 2007; 11(4):359 – 361.

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

Maccioni RB, Muñoz JP, Barbeito L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Archives of Medical Research.* 2001; 32:367 – 381.

Mohammed El H, Rosado JA, Platelet function in hypertension. *Blood, Cells, molecules and diseases.* 2009; 42:38 – 43.

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

College of Neuropsychopharmacology; 2002.

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

Mudher A, Lovestone S. Alzheimer's disease – do tauists and Baptists finally shake hands? *TRENDS in Neurosciences*. 2002; 25 (1):22 – 26.

Muyllaert D, Kremer A, Jaworski T, Borghgraef P, Devijver H, Croes S, Dewachter I, Van Leuven F. Glycogen synthase kinase-3 β , or a link between amyloid and tau pathology? *Genes, Brain and Behavior*. 2008; 7 (1):57 – 66.

Neve RL, McPhie DL, Chen Y. Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein. *Brain Research*. 2000;54 – 56.

Nixon RA. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *Journal of Cell Science*. 2007; 120:4081 – 4091.

Nordlund A, Rolstad S, Klang O, Lind K, Pedersen M, Blennow K, Edman A, Hansen S, Wallin A. Episodic memory and speed/ attention deficits are associated with Alzheimer-typical CSF abnormalities in MCI. *JINS*. 2008; 14:582 – 590.

Nunes PV, Forlenza OV, Gattaz WF. Lithium and risk for Alzheimer's disease in elderly patients with bipolar disorder. *Br J Psychiatry*. 2007; 190:359 – 360.

Nunes PV, Diniz BS, Radanovic M, Abreu ID, Borelli DT, Yassuda MS, Forlenza OV. CAMcog as a screening tool for diagnosis of mild cognitive impairment and dementia in a Brazilian clinical sample of moderate to high education. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2008; 23 (11): 1127 – 33.

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

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

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

Peineau S, Bradley C, Taghibiglou C, Doherty A, Bortolotto ZA, Wang YT, Collingridge GL. The role of GSK-3 in synaptic plasticity. *British Journal of Pharmacology*. 2008; 153:S428 – S437.

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

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

Petersen RC, Doody R, Kurz A, Mohs RC, Morris JC, Rabins PV, Ritchie K, Rossor M, Thal L, Winblad B. Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 2001; 58 (12):1985-92.

Petersen R. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Int*

Med. 2004; 256:183-94.

Planel E, Sun X, Takashima A. Role of GSK-3 β in Alzheimer's disease pathology. *Drug development research.* 2002; 56:491 – 510.

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

Racchi M, Uberti D, Govoni S, Memo M, Lanni C, Vasto S, Candore G, Caruso C, Romeo L, Scapagnini G. Alzheimer's disease: new diagnostic and therapeutic tools. *Immunity e Ageing.* 2008; 5: 7.

Roberson ED, Mucke L. 100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. *Science.* 2006; 314(5800):781 – 4.

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

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

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

Sadowisk M, Pankiewicz J, Scholtzova H, Li Y, Quartermain D, Duff K, Wisniewski T. Links between the pathology of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurochemical Research.* 2004; 29 (6):1257 – 1266.

Shaw ML, Korecka M, Clark CM, Lee VM-Y, Trojanowski J Q. Biomarkers of neurodegeneration for diagnosis and monitoring therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2007; 6:295-303.

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

Strittmatter WJ, Roses AD. Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease. *Proc.Natl. Acad. Sci*. 1995; 92:4725 - 4727.

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

Swerdlow RH. Is aging part of Alzheimer's disease, or is Alzheimer's disease part of aging? *Neurobiology of Aging*. 2007; 28:1465 – 1480.

Tabert MH, Manly JJ, Liu X, Pelton GH, Rosenblum S, Jacobs M, Zamora D, Goodkind M, Bell K, Stern Y, Devanand DP. Neuropsychological prediction of conversion to Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *Arch. Gen. Psychiatric*. 2006; 63:916 – 924.

Tang K, Hynan L, Baskin F, Rosenberg RN. Platelet amyloid precursor protein processing: a bio marker for Alzheimer's disease. *Journal of the neurological sciences*. 2006; 240:53 – 58.

Thomas AV, Berezovska O, Hyman BT, Von Arnim CAF. Visualizing interaction of proteins relevant to Alzheimer's disease in intact cells. *Methods*. 2008; 44:299 – 303.

Turner AJ, Fisk L, Nalivaeva NN. Targeting amyloid-degrading enzymes as therapeutic strategies in neurodegeneration. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004; 1035:1 – 20.

Waldau B, Shetty AK. Behavior of neural stem cells in the Alzheimer brain. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008; 65(15):2372-84.

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

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

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

Winblad B, Palmer K, Kivipelto M, Jelic V, Fratiglioni L, Wahlund LO, Nordberg A, Bäckman L, Albert M, Almkvist O, Arai H, Basun H, Blennow K, de Leon M, DeCarli C, Erkinjuntti T, Giacobini E, Graff C, Hardy J, Jack C, Jorm A, Ritchie K, van Duijn C, Visser P, Petersen RC. Mild cognitive impairment - beyond controversies, towards a consensus: report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. *J Int Medicine.* 2004; 256:240 – 6.

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

Wolfe MS, Guénette SY. APP at a glance. *Cell Science at a Glance.* 2007; 120 (18):3157 – 3161.

Zainaghi IA. Fosfolipase A2, fluidez de membrana e proteína precursora do amiloide em plaquetas na doença de Alzheimer e

comprometimento cognitivo leve [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

Zainaghi IA, Forlenza OV, Gattaz WF. Abnormal APP processing in platelets of patients with Alzheimer's disease: correlations with membrane fluidity and cognitive decline. *Psychopharmacology*. 2007; 192:547 – 553.

Zhu X, Lee H, Perry G, Smith MA. Alzheimer disease, the two hit hypothesis: an update. *Biochimica et biophysica acta*. 2006.