



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

LIDIER ROBERTA MORAES NOGUEIRA

**COMPARAÇÃO DE PLACAS E EMANRANHADOS NA DOENÇA DE ALZHEIMER
ATRAVÉS DA HISTOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA**

RECIFE

2016

LIDIER ROBERTA MORAES NOGUEIRA

**COMPARAÇÃO DE PLACAS E EMANRANHADOS NA DOENÇA DE ALZHEIMER
ATRAVÉS DA HISTOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Coorientador: Prof. Dr. Roberto José Vieira de Mello

Prof. Dr. Luciano Tavares Montenegro

Linha de Pesquisa: Modelos Morfofisiológicos e Imunológicos das Doenças.

RECIFE

2016

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

N778c Nogueira, Lidier Roberta Moraes.
Comparação de placas e emaranhados na doença de Alzheimer através da histologia e imuno-histoquímica / Lidier Roberta Moraes Nogueira. – 2016.
90 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Manuela Figueiroa Lyra de Freitas.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Doença de Alzheimer. 2. Imuno-histoquímica. 3. Diagnóstico. 4. Emaranhados neurofibrilares. I. Freitas, Manuela Figueiroa Lyra de (Orientadora). II. Título.

616.07

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-072)



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Centro de Ciências da Saúde - UFPE

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife – PE

Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo

Fone/Fax: (81) 2126.8529

<http://www.ppgpatologiaufpe.com>

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA

AUTORA: Lidier Roberta Moraes Nogueira

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: COMPARAÇÃO DE PLACAS E EMANRANHADOS NA
DOENÇA DE ALZHEIMER ATRAVÉS DA HISTOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA**

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

DATA DA DEFESA: 14 de Setembro de 2016

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Prof^a. Dra. Liriane Baratella Evêncio

Prof. Dr. Fernando Vagner Lobo Ladd

RECIFE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

R E I T O R

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE- REITOR

Prof^a. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof^a. Adriana Maria da Silva Telles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof^a. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Jacinto da Costa Silva Neto

SECRETÁRIA DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Margarete Valdevino da Silva

RECIFE

2016

“Para minha mãe, minha heroína, que é responsável pelo o que hoje eu sou e para meu avô Luiz Morais de Oliveira (in memorian), que apesar de nunca ter frequentado a escola, sempre foi meu maior incentivo nos estudos.”

AGRADECIMENTOS

Ao senhor DEUS, pela saúde e força para superar todas as dificuldades encontradas e por me permitir acordar todos os dias e ir à luta sem jamais deixar de sonhar.

Agradeço e dedico especialmente a minha família, por sempre torcer e acreditar em mim, pela compreensão, principalmente, nos momentos que fui ausente. Vocês são meu alicerce.

À minha orientadora, Prof^a Manuela, por ter sido paciente em minha jornada, além de ter me acolhido quando fiquei sem orientador. Obrigada pela confiança.

Aos meus co-orientadores, Prof^o Bob (Roberto Vieira) e Prof^o Luciano Montenegro, pela disponibilidade e ajuda sempre que precisei.

Aos amigos do Hospital Miguel Arraes e IMIP, por me ajudarem todas as vezes que necessitei de trocas de plantão para cumprir com meus compromissos acadêmicos.

Às minhas queridas amigas para todas as horas, Juliana Alves e Fernanda Siqueira, com quem posso dividir meus momentos de angústia e sempre receber uma palavra de conforto, tornando o fardo mais leve, seja de longe ou de bem pertinho. Vocês são demais, amo vocês!!!

A um anjo em forma de amigo, Alyssandra Almeida, obrigada pelo incentivo.

Aos amigos de turma de mestrado (Patologia-UFPE 2014) pelos bons momentos compartilhados e pelas trocas ao longo de nossa convivência. Em especial, agradeço a Leonilda Gondim, por todo seu companheirismo em todos os momentos e por construir uma amizade para toda vida. Obrigada também a você Peixinho (Felipe Peixe), nossos dias foram muito mais leves.

A todos que fazem o Programa de Pós-Graduação em Patologia/CCS/UFPE. Margarete Valdevino, que tanto me salvou com extrema paciência e compreensão nas dúvidas e questões do dia a dia. Obrigada, Silvana Paz, por sua importantíssima contribuição neste trabalho, pela acolhida e amizade.

Ao professor Daniel Perez, do Departamento de Odontologia Preventiva/CCS/UFPE, pela contribuição nas digitalizações das lâminas analisadas.

A todo corpo docente do mestrado e a banca examinadora por aceitar o convite e pela contribuição em minha formação e todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação.

Não poderia deixar de agradecer a Paulo Thiago, por ter me dado força desde o dia que decidi fazer um curso de extensão e prova para mestrado, lhe sou muito grata!!

No final desse ciclo, tenho certeza que sou muito sortuda por ter convivido e conhecido pessoas tão especiais.

Com amor,
Lidier Roberta

“Concedei-me, Senhor, Serenidade necessária, para aceitar as coisas que não posso modificar,
Coragem para modificar aquelas que posso e Sabedoria para distinguir umas das outras.”

Reinhold Niebuhr

RESUMO

Com o aumento da expectativa de vida, um grande número de indivíduos atinge uma idade crítica para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas causadoras de demências. Dentre elas encontra-se em destaque a Doença de Alzheimer, que é caracterizada por um quadro clínico de declínio progressivo e irreversível de algumas funções cognitivas e intelectuais. As anormalidades histopatológicas observadas no tecido cerebral obtido através de autopsias para o diagnóstico definitivo são: emaranhado neurofibrilares e placas senis encontrados em diversas regiões. O presente estudo comparou a presença de placas senis e emaranhados neurofibrilares com a imunohistoquímica e histologia convencional em cortes histológicos de hipocampo de portadores de Doença de Alzheimer, considerando também os aspectos clínicos e epidemiológicos. Foram analisados 53 preparações histológicas de hipocampo de indivíduos portadores da Doença de Alzheimer. Destes, apenas 34 seguiram para a produção de lâminas e posterior coloração. A idade média foi de $80,03 \pm 8,83$, com um percentual de 76,5% do sexo feminino e 23,5% masculino. A reação imunohistoquímica com a proteína TAU mostrou uma maior capacidade de visualização das placas e emaranhados no hipocampo (p -valor $< 0,05$) quando comparada com a coloração pelo método de prata e hematoxilina-eosina e a área CA1 do hipocampo foi a mais comprometida em diferentes faixas de idade. Sendo assim, este estudo mostra que a imunohistoquímica é mais sensível na identificação de placas senis e de emaranhados neurofibrilares. Sugerindo que a histologia convencional pode subestimar o diagnóstico de Doença de Alzheimer.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer. Imunohistoquímica. Diagnóstico. Emaranhados Neurofibrilares.

ABSTRACT

With increasing life expectancy of a large number of individuals can reach a critical age for the development of neurodegenerative diseases causing dementia such as Alzheimer's disease, which is characterized by a clinical picture of progressive and irreversible decline of some cognitive and intellectual functions. The histopathological abnormalities in brain tissue obtained at autopsy for definitive diagnosis are neurofibrillary tangle, and senile plaques found in various brain regions. To that end, this compared the presence of senile plaques and neurofibrillary tangles in tissue sections of hippocampi of Alzheimer's Disease patients with immunohistochemistry and conventional histology, evaluating clinical and epidemiological aspects. 53 patients were analyzed hippocampus blocks of Alzheimer's disease. Of these, only 34 followed for the production of plates and subsequent staining. The mean age was 80.03 (\pm 8.83), with a percentage of 76.5% female and 23.5% male. The immunohistochemical reaction with protein tau showed a greater ability in expression and visualization of plaques and tangles in the hippocampus ($p < 0.05$) compared with silver staining method, and hematoxylin-eosin and CA1 area of the hippocampus was the most affected in different age groups. Thus, this study shows that immunohistochemistry is more sensitive in the identification of senile plaques and neurofibrillary tangles. Suggesting that conventional histology may underestimate the diagnosis of Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer Disease. Immunohistochemistry. Diagnosis. Neurofibrillary Tangles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimativa do número de pessoas afetadas por Demência.....	19
Figura 2. Projeções da população e do envelhecimento populacional.	22
Figura 3. Neuropatologista Alois Alzheimer e sua paciente Auguster Deter. ...	23
Figura 4. Marcadores histopatológicos da Doença de Alzheimer.....	26
Figura 5. Esquema representativo das vias de clivagem da APP.	27
Figura 6. TAU hiperfosforilada, desestabilizando os microtúbulos e formando os emaranhados neurofibrilares.....	29
Figura 7. Etapas da imunohistoquímica.	42
Figura 8. Imagem óptica do SCAN 1.15.2 3DHISTECH® mostrando a seleção da área de imunoreatividade para proteína TAU.....	42
Figura 9. Esquema representativo das etapas realizadas na produção das lâminas na histologia convencional.	43
Figura 10. Imagem óptica do SCAN 1.15.2 3DHISTECH® mostrando tecido corado com hematoxilina-eosina.....	43
Figura 11. Imagem óptica do SCAN 1.15.2 3DHISTECH® mostrando a seleção da área de imunoreatividade.....	44
Figura 12. Imagem óptica do SCAN 1.15.2 3DHISTECH® mostrando a seleção da área de imunoreatividade para proteína TAU do hipocampo demarcado em três regiões.	46
Figura 13. Imagem óptica do SCAN 1.15.2 3DHISTECH® mostrando a seleção da área de imunoreatividade para proteína TAU do hipocampo demarcado em três regiões com objetiva de 20x.....	46

Artigo Original

Figura 1. Cortes histológicos de uma mesma área do hipocampo do mesmo indivíduo portador da Doença de Alzheimer	57
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Artigo Original

Tabela 1. Perfil clínico-epidemiológico dos indivíduos com DA.	56
Tabela 2. Comparativo de emaranhados neurofibrilares e placas senis por áreas do hipocampo.	58
Tabela 3. Análise descritiva do total de placas senis por área do hipocampo .	59
Tabela 4. Comparação das três áreas do hipocampo na expressão de emaranhados neurofibrilares nas diferentes faixas etárias.	60
Tabela 5. Análise descritiva do total de placas senis e emaranhados neurofibrilares por área do hipocampo nas três faixas etárias.	61
Tabela 6. Comparação das três áreas do hipocampo na expressão de placas senis e emaranhados neurofibrilares nas diferentes faixas etárias	62
Tabela 7. Comparação do número de placas senis e emaranhados neurofibrilares nas diferentes faixas etárias	63
Tabela 8. Comparação do número de placas senis e emaranhados neurofibrilares no hipocampo por gênero.	63
Tabela 9. Comparação do número de placas senis e emaranhados neurofibrilares nas três áreas no hipocampo por gênero.	64
Tabela 10. Comparação do número de placas senis e emaranhados neurofibrilares no hipocampo com graus de escolaridade.	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag-Ac Antígeno-Anticorpo

ABRAZ Associação Brasileira de Alzheimer

APP Proteína Precursora Amilóide

ApoE Apolipoproteína E

A β Beta-Amilóide

BSA Soro Albumina Bovina

CA Corno de Amon ou Hipocampo

CAAE Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CEP Comitê de Ética em Pesquisas

CCS Centro de Ciências da Saúde

CERAD Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease

CAMDEX Cambridge Exame para Transtornos Mentais

CNS Conselho Nacional de Saúde

DAF Doença de Alzheimer Familiar

DAB Diaminobenzidina

DA Doença de Alzheimer

EN Emaranhados Neurofibrilares

HE Hematoxilina Eosina

HC Hospital das Clínicas

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IHQ Imunohistoquímica

IHQ-TAU Imunohistoquímica para proteína TAU

NINCDS-ADRDA Instituto Nacional de Neurologia e a Associação de Doenças de Comunicação e Doença de Alzheimer

OMS Organização Mundial de Saúde

POSPAT Programa de Pós Graduação em Patologia

PS Placas Senis

PSA Ácido Periódico de Schiff

PE Pernambuco

PBS Tampão Fosfato-salina

SVO Serviço de Verificação de Óbitos

TAU Taurina

UFPE Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1	Envelhecimento Populacional	22
2.2	A Doença de Alzheimer	23
2.3	Sinais e Sintomas da Doença de Alzheimer	24
2.4	Fisiopatologia e Patogênese da Doença de Alzheimer	25
2.5	Fatores de Risco para Doença de Alzheimer	30
2.6	Fatores Predisponentes para Doença de Alzheimer	30
2.7	Classificação da Doença de Alzheimer	32
2.8	Diagnóstico Doença de Alzheimer	32
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVO GERAL	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	METODOLOGIA	38
4.1	TIPO DE ESTUDO	38
4.2	ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	38
4.3	LOCAL DE ESTUDO	38
4.4	POPULAÇÃO ALVO E PERÍODO	39
4.5	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	39
4.6	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	39
4.7	MÉTODOS DE COLETA E ANÁLISE DE MATERIAL BIOLÓGICO	40
4.7.1	Avaliação Neuropatológica	40
4.7.2	Imunohistoquímica para Proteína TAU	40
4.7.3	Histologia Convencional	42
4.7.3.1	Coloração por Hematoxilina-Eosina	44
4.7.3.2	Coloração por Prata	44
4.7.4	Análise Microscópica através do Panoramic Viewer SCAN	
1.15.2	3DHISTECH®	45
4.8	COLETA DE DADOS	47
4.8.1	Instrumento de Coleta	47
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47

5. RESULTADOS - ARTIGO ORIGINAL	48
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
REFERÊNCIAS.....	79
APÊNDICE.....	85
APÊNDICE A – FÓRMULARIO DE COLETA DE DADOS.....	85
ANEXOS.....	86
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/CCS/UFPE.....	86

1 INTRODUÇÃO

A drástica mudança no perfil populacional vista nas últimas décadas resultou no fenômeno do envelhecimento, com a variação da fecundidade, o aumento da expectativa de vida e a longevidade humana (APRAHAMIAN *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2013).

Com esse aumento da expectativa de vida, um grande número de indivíduos pode atingir uma idade crítica para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas causadoras de demências (GOMES *et al.*, 2013; PUZZO *et al.*, 2014). A instalação dessas demências tem como fator de risco principal a idade, que tende a aumentar sua prevalência, como observado na Doença de Alzheimer (DA), que é a principal causa da síndrome demencial adquirida com a senilidade (CAÇÃO *et al.*, 2007; JIMÉNEZ e VARGAS, 2007; VALENTE *et al.*, 2010; HYMAN *et al.*, 2012).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), no mundo inteiro, cerca de 35,6 milhões de pessoas vivem com demência. Este número deverá dobrar até 2030 (65,7 milhões) e mais do que triplicar até 2050 (115,4 milhões) (figura 1) (OMS, 2012).

Dentre todas as demências, a DA corresponde a 60-70% dos casos (BURLÁ *et al.*, 2013). Seu custo com cuidados de saúde está estimado em torno de 172,000 milhões dólares por ano em alguns países da Europa e Estados Unidos (DIAS *et al.*, 2013; REITZ e MAYEUX, 2014). Segundo a Associação Brasileira de Alzheimer (ABRAZ), no Brasil estima-se que existam cerca de 1,2 milhões de pessoas acometidas por essa demência (ABRAZ, 2014).



Figura 1- Estimativa do número de pessoas afetadas por Demência entre 2010 e 2050 no mundo inteiro. Adaptado de: http://www.scml.pt/pt-PT/áreas_de_investigacao/doencas_neurodegenerativas/informação_geral/

A DA é uma doença típica do idoso. Sua prevalência é de 5% aos 65 anos e dobra a cada cinco anos, chegando a 30% dos idosos com mais de 85 anos (APRAHAMIAN *et al.*, 2009; BALLARD, 2011). A taxa de incidência de demência aumenta exponencialmente com a idade, com o aumento mais pronunciado ocorrendo ao longo da sétima e oitava década de vida (SELFRIDGE *et al.*, 2013; REITZ e MAYEUX, 2014). É caracterizada por um quadro clínico insidioso decorrente do declínio progressivo e irreversível de algumas funções cognitivas e intelectuais, como por exemplo, memória (evento de maior magnitude), orientação no tempo e no espaço, pensamentos abstratos, aprendizagem, incapacidade de fazer cálculos simples, distúrbios de linguagem, comunicação e na incapacidade de realizar atividades de vida diária (KARRAN *et al.*, 2011; AHMED *et al.*, 2013). Tais sintomas são normalmente acompanhados de distúrbios comportamentais, como agressividade, alucinações, hiperatividade, irritabilidade e depressão (HARTMANN *et al.*, 2004; HYMAN *et al.*, 2012).

As anormalidades histopatológicas observadas no tecido cerebral obtido através de autopsias ou necropsias são: emaranhado neurofibrilar (EN) intracelular (proteína TAU (Taurina) em sua forma anormal associada à

microtúbulos) e as placas senis (PS) extracelulares difusas (depósitos ricos em proteína beta-amilóide- A β) encontrados em regiões cerebrais responsáveis pela cognição, incluindo o área de associação, córtex cerebral, hipocampo e o núcleo estriado ventral. Essas lesões são acompanhadas de microgliose reativa, perda neuronal, perda de massa branca com atrofia cerebral difusa e consequente redução de sinapses (SERRANO-POZO *et al.*, 2011; VANDENBERGHE *et al.*, 2013). As referidas estruturas não são específicas da DA, pois podem ser encontradas em casos onde o idoso não apresenta demência. Com estas alterações, o cérebro do idoso apresenta-se com redução de sua capacidade de realizar sinapses (BYRNE *et al.*, 2009).

Estudos *post mortem* têm revelado que as áreas cerebrais mais atingidas na DA são o córtex de associação e o hipocampo, com relativa preservação do cerebelo, córtex primário motor, auditivo, sensitivo e visual. Por outro lado evidencia o comprometimento precoce da memória recente (hipocampo) e a conservação, pelo menos nas fases iniciais, da marcha e das capacidades motoras visuais (ANDRADE-MORAES *et al.*, 2013; MICHAEL *et al.*, 2014). Embora haja certa preservação da memória remota em fase inicial, a perda da memória é global com a evolução da doença e na fase avançada observa-se a tríade: apraxia, agnosia e afasia (BLENNAW *et al.*, 2006; VANDENBERGHE *et al.*, 2013).

Apesar de ser uma doença multifatorial, os mecanismos subjacentes às lesões permanecem obscuros. Vários pesquisadores relatam o envelhecimento cerebral como a principal causa e o fator genético como um risco para o desenvolvimento da demência, em especial as de início precoce, nas quais encontram-se as mutações genéticas específicas (TORRÃO *et al.*, 2012;

PUZZO *et al.*, 2014). Além desses, os fatores ambientais também podem contribuir para o surgimento das lesões histopatológicas (HERRUP, 2010; REITZ e MAYEUX, 2014). Diversos estudos investigaram o quadro clínico, progressão dos sintomas, anatomopatologia e a correlação destes. Os mesmos, relatam que em todos os casos há uma perda de memória esporádica (inicialmente) e uma progressão para dificuldades em aquisição de novas habilidades associadas a prejuízo nas funções cognitivas (SERRANO-POZO *et al.*, 2011; BALLARD, 2011).

No entanto, um diagnóstico definitivo só pode ser realizado através de exame anatomopatológico. É possível fazer uma avaliação clínica e estabelecer um diagnóstico possível ou provável, através de história médica do paciente e de sua família, do exame neurológico, de testes neuropsicológicos, exame físico, avaliação psiquiátrica, exames laboratoriais e exames de imagem como a tomografia computadorizada e ressonância magnética (HARTMANN *et al.*, 2004; JIMÉNEZ e VARGAS, 2007; APRAHAMIAN *et al.*, 2009; KARRAN *et al.*, 2011).

Sabendo-se da importância de um bom método de coloração, no que diz respeito ao custo/benefício e que apesar de muitos estudos terem avançado sobre o conhecimento da patologia da DA e do seu diagnóstico, vários aspectos ainda não estão totalmente esclarecidos, principalmente os relacionados ao diagnóstico histológico, resultando em casos subdiagnosticados. Além disso, é extrema importância o conhecimento da comunidade científica a respeito da caracterização neuropatológica e as diferentes implicações relacionadas a escolaridade nas diferentes regiões do Brasil. O presente estudo analisou a presença de placas senis e emaranhados

neurofibrilares em cortes histológicos de hipocampus de portadores de Doença de Alzheimer através de imunohistoquímica e histologia convencional (hematoxilina eosina e impregnação por prata) buscando comparação das técnicas na detecção destas anormalidades neuroanatomopatológicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O ENVELHECIMENTO POPULACIONAL

A pirâmide etária nos últimos anos apresenta-se com mudanças decorrentes do envelhecimento populacional. Segundo dados de 2011 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a população idosa brasileira em 1980 era de 6% e em 2011 esse número passou a ser 10% da população total. Projeções estatísticas estimam que um aumento de 87,4% de 2010 a 2030 e 298,2% de 2030 a 2050, o que corresponde a 52 milhões de brasileiros idosos (LEITE *et al.*, 2011) (figura2).

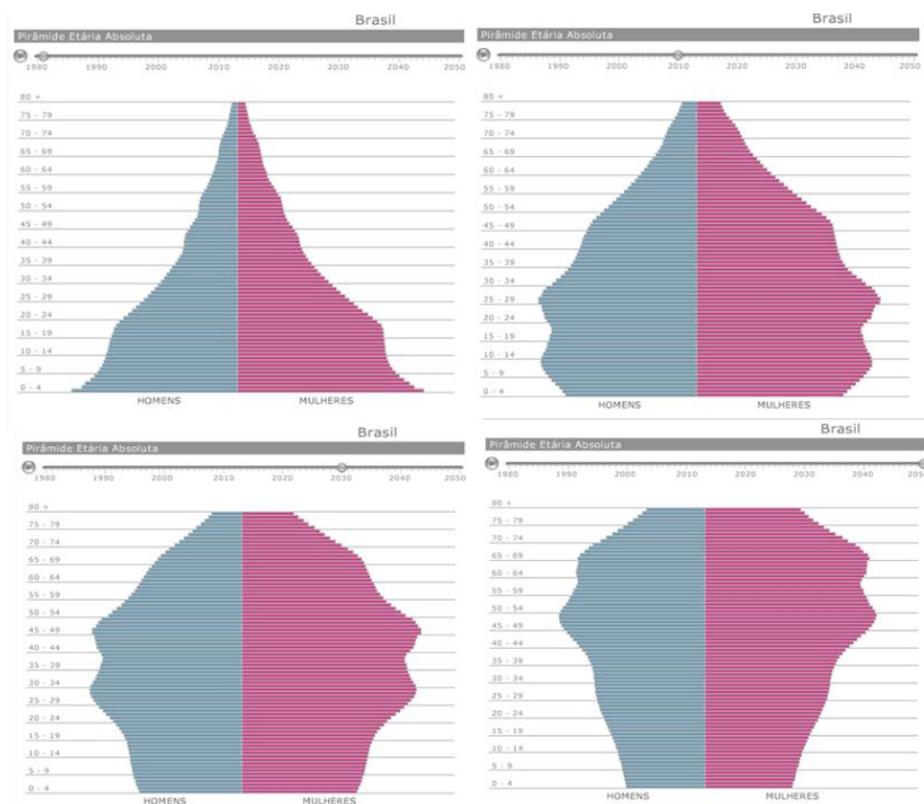
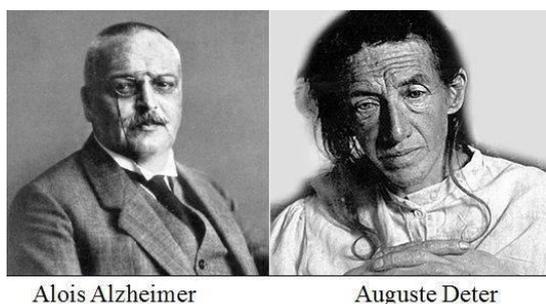


Figura 2- Projeções da população e do envelhecimento populacional em 1980, 2011, 2030 e 2050. Fonte: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2008/piramide/piramide.shtm

Associadas a esse perfil, as estimativas de crescimento da prevalência das demências e outras doenças crônico degenerativas apontam para proporções epidêmicas em escala mundial. A DA é a forma mais comum de demência em idoso, causada pelo envelhecimento cerebral (ANDRADE-MORAES *et al.*, 2013; PUZZO *et al.*, 2014).

2.2 A DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA foi descrita primeiramente há mais de 100 anos no 37º Encontro de Psiquiatria do Sudoeste da Alemanha em Tübingen pelo psiquiatra e neuropatologista alemão Alois Alzheimer que após análise clínica e anatomopatológica de uma paciente de 51 anos de idade, fez associação das alterações psíquicas a lesões no tecido cerebral *post mortem* (KARRAN *et al.*, 2011; SELFRIDGE *et al.*, 2013). Tratava-se de um problema dentro de neurônios, os quais pareciam atrofiados e cheios de placas estranhas com fibras retorcidas, entrelaçadas umas as outras. Estas lesões estavam relacionadas com as alterações de cognição e personalidade da paciente (VERDILE *et al.*, 2004; HERRUP, 2010) (figura 3).



Alois Alzheimer

Auguste Deter

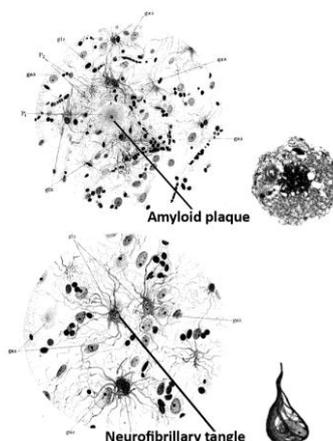


Figura 3- Neuropatologista Alois Alzheimer e sua paciente Auguster Deter. Desenhos por Alois Alzheimer, mostrando as alterações patológicas observadas no cérebro. Adaptado de: <http://www.alz.org/>

Definida como uma doença degenerativa progressiva cerebral primária, de etiologia desconhecida, com características neuropatológicas e neuroquímicas próprias, a DA é caracterizada neuropatologicamente pela presença de depósitos extraneuronais compostos do peptídeo amilóide e modificações fibrilares intraneuronais da proteína TAU e clinicamente caracterizada por declínio sutil das funções relacionadas à memória, mudanças na personalidade, deterioração da linguagem e eventuais disfunções motoras. (HERRUP, 2010; REITZ e MAYEUX, 2014).

2.3 SINAIS E SINTOMAS DA DOENÇA DE ALZHEIMER

As manifestações clínicas de anormalidades cognitivas e neuropsicológicas são diversas. O prejuízo da memória, perda progressiva de funções cognitivas e amnésia são os eventos de maior magnitude (SELFIDGE *et al.*, 2013). Existe um longo período de alterações neurológicas e declínio cognitivo antes da doença ser diagnosticada, marcado pela presença de uma fase de deficiência cognitiva leve com branda perda de memória, chamada de fase pré-clínica (HYMAN *et al.*, 2012; PUERTAS *et al.*, 2013). A apresentação do quadro clínico nos estágios iniciais geralmente é marcada pela perda de memória episódica e dificuldades de aquisição de novas habilidades, evoluindo gradualmente com prejuízos de outras funções cognitivas, tais como julgamento, cálculo e raciocínio. Nos estágios intermediários, pode ocorrer afasia fluente e também apraxia. Nos estágios

terminais, encontram-se marcantes alterações do ciclo sono-vigília, alterações comportamentais, como irritabilidade e agressividade, sintomas psicóticos, incapacidade de deambular, falar e realizar cuidados pessoais (LACE *et al.*, 2009; AHMED *et al.*, 2013; LIRAZ *et al.*, 2013).

2.4 FISIOPATOLOGIA E PATOGÊNESE DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Ao longo do curso de envelhecimento, diferentes mecanismos de neurodegeneração prevalecem nas distintas regiões acometidas, de acordo com a idade do paciente e dos fatores de risco ambientais e genéticos presentes (LACE *et al.*, 2009). As lesões cerebrais observadas na histologia, que se correlacionam com a DA são: atrofia cortical difusa por morte progressiva de neurônios associada à presença de PS (depósitos extraneuronais compostos da peptídeo A β) e EN (modificações fibrilares intraneuronais da proteína TAU), encontrados principalmente e inicialmente em córtex de associação e hipocampo (KARRAN *et al.*, 2011; ANDRADE-MORAES *et al.*, 2013; MICHAEL *et al.*, 2014; CASTELLANI e PERRY, 2014) (figura 4).

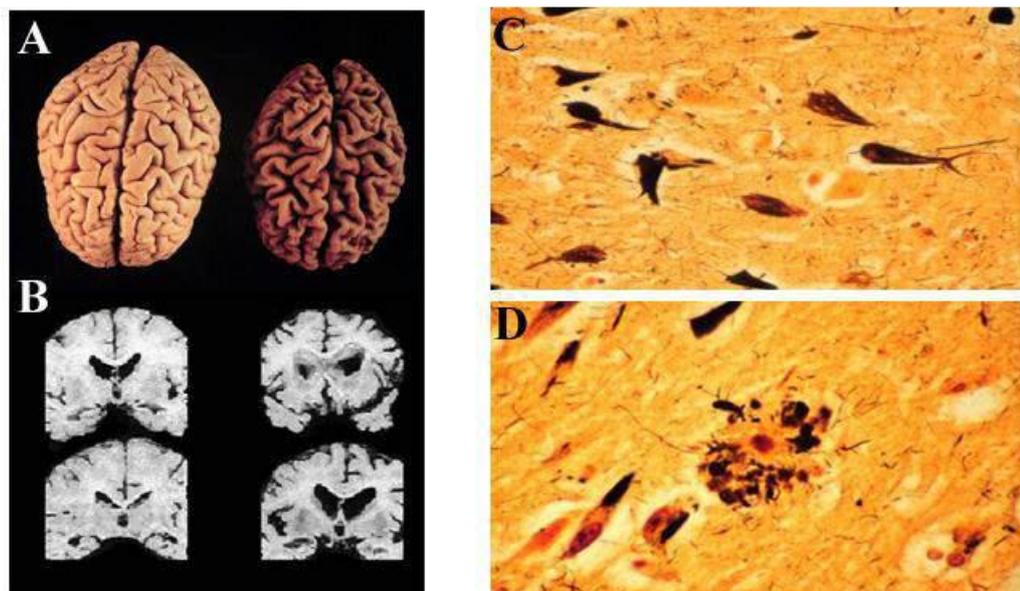


Figura 4- Lesões no tecido cerebral encontrados na Doença de Alzheimer. A) Alargamento dos sulcos, estreitamento dos giros e redução do volume cerebral B) Cortes coronais revelam o aumento do volume ventricular e a perda de massa cerebral. C) Emaranhados neurofibrilares corados por prata. D) Placas senis coradas por prata. Adaptado de www.alzheimer.sk.ca

Todo esse processo fisiopatológico precede, em anos ou décadas, o aparecimento de sintomas clínicos objetivos ou subjetivos, e podem ser encontrados em indivíduos com ausência de sintomas clínicos, assim como, em menor proporção no tecido cerebral de idosos normais (HERRUP, 2010; SERRANO-POZO *et al.*, 2011; HYMAN *et al.*, 2012; LIRAZ, *et al.*, 2013).

As PS são depósitos esféricos extracelulares compostos principalmente pelo peptídeo A β , que contem 40 a 42 aminoácidos (KARRAN *et al.*, 2011). Apresenta-se com um núcleo central amilóide e uma coroa de células neuronais distróficas associadas à micróglias e astrócitos reativas (SERRANO-POZO *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2013). O fragmento A β é derivado da clivagem proteolítica de proteína transmembrana precursora de amilóide (APP), expressa na superfície celular, que possui papel na facilitação do crescimento neuronal, na sobrevivência da célula e na regulação da atividade da proteína

G. (CARAMELLI *et al.*, 2001; APRAHAMIAN *et al.*, 2009; NIJHOT, 2012; PUZZO *et al.*, 2014).

A APP é metabolizada por duas vias diferentes, uma principal não-amiloidogênica e uma alternativa amiloidogênica. A primeira é resultado da clivagem proteolítica da APP, por atividade enzimática α -secretase e posteriormente da γ -secretase, uma forma solúvel de peptídeo não amiloidogênico é liberada da superfície celular e esta não forma fragmento A β (GOMES *et al.*, 2013; PUZZO *et al.*, 2014). Entretanto, ao ser clivada pela enzima β -secretase e γ -secretase, origina fragmentos A β insolúveis da via amiloidogênica e este parece ter um papel mais importante na neurotoxicidade que as placas amiloides formadas (figura 5) (WU *et al.*, 2011; KARRAN *et al.*, 2011; NIJHOT, 2012; CASTELLANI e PERRY, 2014; MICHAEL *et al.*, 2014).

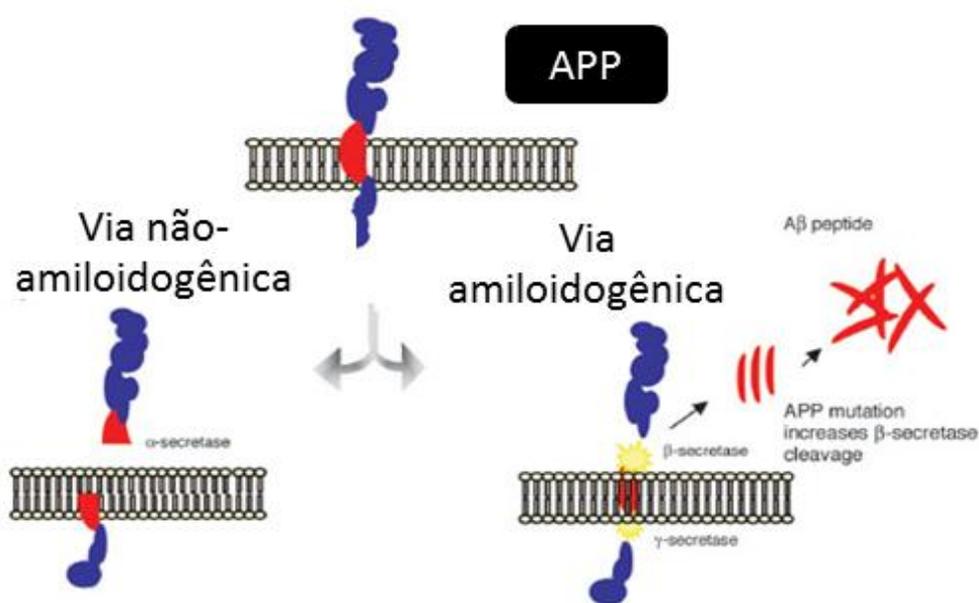


Figura 5- Esquema representativo das vias de clivagem da APP e formação do peptídeo beta-amilóide . Adaptada: De Paula VJR, et al 2009.

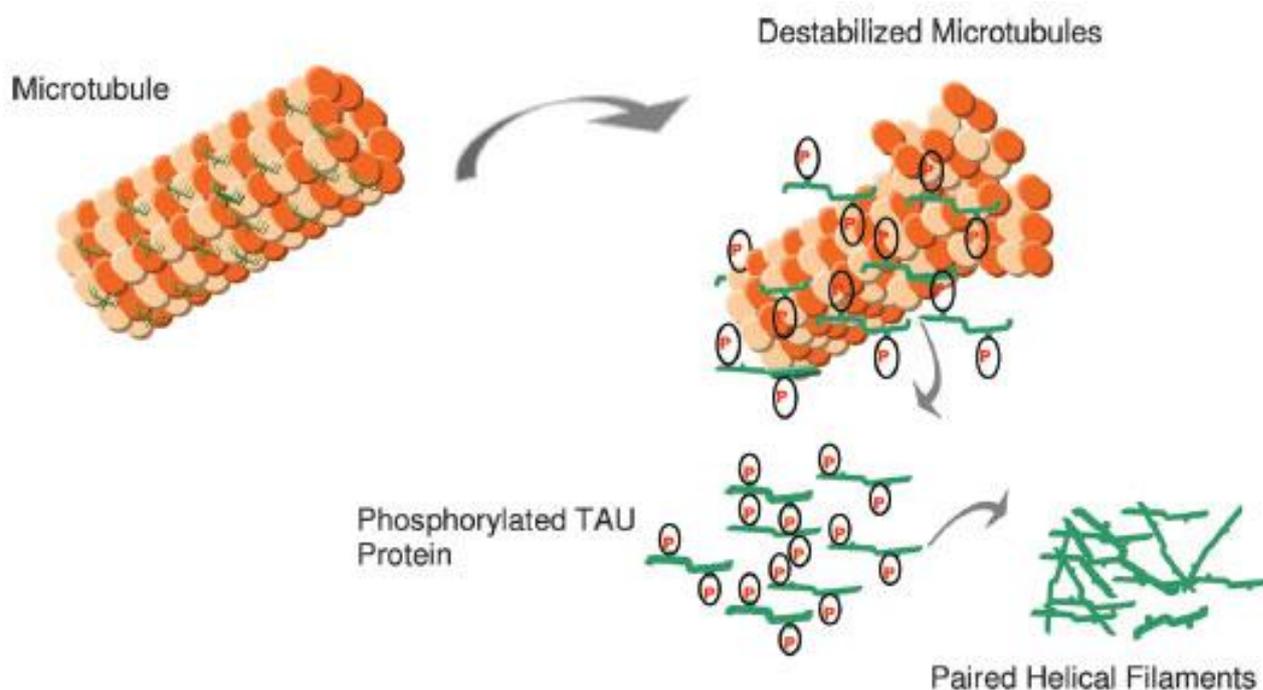
A patogênese da DA está centralizada nas propriedades deste peptídeo A β , em agregar-se rapidamente, formar lâminas e tornar-se

relativamente resistente à degradação e os efeitos do seu acúmulo incluem, o excesso de produção de radicais livres e danos peroxidativos de proteínas, lipídeos e outras macromoléculas (HERRUP, 2010; WU *et al.*, 2011 LIRAZ *et al.*, 2013; JACOB *et al.*, 2013). Esta cascata de eventos da hipótese amiloidogênica é a mais estudada e aceita da patogênese da DA, e tem dado enorme suporte para que o acúmulo de A β seja um evento necessário e invariante no desenvolvimento de DA, pois as diversas alterações genéticas envolvidas na DA tem como produtos gênicos o aumento na produção e/ou deposição cerebral de peptídeos A β (BLENNAW *et al.*, 2006; KARRAN *et al.*, 2011; SERRANO-POZO *et al.*, 2011). Entretanto, a causa da doença está relacionada à interação de múltiplos fatores genéticos e ambientais, pois esse peptídeo não é suficiente para disparar todo processo patológico da DA e, além disso, foram identificados indivíduos com doença amilóide sem prejuízos cognitivos e neurodegeneração, permanecendo obscuro o motivo do disparo da produção excessiva do tóxico A β e o início dos sinais da doença. Outros eventos patogênicos estão sendo elucidados (CARAMELLI *et al.*, 2001).

Dados das formas familiares da DA sugeriram, no entanto, que a A β é uma molécula crítica na patogênese desta demência. Estando relacionada com a neurodegeneração e com outras características da DA como a hiperfosforilação da proteína TAU e os emaranhados por aumentar a atividade de algumas enzimas envolvidas. (HARTMANN *et al.*, 2004; KARRAN *et al.*, 2011)

Os EN são compreendidos pelos feixes de filamentos, insolúveis e resistentes à eliminação *in vivo*, localizados no citoplasma perinuclear. É composto por proteínas TAU com alteração química estrutural em estado

hiperfosforilado (KARRAN *et al.*, 2011; PUZZO *et al.*, 2014). A proteína TAU é responsável pela agregação e estabilização de microtúbulos que transportam nutrientes e informações dos prolongamentos dos neurônios ao seu corpo celular e vice-versa (CASTELLANI e PERRY, 2014). Ao ser modificada, a proteína TAU perde a capacidade de polimerizar e passa a se agregar de forma insolúvel aos microtúbulos, desestabilizando-os. Como consequência, se dissocia dos microtúbulos e leva a ruptura da estrutura do citoesqueleto celular, levando inicialmente ao colapso desses sistemas e posteriormente a morte de neurônios. A causa dessa modificação na TAU ainda é desconhecida e sua evolução é crucial no desenvolvimento dessa demência e determinação da gravidade clínica (figura 6) (KARRAN *et al.*, 2011; HYMAN *et al.*, 2012;



TAKEDA *et al.*, 2013).

Figura 6- TAU hiperfosforilada, desestabilizando os microtúbulos e formando os emaranhados neurofibrilares. Adaptada: De Paula VJR, et al 2009.

2.5 FATORES DE RISCO PARA DOENÇA DE ALZHEIMER

A maioria dos casos da doença é esporádica, embora pelo menos 5 a 10% dos casos sejam familiares e sua etiologia ainda é desconhecida (ANDRADE-MORAES *et al.*, 2013). Estudos epidemiológicos indicam vários fatores relacionados com a sua causa, entre eles, a idade é o mais importante, visto que a DA é predominantemente senil e sua prevalência aumenta de forma exponencial à medida que o tempo passa (LACE *et al.*, 2009; HERRUP, 2010). Além da idade e da genética, outros fatores de risco não genéticos estão associados ao seu desenvolvimento, como doenças cerebrovasculares, trauma crânio-encefálico, sexo feminino, etnia caucasiana, hipertensão arterial sistêmica, diabetes tipo 2 e uso de insulina, peso corporal, dislipidemias, síndrome metabólica e tabagismo (BLENNAW *et al.*, 2006; APRAHAMIAN *et al.*, 2009). Existem também fatores protetores não genéticos contra a disfunção cognitiva, como a dieta rica em peixes e vegetais, uso de antioxidantes, atividade física, educação e atividade intelectual. O aumento da densidade das sinapses torna a relação escolaridade e a prevalência da demência inversamente proporcional (CAÇÃO *et al.*, 2007; PUERTA *et al.*, 2013; REITZ e MAYEUX, 2014).

2.6. FATORES PREDISPOONENTES PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER

Todas as lesões encontradas na DA são causadas por uma complexa interação de múltiplos fatores genéticos e ambientais, o que explica a dificuldade em encontrar um tratamento eficaz. De acordo com a neuroquímica e genética, é claro que seu aparecimento, em graus mais variados de

severidade, deve-se ao acúmulo de eventos genéticos (poligênica ou não) e ambientais (HERRUP, 2010; TORRÃO *et al.*, 2012; PUZZO *et al.*, 2014; REITZ e MAYEUX, 2014).

A DA familiar (DAF) é uma herança, tipo autossômica dominante, e sua estimativa variam de 5-10% (KARRAN *et al.*, 2011; SELFRIDGE *et al.*, 2013). Vários *loci* gênicos associados à doença de início precoce foram identificados para a DA familiar, pelo menos um deles deve participar da neuropatogênese, culminando com o desenvolvimento da doença. As principais mutações herdadas são encontradas nos genes para a APP no cromossomo 21, que resulta em um número aumentado de fragmentos A β (HARTMANN *et al.*, 2004; HERRUP, 2010; KARRAN *et al.*, 2011).

Outros genes envolvidos estão nos cromossomo 14 e 1 e fazem parte da formação das proteínas presenelina-1 e presenelina-2 respectivamente. Estas proteínas são componentes da enzima γ -secretase, responsável pela proteólise da APP. Ao sofrer mutações, essas enzimas são responsáveis pelo aumento do nível de A β . Porém, apenas as alterações nos mesmos não são suficientes e nem necessárias para explicar todos os casos de DA. (APRAHAMIAN *et al.*, 2009; CARAMELLI *et al.*, 2011; HYMAN *et al.*, 2012; REITZ e MAYEUX, 2014; PUZZO *et al.*, 2014).

Um maior risco para o desenvolvimento da DA em sua forma mais agressiva e mais precoce pode ser causado pela presença do polimorfismos do gene da apolipoproteína E (ApoE) no cromossomo 19 (KARRAN *et al.*, 2011; LIRAZ *et al.*, 2013). Por sua alta afinidade com os EN e os fragmentos A β nas PS, o excesso de ApoE, forma complexo estável, alterando o balanço entre

deposição e depuração de A β , favorecendo as placas e afetando a taxa de fosforilação da proteína TAU em favor de formação de fusos neurofibrilares (CAÇÃO *et al.*, 2007; REITZ e MAYEUX, 2014).

Polimorfismos da ApoE traz uma maior predisposição e é mais frequente que as alterações na APP, presenelina-1 e presenelina-2. As alterações nestes últimos genes estão mais relacionadas com a forma rara da DA de início precoce, que corresponde a 5% do total de casos da doença (BLENNAW, *et al.*, 2006; CARAMELLI, *et al.*, 2011; CASTELLANI e PERRY, 2014).

2.7 CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Com base na idade de início, a DA é classificada em dois tipos: DA de início precoce (menos de 65 anos) por causa genética, correspondendo a 1-5% de todos os casos, seria uma forma mais grave com evolução mais rápida e pior prognóstico e DA de início tardio (maior de 65 anos) maior parte da DA, sendo responsável por mais de 95% (TORRÃO *et al.*, 2012; TEIPEL, 2013; REITZ e MAYEUX, 2014).

2.8 DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Descobrir precocemente alterações no cérebro que possam indicar o início da DA é um desafio para neurologia, pois os mecanismos envolvidos na sua patogênese ainda não foram totalmente elucidados, além do seu difícil diagnóstico e ausência de tratamento. A degeneração cerebral primária e consequente declínio das funções intelectuais apresentam características neuropatológicas e neuroquímicas próprias e complexas (VALENTE, *et al.*,

2010; KARRAN *et al.*, 2011; ANDRADE-MORAES *et al.*, 2013; CASTELLANI e PERRY, 2014).

Embora o exame histopatológico do tecido cerebral *post mortem* permaneça necessário para diagnóstico definitivo da DA, a combinação da avaliação clínica, com critérios preestabelecidos e com os modernos exames radiológicos permitem um diagnóstico possível ou provável, acurado em 80 a 90% dos casos (CAÇÃO *et al.*, 2007; KARRAN *et al.*, 2011; BALLARD, 2011).

Desde a sua proposta, em 1984, o Instituto Nacional de Neurologia e a Associação de Doenças da Comunicação e Doença de Alzheimer (NINCDS-ADRDA) estabeleceram critérios que combinam padrões clínicos e neuropatológicos para atribuir diagnósticos de DA possível, provável e definitivo (BLENNAW *et al.*, 2006; BALLARD, 2011; KARRAN *et al.*, 2011).

A. Provável DA – Demência estabelecida por testes neurofisiológicos, por exemplo: Mini Exame de Estado Mental. Aparecimento entre 40 e 90 anos. Alterações de linguagem, habilidades motoras e percepção. Alterações das atividades do dia a dia. Alterações de padrões de comportamento e, frequentemente, tomografia computadorizada do cérebro normal para a idade.

B. Possível DA – Síndrome demencial, na ausência de outras doenças neurológicas, psiquiátricas ou sistêmicas que possa causar demência. Variações no curso da apresentação clínicas das deficiências cognitivas sem aparecimento de co-morbidades que possa justificá-las.

C. Diagnóstico definitivo da DA – São os critérios de Provável DA mais as evidências histopatológicas obtidas por biópsia ou necropsia (MCKHANN, *et al.*, 1984).

Uma nova revisão desta classificação buscou melhorar a especificidade do diagnóstico ao incluir os biomarcadores genéticos e os biomarcadores

adicionais que contribuem para aumentar a especificidade do diagnóstico que inclui várias medições do líquido cefalorraquidiano, sangue e de neuroimagem (TEIPEL, 2013; REITZ e MAYEUX, 2014; CASTELLANI e PERRY, 2014).

O exame clínico busca informações a cerca da história prévia do paciente e seus familiares, como doenças preexistentes, traumas, cirurgias, uso de álcool e drogas lícitas e ilícitas (BLENNAW *et al.*, 2006; BALLARD, 2011). O físico visa identificar déficits neurológicos focais, dificuldade na marcha, lentificação, tremores entre outros sinais que possam contribuir para um diagnóstico diferencial, já que a mudança neuropatológica com presença das placas e emaranhados não exclui a possibilidade de outras lesões coexistentes e que também podem contribuir para a DA (HYMAN *et al.*, 2012).

A avaliação cognitiva é realizada com aplicação de escalas e exame mental para triagem e avaliação mais breve, até testes neuropsicológicos específicos mais abrangentes como o *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease* (CERAD), a *Mttis Dementia Rating Scale* e o CAMDEX (APRAHAIMAN 2009; KARRAN *et al.*, 2011).

No que diz respeito aos exames laboratoriais, a recomendação é apenas para dosagem de hormônio tireo-estimulante e nível sérico da vitamina B12. A análise do líquido cefalorraquidiano para proteína TAU e peptídeo A β só deve ser realizada nos casos de demência pré-senil ou apresentação de curso atípico da doença. Os exames de neuroimagem, como a tomografia computadorizada e ressonância magnética, são utilizadas primordialmente para afastar outras causas de demências (APRAHAIMAN, 2009; CARAMELLI *et al.*, 2011; VANDENBERGHE *et al.*, 2013). Não há marcadores específicos na investigação laboratorial e de imagens da DA, embora alguns achados possam

dar suporte ao diagnóstico clínico (CASTELLANI e PERRY, 2014). Os marcadores moleculares da doença têm sido pesquisados em fluídos e tecidos biológicos, particularmente a detecção de peptídeo A β e suas frações e da proteína TAU hiperfosforilada por métodos que variam de imunohistoquímica (IHQ) a espectrometria de massa. (CARAMELLI *et al.*, 2011).

Por muitos anos, as placas amilóides foram consideradas o achado fisiopatológico decisivo para a caracterização e desenvolvimento da doença. No entanto, vários estudos nas últimas décadas relataram que tais placas possuem fraca correlação com o declínio cognitivo (KARRAN *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2013). O emaranhado neurofibrilar é o primeiro evento fisiopatológico e seu número se correlaciona melhor com o grau de demência do que o número de PS. E, a perda das sinapses, embora não avaliada por métodos histológicos parece ter uma melhor correlação com a severidade da demência. (HARTMANN *et al.*, 2004; VERDILE *et al.*, 2004; ANDRADE-MORAES *et al.*, 2013).

O Sistema de Braak e Braak ao avaliar a dispersão dos emaranhados no córtex classifica a degeneração de forma gradual em seis estágios: I/II- EN no córtex entorrinal, III/IV- EN em hipocampo e amígdalas, V/VI- EN em todo neocórtex (HYMAN *et al.*, 2012; CASTELLANI e PERRY, 2014). As PS são classificadas e pontuadas pelo CERAD ao avaliar sua densidade, onde são observadas em função da idade. A presença de 2-5 placas por 200x é observadas em indivíduos com menos de 50 anos de idade; 8 ou mais placas em indivíduos com idade entre 50-65 anos de idade; mais de 10 placas em indivíduos com idade entre 66-75 anos e mais de 15 placas em indivíduos com

mais de 75 anos de idade (LACE *et al.*, 2009; HYMAN *et al.*, 2012; ANDRADE-MORAES *et al.*, 2013; VANDENBERGHE *et al.*, 2013; MICHAEL *et al.*, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar, dentre os métodos de coloração utilizados, qual o melhor para identificação e quantificação de placas senis e emaranhados neurofibrilares em cortes histológicos de hipocampos de portadores de Doença de Alzheimer, avaliando aspectos clínicos, epidemiológicos, histológicos e imunohistoquímico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Traçar o perfil clínico e epidemiológico dos indivíduos cujos hipocampos foram analisados;

Em cortes histológicos de hipocampo de indivíduos portadores de Doença de Alzheimer:

- Identificar e quantificar o número de placas senis e emaranhados neurofibrilares através da imunohistoquímica;
- Identificar e quantificar o número de placas senis e emaranhados neurofibrilares através da histologia convencional;
- Comparar o número de placas senis e emaranhados neurofibrilares através dos dois métodos de coloração;
- Relacionar o número médio de placas senis e emaranhados neurofibrilares, observados através da histologia e imunohistoquímica e o perfil do indivíduo.

4. METODOLOGIA

4.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo realizado através do método observacional, analítico transversal.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente trabalho foi apresentado sob o CAAE nº: 44265315.1.0000.52086 ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE (Universidade Federal de Pernambuco), obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) (ANEXO A).

Os dados coletados foram armazenados e as informações foram utilizadas única e exclusivamente para a execução da presente pesquisa e a identidade dos indivíduos será mantida em sigilo absoluto.

4.3 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no laboratório do Programa de Pós Graduação em Patologia (POSPAT) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em conjunto com o Serviço de Verificação de Óbito (SVO) situado na UFPE – Recife-PE.

O SVO é responsável pela execução de necropsias em vítimas de morte natural com ou sem assistência médica, emissão de laudos histopatológicos e

apoio didático às atividades de ensino das disciplinas de Patologia, Anatomia Humana e Anatomia Patológica. É mantido também, por meio de convênio com o Governo do Estado/Secretaria de Saúde.

4.4 POPULAÇÃO ALVO E PERÍODO

O estudo foi composto por amostras teciduais de hipocampo de indivíduos com diagnóstico de Doença de Alzheimer obtidos no período de 2000 até 2014.

4.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Amostras de tecido cerebral (hipocampo) de indivíduos com morte natural e diagnóstico clínico de Doença de Alzheimer;

4.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Amostras de indivíduos que morreram por causas cerebrais primárias: acidente vascular encefálico de origem isquêmica ou hemorrágica, meningite, tumores entre outras lesões cerebrais com dano no hipocampo;
- Amostras de indivíduos com prontuários com dados necessários para a pesquisa incompletos;
- Blocos parafinados com artefatos.

4.7 MÉTODOS DE COLETA E ANÁLISE DO MATERIAL BIOLÓGICO

As amostras de hipocampo, dos hemisférios direito e esquerdo, já parafinadas e todas as informações clínicas e epidemiológicas foram obtidas através dos prontuários arquivados no Serviço de Verificação de Óbitos (SVO-Recife-PE). Após a seleção, as amostras foram utilizadas para avaliação neuropatológica através da histologia convencional e IHQ.

4.7.1. Avaliação Neuropatológica

Para a avaliação neuropatológica, foi realizada técnica de histologia convencional com a utilização de dois métodos: impregnação por prata pelo método de Bielschowsky e coloração hematoxilina eosina (HE), bem como, a realização da imunomarcagem pela imunohistoquímica para proteína TAU (IHQ-TAU). Os emaranhados neurofibrilares e as placas senis foram observados através de um sistema de captura de imagem óptica, Panoramic Viewer SCAN 1.15.2 3DHISTECH®, pelos pesquisadores e discutidos com um neuropatologista experiente.

4.7.2. Imunohistoquímica para proteína TAU (IHQ-TAU)

O método qualitativo da imunohistoquímica para detecção da proteína TAU foi realizada em amostras de hipocampo emblocadas em parafina. Foram realizados cortes em material parafinado de 6µm de espessura, posteriormente incubados com anticorpo para detectar proteína TAU (Anti Tau-Neuronal Marker), Ac policlonal de coelho, fr 1.0ml Spring E18294 1.0ml). As amostras foram levadas para estufa de secagem a 60°C por 20 minutos e depois

temperatura ambiente por 20 minutos, desparafinadas em xilol e reidratadas com etanol (100, 85 e 70%, 30 segundos cada). A recuperação antigênica foi realizada em tampão de citrato, pH 6,0 a 120°C em panela de pressão elétrica por 30 segundos. As lâminas sofreram resfriamento até chegar a temperatura ambiente e a peroxidase endógena foi bloqueada por um período de 10 minutos (solução bloqueadora de proteína do kit DAKO™). Foram incubadas com o anticorpo, lavadas com tampão fosfato (PBS) contendo BSA (Bovine Serum Albumin) durante 20 minutos. Em seguida, incubadas com solução cromógena de diaminobenzidina (DAB), lavadas em água, contra-coradas com hematoxilina, desidratadas e montadas com lamínula e Entellan® (Merk) (figura 7).

Após a reação, para análise da imunoreatividade, as lâminas foram digitalizadas através do scanner pelo SCAN 1.15.2 3DHISTECH® e analisadas pelo sistema de captura de imagem óptica Panoramic Viewer, que permite observar a imunexpressão tecidual das proteínas TAU em diferentes aumentos, 5x, 10x e 20x (Figura 8).

- Imunohistoquímica para Proteína Tau

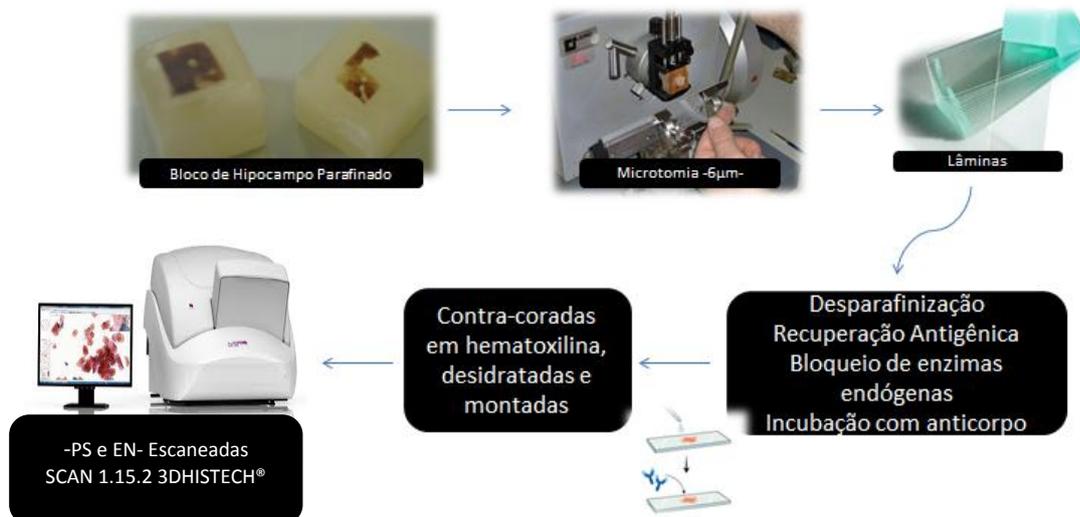


Figura 7- Esquema representativo das etapas realizadas na produção das lâminas na imunohistoquímica. Fonte: arquivo pessoal

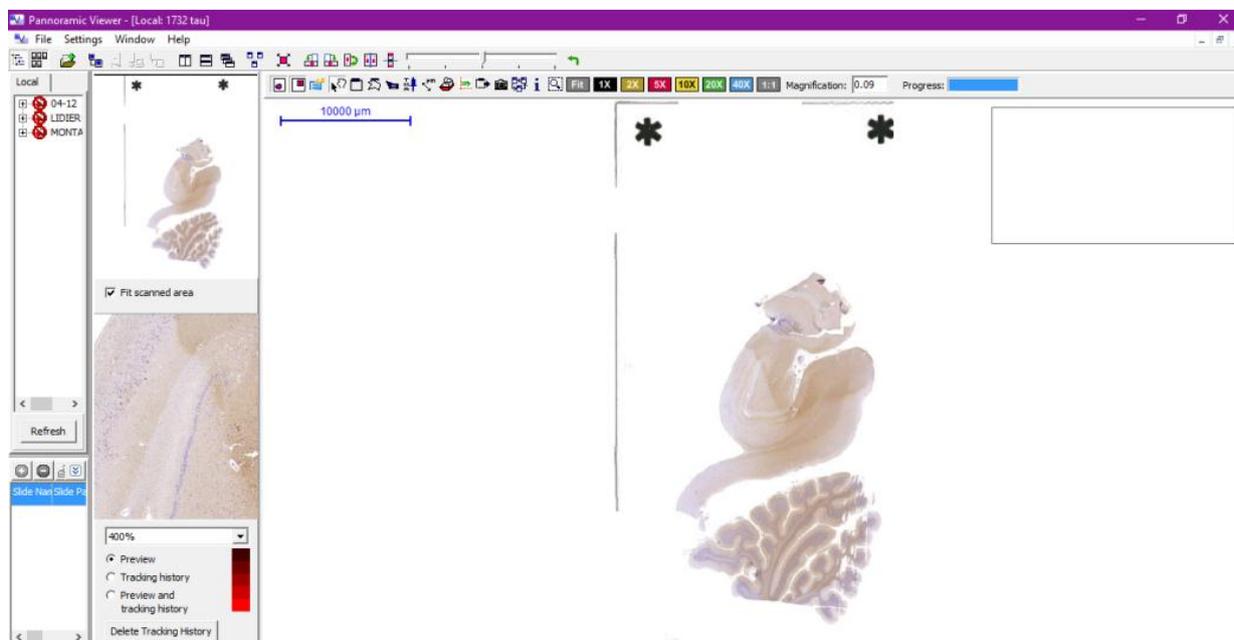


Figura 8- Imagem óptica do SCAN 1.15.2 3DHISTECH® mostrando o hipocampo para observação das áreas de imunoreatividade para proteína TAU. Fonte: Software Panoramic Viewer

4.7.3. Histologia Convencional

A avaliação prosseguiu com os cortes histológicos de hipocampo parafinados para comparação. Após recortes de 6µm de espessura, as lâminas foram levadas para o processo de desidratação, hidratação e coloração através da técnica de prata e HE (figura 9). Em seguida, as placas senis e os

emaranhados neurofibrilares foram visualizados nas lâminas escaneadas pelo SCAN 1.15.2 3DHISTECH® e sistema de captura de imagem óptica Panoramic Viewer. Os resultados obtidos das imagens foram discutidos pelos pesquisadores com um neuropatologista experiente ao relacioná-las com os achados clínicos (figura 10 e 11).

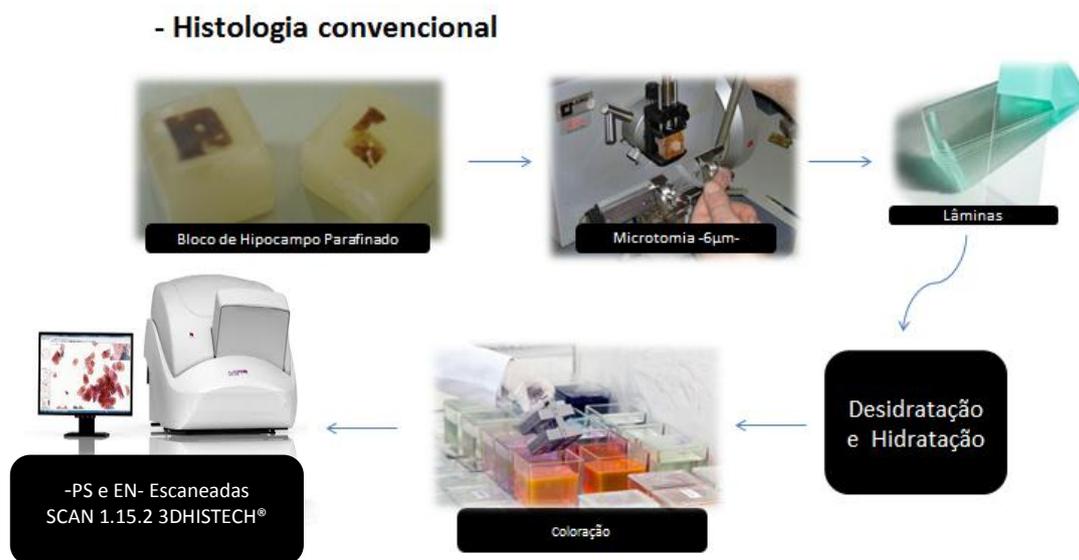


Figura 9- Esquema representativo das etapas realizadas na produção das lâminas na histologia convencional. Fonte: arquivo pessoal

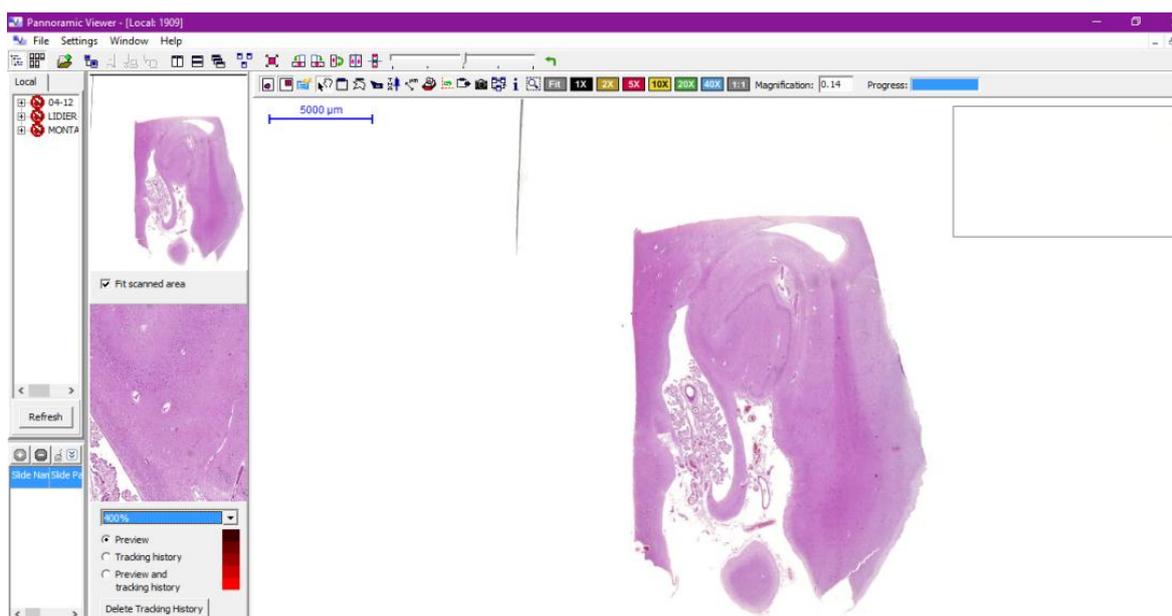


Figura 10- Imagem óptica do SCAN 1.15.2 3DHISTECH® mostrando o hipocampo para observação das áreas de tecido corado com hematoxilina eosina. Fonte: Software Panoramic Viewer

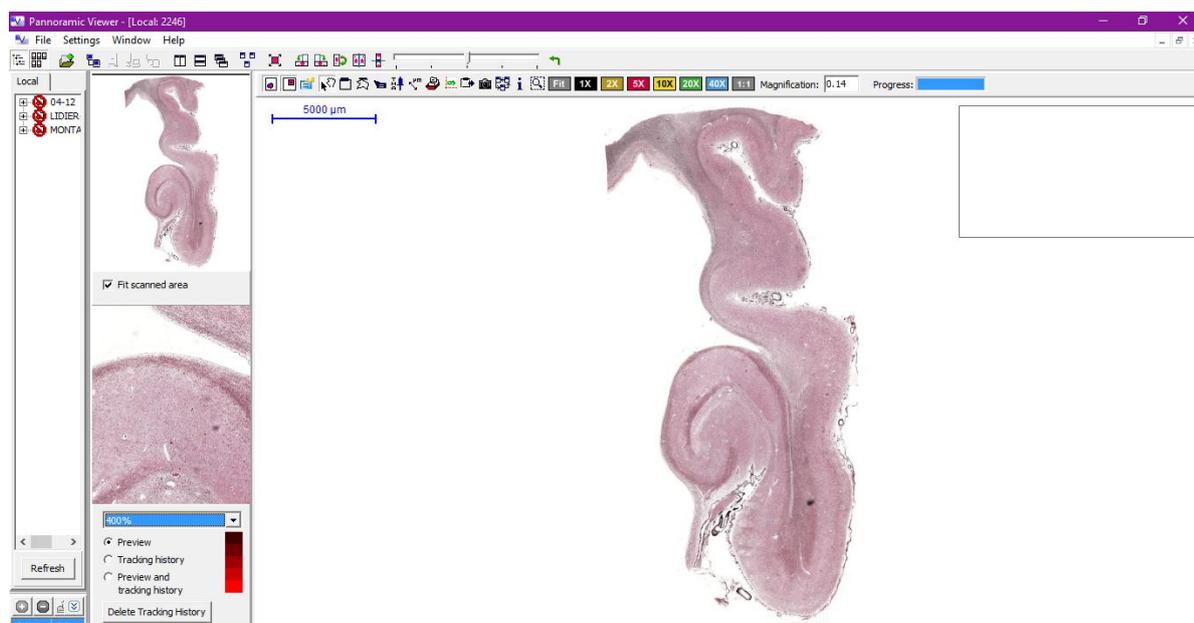


Figura 11- Imagem óptica do SCAN 1.15.2 3DHISTECH® mostrando o hipocampo para observação das áreas de tecido impregnados de prata. Fonte: Software Pannoramic Viewer

4.7.3.1 Coloração por Hematoxilina Eosina (HE)

Secções de tecido nervoso com 6 µm de espessura foram corados com HE pelo método de Harris. Os cortes foram para estufa, em seguida foram desparafinizados, desidratados, hidratados em água corrente, corados, desidratados e montados sob lamínula e Entellan® (Merk) (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

4.7.3.2 Coloração por Impregnação por Prata, método de Bielschowsky

Secções de 6µm montadas sobre lâminas foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em água destilada e coradas pela prata. Os cortes foram oxidados com ácido crômico a 4% por 10 minutos na estufa e após serem retirados da estufa, foram lavados em água corrente por 10 minutos, seguidos da oxiredução no bissulfito de sódio à 1% e lavagem em água destilada por 1 minuto. Na fase seguinte, foi acrescentada a solução de prata A (5ml de borax

+ 25 ml de água destilada) e B (3ml de nitrato de prata à 5% + 25 ml de metanamina à 3%), após a junção das duas substâncias, as mesmas foram submetidas a aquecimento na estufa até sua impregnação. Após saída da estufa foram realizadas 4 passagens em água destiladas para lavagem, matizados com cloreto de ouro à 1%, lavados em 2 passagens em água destilada, colocados em tiosulfato de sódio à 2% por 2 minutos, lavados por 10 minutos na água corrente e finalizando com contra coloração em verde luz à 2% em 45 segundos. O passo final foi desidratar, clarear e montar sob lamínula e Entellan® (Merk) (MIRRA et al., 1993).

4.7.4. Análise microscópica através Pannoramic Viewer SCAN 1.15.2 3DHISTECH®

As análises das PS e EN foram realizadas através do sistema de captura de imagem óptica Pannoramic Viewer SCAN 1.15.2 3DHISTECH® (Figura 12). Este software permite a visualização da imagem de toda lamina. Após a obtenção da imagem nos 3 tipos de coloração, pode ser selecionada 3 diferentes áreas do hipocampo (CA- Corno de Amon): CA1, CA2/3 e CA4. Cada região foi marcada por circunferência com diâmetro de 600 micrometros, posteriormente foi realizada uma varredura de toda circunferência em aumento de 20x em busca das alterações histopatológicas na hemtoxilia-eosina e na coloração por prata e imunoreatividade. Para garantir que a avaliação fosse realizada em uma mesma região do hipocampo nas 3 colorações realizamos cortes sequenciais. (Figura 13)

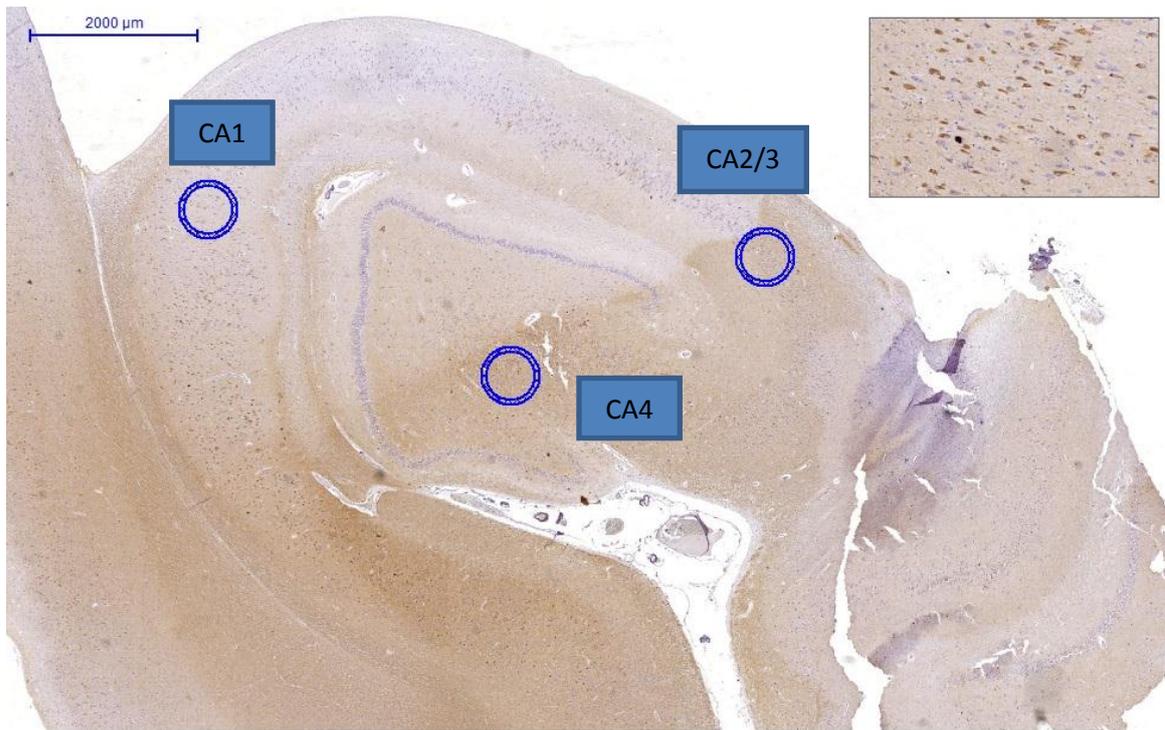


Figura 12- Imagem óptica do SCAN 1.15.2 3DHISTECH® mostrando a seleção da área de imunoreatividade para proteína TAU do hipocampo demarcado em três regiões (CA1, CA2/3 e CA4) através de circunferência de 600 micrometros. Fonte: Software Panoramic Viewer

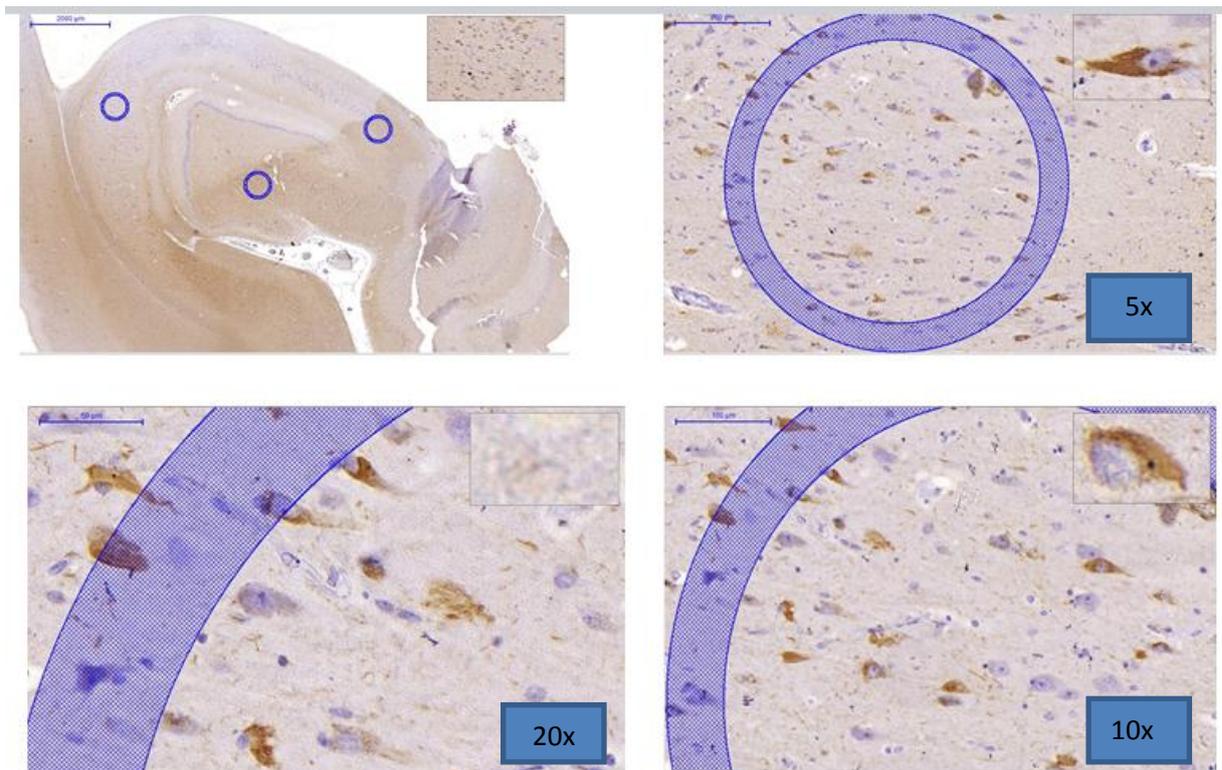


Figura 13- Imagem óptica do SCAN 1.15.2 3DHISTECH® mostrando a seleção da área de imunoreatividade para proteína TAU do hipocampo demarcado em três regiões (CA1, CA2/3 e CA4) através de circunferência de 600 micrometros e região de CA1 em aumento (objetiva) de 5x, 10x e 20x . Fonte: Software Panoramic Viewer

4.8. COLETA DOS DADOS

4.8.1. Instrumento de coleta

Informações coletadas a partir de análise de prontuário (idade, procedência, sexo, história/quadro clínico e diagnóstico necroscópico), assim como os dados da avaliação do tecido hipocampal, foram transcritos para um formulário de coleta de dados padronizado (APÊNDICE 1). Todos os dados serão mantidos em sigilo.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise de dados, utilizou-se o SPSS versão 20, onde, inicialmente, realizou-se uma análise descritiva, obtendo assim as medidas de posição e dispersão para as variáveis numéricas e as frequências absolutas e percentuais para as variáveis qualitativas. Para a confirmação das tendências observadas na análise descritiva, buscou-se o teste mais adequado para testar a significância das diferenças e para esta escolha, procedeu-se antes com os testes de normalidade *Kolmogorov-Smirnov* e *Shapiro-Wilk* para que fosse possível entender qual tipo de teste seria usado, se um teste paramétrico ou não-paramétrico. Para as comparações por área, foi usado o teste não-paramétrico Wilcoxon. Para a comparação de níveis de emaranhados e placas por faixa etária e por sexo, fez-se uso do teste não-paramétrico Mann-Whitney, $p\text{-valor} < 0,05$. O teste Kruskal-Wallis é um teste-não paramétrico, foi usado para a comparação de Emaranhados e Placas entre os diferentes níveis de escolaridade. Para todos os testes, o nível de 5% de significância foi considerado.

5. RESULTADOS - ARTIGO ORIGINAL

AVALIAÇÃO DE PLACAS SENIS E EMARANHADOS NEUROFIBRILARES NO HIPOCAMPO DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE ALZHEIMER ATRAVÉS DA HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA

Lidier Roberta Moraes Nogueira¹, Roberto José Vieira de Mello², Luciano Tavares Montenegro³, Romildo Luciano da Silva⁴, Silvania Tavares Paz⁵ e Manuela Figueiroa Lyra de Freitas⁶

- 1 Fisioterapeuta, Mestranda em Patologia – Universidade Federal de Pernambuco
- 2 Médico Neuropatologista – Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco
- 3 Faarmacêutico - Professor Adjunto da Universidade Federal de Pernambuco
- 4 Biólogo - Universidade Federal Rural de Pernambuco
- 5 Bióloga - Universidade Federal Rural de Pernambuco
- 6 Doutora em Anatomia – Universidade Federal de Pernambuco

Resumo

Com o aumento da expectativa de vida, um grande número de indivíduos pode atingir uma idade crítica para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas causadoras de demências como a Doença de Alzheimer, que é caracterizada por um quadro clínico de declínio progressivo e irreversível de algumas funções cognitivas e intelectuais. As anormalidades histopatológicas observadas no tecido cerebral obtido através de autopsias para o diagnóstico definitivo são: emaranhado neurofibrilares e placas senis encontrados em diversas regiões cerebrais. Nesse intuito, o presente comparou a presença de placas senis e emaranhados neurofibrilares em cortes histológicos de hipocampos de portadores de Doença de Alzheimer com a imunohistoquímica e a histologia convencional, avaliando aspectos clínicos e epidemiológicos. Foram analisados 53 blocos de hipocampo de portadores da Doença de Alzheimer. Destes, apenas 34 seguiram para a produção de laminas e posterior coloração. A idade média foi de 80,03 ($\pm 8,83$), com um

percentual de 76,5% do sexo feminino e 23,5% masculino. A reação imunohistoquímica com a proteína TAU mostrou uma maior capacidade na expressão e visualização das placas e emaranhados no hipocampo (p -valor $<0,05$) quando comparada com a coloração pelo método de prata e hematoxilina-eosina e a área CA1 do hipocampo foi a mais comprometida em diferentes faixas de idade. Sendo assim, este estudo mostra que a imunohistoquímica é mais sensível na identificação de placas senis e emaranhados neurofibrilares. Sugerindo que a histologia convencional pode subestimar o diagnóstico de Doença de Alzheimer.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, Imunohistoquímica, Diagnóstico e Emaranhados Neurofibrilares.

Abstract

With increasing life expectancy of a large number of individuals can reach a critical age for the development of neurodegenerative diseases causing dementia such as Alzheimer's disease, which is characterized by a clinical picture of progressive and irreversible decline of some cognitive and intellectual functions. The histopathological abnormalities in brain tissue obtained at autopsy for definitive diagnosis are neurofibrillary tangle, and senile plaques found in various brain regions. To that end, this compared the presence of senile plaques and neurofibrillary tangles in tissue sections of hippocampi of Alzheimer's Disease patients with immunohistochemistry and conventional histology, evaluating clinical and epidemiological aspects. 53 patients were analyzed hippocampus blocks of Alzheimer's disease. Of these, only 34 followed for the production of plates and subsequent staining. The mean age

was 80.03 (\pm 8.83), with a percentage of 76.5% female and 23.5% male. The immunohistochemical reaction with protein tau showed a greater ability in expression and visualization of plaques and tangles in the hippocampus ($p < 0.05$) compared with silver staining method, and hematoxylin-eosin and CA1 area of the hippocampus was the most affected in different age groups. Thus, this study shows that immunohistochemistry is more sensitive in the identification of senile plaques and neurofibrillary tangles. Suggesting that conventional histology may underestimate the diagnosis of Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer Disease, Immunohistochemistry, Diagnosis e Neurofibrillary Tangles.

Introdução

Atualmente, um grande número de indivíduos pode atingir uma idade crítica para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas causadoras de demências (GOMES *et al.*, 2013;PUZZO *et al.*, 2014). Seu principal fator de risco é a idade, que tende a aumentar sua prevalência, como observado na Doença de Alzheimer (DA), que é a principal causa da síndrome demencial adquirida com a senilidade (CAÇÃO *et al.*, 2007; JIMÉNEZ e VARGAS, 2007; VALENTE *et al.*, 2010;HYMAN *et al.*, 2012).

Em todo mundo, cerca de 35,6 milhões de pessoas vivem com demência. (OMS, 2012). Dentre todas as demências a DA corresponde a 60-70% dos casos (BURLÁ *et al.*, 2013). Segundo a Associação Brasileira de Alzheimer (ABRAZ), no Brasil, estima-se que existam cerca de 1,2 milhões de pessoas acometidas por essa demência (ABRAZ, 2014).

A DA é definida como uma doença degenerativa progressiva cerebral primária, de etiologia desconhecida, com características neuropatológicas e neuroquímicas próprias. Doença típica do idoso, sua prevalência é de 5% aos 65 anos e dobra a cada cinco anos, chegando a 30% dos idosos com mais de 85 anos (APRAHAMIAN *et al.*, 2009; BALLARD, 2011). A taxa de incidência de demência aumenta exponencialmente com a idade, com o aumento mais pronunciado ocorrendo ao longo da sétima e oitava década de vida (SELFRRIDGE *et al.*, 2013; REITZ e MAYEUX, 2014).

Sua manifestação clínica é caracterizada por um declínio progressivo e irreversível de algumas funções cognitivas e intelectuais, como por exemplo, memória (evento de maior magnitude), orientação no tempo e no espaço, pensamentos abstratos, aprendizagem, incapacidade de fazer cálculos simples, distúrbios de linguagem, comunicação e na incapacidade de realizar atividades de vida diária (KARRAN *et al.*, 2011; AHMED *et al.*, 2013).

As anormalidades histopatológicas observadas no tecido cerebral obtido através de autopsias ou necropsias são: emaranhado neurofibrilar (EN) intracelular (proteína TAU em sua forma anormal associada à microtúbulos) e as placas senis (PS) extracelulares difusas (depósitos ricos em proteína beta-amilóide- A β) encontrados em regiões cerebrais responsáveis pela cognição, incluindo o córtex cerebral, hipocampo e o estriado ventral. Essas lesões são acompanhadas de microgliose reativa, perda neuronal, perda de massa branca com atrofia cerebral difusa e conseqüente redução de sinapses (SERRANO-POZO *et al.*, 2011; VANDENBERGHE *et al.*, 2013). As referidas estruturas não são específicas da DA, pois podem ser encontradas em casos onde o idoso não apresenta demência. Com esta formação, o cérebro do idoso apresenta-se

com redução de sua capacidade de realizar sinapses (BYRNE *et al.*, 2009). Dados das formas familiares da DA sugeriram, no entanto, que a A β é uma molécula crítica na patogênese desta demência. Estando relacionada com a neurodegeneração e com outras características da DA, como a hiperfosforilação da proteína TAU e os emaranhados por aumentar a atividades de algumas enzimas envolvidas. (HARTMANN *et al.*, 2004; KARRAN *et al.*, 2011) A causa dessa modificação na TAU ainda é desconhecida e sua evolução é crucial no desenvolvimento dessa demência e determinação da gravidade clínica (KARRAN *et al.*, 2011; HYMAN *et al.*, 2012; TAKEDA *et al.*, 2013).

Estudos *post mortem* têm revelado que as áreas cerebrais mais atingidas por estas alterações na DA são o córtex de associação e o hipocampo, com relativa preservação do cerebelo, córtex primário motor, auditivo, sensitivo e visual. E evidencia o compromisso precoce da memória recente (hipocampo) e a conservação, pelo menos nas fases iniciais, da marcha e das capacidades motoras visuais (ANDRADE-MORAES *et al.*, 2013; MICHAEL *et al.*, 2014).

Um diagnóstico definitivo só pode ser realizado através de exame anatomopatológico. No entanto, é possível fazer uma avaliação clínica e estabelecer um diagnóstico possível ou provável, através de história médica do paciente e de sua família, do exame neurológico, de testes neuropsicológicos, exame físico, avaliação psiquiátrica, exames laboratoriais e exames de imagem como a tomografia computadorizada e ressonância magnética (HARTMANN *et al.*, 2004; JIMÉNEZ e VARGAS, 2007; APRAHAMIAN *et al.*, 2009; KARRAN *et al.*, 2011). Os marcadores moleculares da doença têm sido pesquisados em fluídos e tecidos biológicos, particularmente a detecção de peptídeo A β e suas

frações e da proteína TAU hiperfosforilada por métodos que variam de imunohistoquímica (IHQ) a espectrometria de massa. (CARAMELLI *et al.*, 2011).

Por muitos anos, as placas amilóides foram consideradas o achado fisiopatológico decisivo para a caracterização e desenvolvimento da doença. No entanto, vários estudos nas últimas décadas relataram que tais placas possuem fraca correlação com o declínio cognitivo (KARRAN *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2013). Os emaranhados neurofibrilares é o primeiro evento fisiopatológico e seu número se correlaciona melhor com o grau de demência do que o número de PS. E, embora não avaliada por métodos histológicos, a melhor correlação com a severidade da demência parece ser com a perda das sinapses (HARTMANN *et al.*, 2004; VERDILE *et al.*, 2004; ANDRADE-MORAES *et al.*, 2013).

Sabendo-se da importância de um bom método de coloração, no que diz respeito ao custo/benefício e que, apesar de muitos estudos terem avançado sobre o conhecimento da patologia da DA e do seu diagnóstico, muitos aspectos ainda não estão totalmente esclarecidos, principalmente os relacionados ao diagnóstico histológico. Para tanto, o presente estudo analisou a presença de placas senis e emaranhados neurofibrilares em cortes histológicos de hipocampus de portadores de Doença de Alzheimer através de imunohistoquímica e histologia convencional (hematoxilina eosina e impregnação por prata) buscando comparação das técnicas na detecção destas anormalidades neuroanatomopatológicas.

Material e Métodos

Trata-se de um estudo realizado através do método observacional, analítico transversal, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) sob o CAAE de número 44265315.1.0000.52086.

Foram estudados, no período de 2015-2016, 34 cortes histológicos de hipocampos de indivíduos portadores da Doença de Alzheimer, entre 59 e 92 anos de idade. Todos os cortes de hipocampos parafinados, sem artefatos após morte natural, foram armazenados de 2000 a 2014 pelo Prof^o Dr. Roberto José Vieira de Melo, do Departamento de Patologia da UFPE, após necropsia realizada no Serviço de Verificação de Óbito do Recife-PE.

As amostras de hipocampo, dos hemisférios direito e esquerdo, já parafinadas, e todas as informações clínicas e epidemiológicas arquivados no SVO-Recife-PE, tiveram sua avaliação neuropatológica através da histologia convencional pela hematoxilina eosina (HE) e impregnação por prata método de Bielschowsky e análise de imunoreatividade com a imunohistoquímica para proteína TAU (IHQ-TAU). Os emaranhados neurofibrilares e as placas senis foram observados e analisados através de um sistema de captura de imagem óptica Panoramic Viewer SCAN 1.15.2 3DHISTECH®, pelos pesquisadores e discutidos com um neuropatologista experiente. Após a obtenção da imagem nos 3 tipos de coloração, pode ser selecionada 3 diferentes áreas do hipocampo: CA1, CA2/3 e CA4. Cada região foi marcada por circunferência com diâmetro de 600 micrometros, posteriormente foi realizada uma varredura de toda circunferência em aumento de 20x em busca das alterações histopatológicas. Para garantir que a avaliação fosse realizada em uma mesma região do hipocampo nas 3 colorações realizamos cortes sequenciais.

Informações coletadas a partir de análise de prontuário, assim como os dados da avaliação do tecido hipocampal, foram transcritos para um formulário de coleta de dados padronizado. Para a análise de dados utilizou-se o SPSS versão 20, onde inicialmente, realizou-se uma análise descritiva, obtendo assim, as medidas de posição e dispersão para as variáveis numéricas e as frequências absolutas e percentuais para as variáveis qualitativas. Para a confirmação das tendências observadas na análise descritiva, buscou-se o teste mais adequado para testar a significância das diferenças e para esta escolha, procedeu-se antes com os testes de normalidade *Kolmogorov-Smirnov* e *Shapiro-Wilk* para que fosse possível entender qual tipo de teste seria usado, se um teste paramétrico ou não-paramétrico. Para as comparações por área, foi usado o teste não-paramétrico Wilcoxon. Para a comparação de níveis de emaranhados e placas por faixa etária e por sexo, fez-se uso do teste não-paramétrico Mann-Whitney, $p\text{-valor} < 0,05$. O teste Kruskal-Wallis é um teste-não paramétrico e foi usado para a comparação de Emaranhados e Placas entre os diferentes níveis de escolaridade. Para todos os testes, o nível de 5% de significância foi considerado.

Resultados

No presente estudo, foram analisados 53 blocos de hipocampo parafinados de indivíduos com diagnóstico clínico de Doença de Alzheimer, dos quais 19 foram excluídos por apresentar artefatos, tornando impossível a produção de lâminas ou por não conter todas as informações necessárias em prontuários, restando 34 amostras com diagnóstico clínico de DA.

A idade dos indivíduos variou de 59 a 92 anos ($80,03 \pm 8,83$), sendo 26/34 (76,5%) do sexo feminino e 23,5% masculino. A raça predominante foi

branca com 47,1%. O grau de escolaridade foi de 4 a 7 anos de estudo em 41,2% da amostra. Ao se utilizar os critérios de CERAD realizados no momento da necropsia e registrados nos prontuários, pelo menos 41,2% dos indivíduos cujos hipocampos foram avaliados, tinham diagnóstico definido da DA. Uma síntese destas informações relacionada aos aspectos tanto clínicos, quanto epidemiológicos, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1- Perfil clínico-epidemiológico traçado a partir de prontuários dos indivíduos portadores de Doença de Alzheimer, cujos hipocampos emblocados em parafina, pertencem ao acervo do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da UFPE (Profº José Roberto Vieira de Melo).

VARIÁVEIS CATEGÓRICAS	NÚMERO	FREQUENCIA %
FAIXA ETÁRIA		
< 75	11	32,4
76 a 85	10	29,4
86 ou mais	13	38,2
SEXO		
Feminino	26	76,5
Masculino	08	23,5
ESCOLARIDADE (anos)		
NENHUM	05	14,7
1 a 3 anos	10	29,4
4 a 7 anos	14	41,2
8 a 11 anos	02	5,9
12 a +	03	8,8
DA-CERAD		
DEFINIDO	14	41,2
POSSÍVEL	05	14,7
PROVÁVEL	05	14,7
Não Obtido	10	29,4

Legenda: DA-Doença de Alzheimer; CERAD- *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*.

As principais comorbidades registradas foram: doenças cardiovasculares, presentes em 18/34 (52,9%) dos indivíduos; doenças infecciosas em 6/34 (17,6%); diabetes mellitus (DM) 9/34 (26,5%); hipertensão arterial sistêmica (HAS) 10/34 (29,4%); acidente vascular encefálico prévio 1/34 (2,9%) e pneumopatias 5/34 (14,7%). Com relação à causa da morte diagnosticada após necropsia, os indivíduos apresentaram comprometimentos associados a doenças pulmonares (50%) e a doenças cardiovasculares

(23,5%). Nesta mesma análise, apenas em 5/34 (14,7%) foi observado macroscopicamente algum grau de atrofia cerebral.

Em uma análise inicial, objetivando verificar qual método histológico seria capaz de visualizar um maior número de alterações microscópicas nos hipocampos (EN-emaranhados neurofibrilares e PS-placas senis), foi realizada uma comparação entre os valores de PS e EN nos 34 hipocampos, com dois métodos de coloração histológica (HE-Hematoxilina Eosina e prata) e IHQ para proteína TAU (IHQ-TAU). Para os EN, foi observado um maior valor na média de contagem na IHQ-TAU ($23,68 \pm 16,21$), seguido da coloração por HE ($14,0 \pm 7,95$) e coloração pelo método de prata ($13,14 \pm 9,53$). Percebe-se, então, que a IHQ-TAU, foi mais eficaz (figura 1).

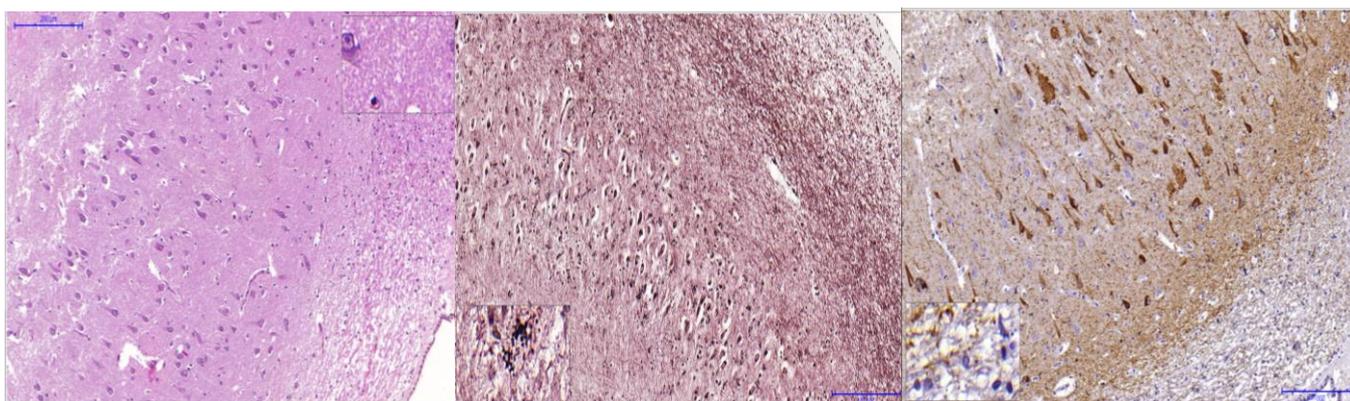


Figura 1: Cortes histológicos de uma mesma área do hipocampo do mesmo indivíduo portador da Doença de Alzheimer em histologia convencional pela hematoxilina eosina (HE), impregnação por prata método de Bielschowsky e imunomarcado com a imunohistoquímica para proteína TAU (IHQ-TAU), respectivamente.

Na comparação através do teste de Wilcoxon, foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre número total de EN encontrados na IHQ-TAU e a coloração pelo método de prata (p -valor 0,00) e diferença entre IHQ-TAU e coloração por HE (p -valor 0,00). Ao comparar a coloração pelo método de prata com HE, não foi observada diferença estatisticamente significativa (p -valor 0,524), mostrando que a IHQ-TAU é o melhor método para visualizar os emaranhados neurofibrilares.

A mesma comparação entre os três métodos foi realizada com o número total de PS observadas. A maior contagem foi constatada na IHQ-TAU ($2,41 \pm 3,24$) seguida da prata ($0,66 \pm 1,16$) e HE ($0,17 \pm 0,52$), havendo diferença significativa entre os três grupos e sendo a IHQ-TAU novamente, mais eficaz para visualizar a anormalidade histológica da doença. Ao se comparar o número total de PS encontrados na IHQ-TAU e coloração por HE, houve diferença estatística (p-valor 0,00), assim como para IHQ-TAU e prata (p-valor 0,00), não havendo diferença entre prata e HE (p-valor 0,41).

Na avaliação da IHQ-TAU, considerando-se três áreas do hipocampo (CA1, CA2/3 e CA4) separadamente, e as contagens para EN e PS, constatou-se que a média de EN visualizados foi maior na área CA1 ($12,5 \pm 9,57$). CA1 mostrou ter uma maior quantidade significativa de PS e EN quando comparado com CA2/3 (p-valor 0,01) e CA4 (p-valor 0,00). O número encontrado em CA2/3 também foi maior estatisticamente que CA4 (p-valor 0,010) (tabela 2).

Tabela 2- Comparativo das áreas por média, desvio padrão e p-valor do teste Wilcoxon para Emaranhados e Placas encontrados no hipocampo dos indivíduos portadores de Doença de Alzheimer.

	Área			p-valor (Wilcoxon)		
	CA1 (1)	CA2/CA3 (2)	CA4 (3)	(1) x (2)	(1) x (3)	(2) x (3)
Emaranhados	$12,5 \pm 9,573$	$7,41 \pm 7,114$	$3,76 \pm 3,585$	0,001	0,000	0,010
Placas	$1,21 \pm 1,754$	$0,53 \pm 1,354$	$0,68 \pm 1,342$	0,054	0,137	0,197

Com relação à contagem das PS nas três áreas do hipocampo, a área CA1 apresentou maior média de contagem ($1,21 \pm 1,75$). Contudo, apesar de haver uma tendência para uma diferença significativa com maior valor contados de PS em CA1 na sua comparação com CA2/3 (p-valor 0,54), nenhuma área comparada par-a-par mostrou ser estatisticamente significativa (tabela 2).

Realizou-se uma divisão dos indivíduos por faixa etária, agrupando em < 75 anos, entre 76 e 85 anos e 86 anos ou mais, onde pode-se, após a divisão, avaliar a proporção de EN e PS por área do hipocampo nos diferentes grupos etários através da IHQ-TAU. A faixa etária com maior percentual no estudo foi a dos indivíduos com 86 anos ou mais (38,2%) (tabela 01).

A tabela 3 mostra a análise descritiva da quantidade de EN por área do hipocampo nas três faixas etárias através da IHQ-TAU, verificando-se que a maior quantidade de EN foi encontrada na região CA1, nas três faixas e que houve um crescimento linear do valor da média com o aumento da idade [< 75 anos ($9,64 \pm 9,82$), 76 a 85 ($13,50 \pm 8,396$) e 86 anos a mais ($14,5 \pm 10,36$)], o mesmo não ocorre em CA2/3 e em CA4 em nenhuma das idades. A faixa etária com maior média total de EN é entre 76-85 anos.

Tabela 3- Análise descritiva do total de placas senis por área do hipocampo dos indivíduos portadores de Doença de Alzheimer.

Faixa etária		TAU-EMARANHADOS NEUROFIBRILARES		
		CA1	CA2/3	CA4
< 75	N	11	11	11
	Média	9,64	4,00	1,82
	DP	9,821	6,099	2,442
76 a 85	N	10	10	10
	Média	13,50	11,00	5,30
	DP	8,396	7,087	4,057
86 ou mais	N	13	13	13
	Média	14,15	7,54	4,23
	DP	10,367	7,007	3,516

Com o propósito de avaliar se a quantidade de emaranhados é proporcionalmente diferente com significância estatística, nos três grupos etários por área, foi feita uma comparação das áreas do hipocampo par-a-par em cada grupo através da IHQ- com TAU. Em indivíduos com menos de 75

anos, a quantidade de emaranhados em CA1 foi significativamente maior que nas outras duas áreas do hipocampo. O mesmo ocorreu em indivíduos com mais de 86 anos. Já na faixa de 76 a 85 anos, o número foi estatisticamente significativo maior em CA1 ao comparar com CA4, porém, não foi ao comparar com CA2/3, que por sua vez demonstrou ter maior quantidade significativa ao ser comparada com CA4 (tabela 4).

Tabela 4- Análise estatística, utilizando o Teste de Wilcoxon comparando as três áreas do hipocampo na expressão de emaranhados neurofibrilares nas diferentes faixas etárias, dos indivíduos portadores de Doença de Alzheimer.

Faixa etária		TAU_EN_CA2/ CA3 - TAU_EN_CA1	TAU_EN_CA4 - TAU_EN_CA1	TAU_EN_CA4 - TAU_EN_CA2/ CA3
< 75	p-valor	0,017	0,012	0,337
76 a 85	p-valor	0,262	0,012	0,028
86 ou mais	p-valor	0,030	0,017	0,307

Na comparação com PS por faixa etária, não houve diferença significativa em nenhuma área do hipocampo. Em indivíduos com menos de 75 anos não houve diferença entre IHQ-TAU para PS em CA1 e CA2/3 (p-valor 0,17), CA4 e CA1 (p-valor 0,50) e CA4 e CA2/3 (p-valor 0,063). Na faixa entre 76 e 85 anos, também não houve diferença entre CA1 e CA2/3 (p-valor 0,34), CA4 e CA1 (p-valor 0,20) e CA4 e CA2/3 (p-valor 0,59). E com 86 anos, ou mais, os seguintes valores foram obtidos na IHQ-TAU para PS em CA1 e CA2/3 (p-valor 0,25), CA4 e CA1 (p-valor 0,89) e CA4 e CA2/3 (p-valor 0,27).

Dentro de cada faixa etária e de cada área do hipocampo, foi comparada a quantidade de emaranhados e placas. Para todas as faixas, a expressão dos

EN através da IHQ-TAU foi maior que a das placas senis em todas as áreas, provavelmente, porque a coloração não é específica para marcar os compostos beta-amilóide das PS (tabela 5).

Tabela 5- Análise descritiva do total de placas senis e emaranhados neurofibrilares por área do hipocampo dos indivíduos portadores de Doença de Alzheimer nas três faixas etárias.

Faixa etária		TAU_EN_CA1	TAU_PS_CA1	TAU_EN_CA2/CA3	TAU_PS_CA2/CA3	TAU_EN_CA4	TAU_PS_CA4
	N	11	11	11	11	11	11
< 75	Média	9,64	1,73	4,00	0,73	1,82	1,27
	DP	9,821	2,149	6,099	1,348	2,442	1,902
76 a 85	N	10	10	10	10	10	10
	Média	13,50	1,70	11,00	0,90	5,30	0,50
	DP	8,396	1,889	7,087	2,025	4,057	1,080
86 a mais	N	13	13	13	13	13	13
	Média	14,15	0,38	7,54	0,08	4,23	0,31
	DP	10,367	,870	7,007	,277	3,516	,751

Mesmo a IHQ-TAU não sendo específico para beta-amilóide, estas puderam ser observadas nas PS. Desta forma, tentou-se correlacionar uma proporção entre placas e emaranhados (PS/EN) nas diferentes regiões do hipocampo e nos indivíduos distribuídos nas três faixas etárias. Na análise estatística, houve diferença significativa ao comparar valor de PS/EN em CA1 em todas as faixas (p -valor $>0,05$), ou seja, em CA1 os emaranhados têm sempre em maior quantidade independente da idade. Porém, a diferença entre PS/EN em CA2/3 só foi significativa nas faixas de 76 a 85 anos e 86 a mais, da mesma forma comportou-se em CA4 (tabela 6).

Tabela 6- Análise estatística, utilizando o Teste de Wilcoxon comparando as três áreas do hipocampo na expressão de placas senis e emaranhados nas diferentes faixas etárias, dos indivíduos portadores de Doença de Alzheimer.

Faixa etária		TAU_PS_CA1 - TAU_EN_CA1	TAU_PS_CA2/C A3 - TAU_EN_CA2/C A3	TAU_PS_CA4 - TAU_EN_CA4
< 75	p-valor	0,013	0,058	0,500
76-85	p-valor	0,007	0,008	0,008
>86	p-valor	0,001	0,002	0,005

Em um novo cálculo, o somatório de placas e emaranhados nas três áreas do hipocampo foi comparado por faixa etária através da IHQ-TAU. O número total de EN nas três áreas foi maior na faixa de 76-85 anos (29,80±16,66), seguida da faixa de 86 ou mais (25,92±15,17) e < 75 anos (15,45±16,70).

Na comparação par-a-par de faixa etária para valor total de EN através da IHQ-TAU, não houve diferença significativa entre < 75 versus 76 a 85 anos (p-valor 0,43), com maior quantidade entre 76 a 85 anos. O mesmo não foi observado na comparação na faixa < 75 anos versus 86 ou mais (p-valor 0,134) e 76 a 85 anos versus 86 a mais (p-valor 0,483).

Na comparação da média total de PS nas três áreas através da IHQ-TAU, foi observado um decréscimo da quantidade de placas nas três faixas etárias (<75anos-3,73±4,31; 76 a 85 anos- 3,10±3,17; 86 anos a mais- 0,77±1,01) e na comparação estatística par-a-par de faixa etária para placas, não houve diferença significativa em nenhuma idade (tabela 7).

Tabela 7- Média, desvio padrão e p-valor do teste U de Mann-whitney, comparação do número de emaranhados neurofibrilares (EN) e placas senis (PS), entre faixas etárias através da IHQ-TAU.

	Faixa Etária			p-valor (Mann-Whitney)		
	< 75 (1)	76 a 85 (2)	86 ou mais (3)	(1) x (2)	(1) x (3)	(2) x (3)
Emaranhados	15,45 ± 16,7	29,80 ± 14,7	25,92 ± 15,2	0,043	0,134	0,483
Placas	3,73 ± 4,32	3,10 ± 3,18	0,77 ± 1,01	0,973	0,277	0,067

A figura abaixo resume o comportamento do somatório, nas três áreas do hipocampo, de PS e EN nas três faixas através da IHQ-TAU.

Ao avaliar se há diferença significativa entre o número total do somatório de PS e EN das três áreas do hipocampo, através da IHQ-TAU, entre os indivíduos do sexo masculino e sexo feminino, não foram encontradas diferenças significativas entre os sexos para placas (p-valor 0,270) e nem para emaranhados (p-valor 0,921) (tabela 8).

Tabela 8 - Média, desvio padrão e p-valor do teste U de Mann-whitney, comparação do número de emaranhados e placas, por gênero, coloração TAU.

Emaranhados			Placas		
Masculino	Feminino	p-valor	Masculino	Feminino	p-valor
22,75 ± 15,56	23,96 ± 16,7	0,921	1,25 ± 2,12	2,77 ± 3,48	0,27

Foi também analisado, dentro de cada sexo, como se comportaram a expressão de emaranhados e placas por área através da IHQ-TAU. Quanto ao sexo feminino, a expressão de EN foi maior em CA1 (12,73 ±10,09), seguida de CA2/3 (7,31± 7,07) e CA4 (3,92±3,73). Essa diferença entre valores para EN teve sua significância comprovada através da comparação par-a-par pelo teste de Wilcoxon. Onde CA1 tem uma quantidade superior às outras duas áreas (p-valor< 0,05), assim como CA2/3 sobre CA4 (p-valor 0,49). O mesmo não ocorreu na comparação de valores de PS por área no sexo feminino. A média observada em CA1 foi de 1,27±1,66, em CA2/3 foi de 0,69±1,51 e em

CA4 $0,81 \pm 1,47$. Essas diferenças não foram estatisticamente significantes (p-valor $>0,05$) (tabela 9).

Tabela 9- Análise estatística, utilizando o Teste de Wilcoxon comparando as três áreas do hipocampo na expressão de placas senis no sexo masculino e feminino dos indivíduos portadores de Doença de Alzheimer utilizando a IHQ-TAU.

		Área			p-valor (Wilcoxon)		
		CA1 (1)	CA2/CA3 (2)	CA4 (3)	(1) x (2)	(1) x (3)	(2) x (3)
Emaranhado	Feminino	12,73 ± 10,09	7,31 ± 7,07 7,75 ±	3,92 ± 3,73	0,001	0,000	0,049
	Masculino	11,75 ± 8,225	7,741	3,92 ± 3,73	0,234	0,018	0,107
Placas	Feminino	1,27 ± 1,663	0,69 ± 1,517	0,81 ± 1,470	0,136	0,218	0,308
	Masculino	1,00 ± 2,138	0,00 ± 0,000	0,25 ± 0,707	0,18	0,414	0,317

Na análise dentro do sexo masculino, a média de EN em CA1 foi de $11,75 \pm 8,22$, CA2/3 de $7,75 \pm 7,74$ e CA4 $3,25 \pm 3,24$. Essa expressão de emaranhados por área só foi significativa na comparação entre CA1 e CA4 (p-valor 0,018). Já no número de placas por área através da IHQ-TAU nos homens, não foram observadas diferenças significativas (p-valor $>0,05$) (tabela 9).

Também foram comparados os graus de escolaridade (anos) pela expressão de PS e EN somados nas três áreas do hipocampo através da IQH-TAU. Tanto as placas (p-valor 0,681), quanto os emaranhados (p-valor 0,690), não tiveram diferenças quanto à quantidade expressa nos hipocampus estudados dos cinco grupos de indivíduos divididos por grau escolaridade (tabela 10).

Tabela 10- Análise estatística, utilizando o Teste de Kruskal-Wallis comparando os graus de escolaridade na expressão de placas senis e emaranhados nos indivíduos portadores de Doença de Alzheimer utilizando a IHQ-TAU.

Escolaridade (anos)	Emaranhados		Placas	
	Média ± SD	p-valor	Média ± SD	p-valor
Nenhuma	13,6 ± 8,82		1,8 ± 2,490	
1 a 3 anos	27,1 ± 15,954		1,0 ± 0,943	
4 a 7 anos	25,93 ± 15,479	0,690	3,86 ± 4,055	0,691
8 a 11 anos	22,5 ± 28,991		0,5 ± 0,707	
12 a ±	19,33 ± 26,083		2,67+ 4,619	

Discussão

Desde 1907, quando foi descrita por Alois Alzheimer, a comunidade científica vem estudando a doença e tentando achar meios de diagnóstico precoce, bem como tratamento, já que haverá proporções epidêmicas desta condição consequente ao envelhecimento populacional (VERDILE, 2004). Os meios atuais de diagnóstico definitivo dão-se por necropsia cerebral e busca das extensas lesões, todas vistas principalmente em áreas corticais e formação hipocampal, resultando na perda progressiva das funções cognitivas (SELKOE e HARDY, 2002).

A partir desse conhecimento e da premissa que os avanços para melhor compreensão da DA envolve um método de coloração eficaz para reduzir o subdiagnóstico, o presente estudo buscou o melhor método de coloração para identificar as alterações no tecido cerebral de hipocampo e oferecer uma importante contribuição ao meio científico.

Inicialmente, as amostras foram submetidas à comparação entre diferentes métodos de coloração, buscando visualizar um maior número de EN e PS nos 34 hipocampus analisados. A expressão de EN pela IHQ-TAU foi estatisticamente significante maior do que a coloração por HE e prata. Entre HE e prata não foi observada diferença, reforçando que a IHQ-TAU é o melhor método para visualizar os emaranhados neurofibrilares. Na visualização de PS a IHQ-TAU foi também mais eficaz entre as três técnicas e a prata foi melhor que HE.

Para a análise das lesões da DA, a recomendação de coloração inclui o uso de HE, prata modificada de Bielschowsky e IHQ, tanto a pesquisa de placas, quanto de emaranhados (MIRRA *et al.*, 1991). Fernandez e Coutinho (1997) ao compararem a média do número de PS utilizando IHQ para beta-amiloide, prata e HE, observaram que a IHQ foi melhor que a prata, pois com esta última coloração não foi possível detectar as placas mesmo nos locais onde se sabia existir, sendo considerada uma técnica de baixa sensibilidade para a pesquisa desta alteração histológica. Como observado no presente estudo, apesar da IHQ-TAU não ser específica para PS, estas puderam ser observadas na IHQ-TAU em maior número que as demais técnicas. Corroborando com nossos achados, mesmo assim, diferente do estudo citado acima, a HE possibilitou a visualização de PS, porém, não melhor que a prata.

Com esse resultado e sabendo-se que para o diagnóstico da doença é necessário um valor mínimo de PS por idade e que a depender da técnica esse pode não ser alcançado, a técnica de prata e HE poderia subdiagnosticar a doença e a IHQ seria mais eficaz na busca desse peptídeo até em estágio de comprometimento cognitivo leve. Alguns estudos relatam que a redução

volumétrica cerebral por morte neuronal se deve ao aparecimento de emaranhados e conseqüentemente lesão, como no hipocampo, córtex entorrinal e cíngulo posterior são sinais precoces da DA e que posteriormente evoluiriam para DA com lesão do neocórtex frontal, parietal e temporal (CARAMELLI *et al.*, 2011; ANDRADE-MORAES *et al.*, 2013).

Outro importante aspecto observado na presente pesquisa foi o fato de que, na avaliação, utilizando-se apenas IHQ-TAU e considerando-se três áreas do hipocampo separadamente (CA1, CA2/3 e CA4), a contagem para EN e PS, foi maior em CA1, comparado com CA2/3 e CA4, e a quantidade em CA2/3 também foi maior que CA4. Com relação à contagem das PS, CA1 apresentou maior média, apesar de não haver significância estatística quando comparada as outras áreas.

A progressão de emaranhados neurofibrilares é bastante estereotipada e previsível, iniciando no córtex entorrinal e hipocampo e se espalha para o isocórtex associativo, poupando o sensorial, o motor e áreas visuais (ARNOLD *et al.*, 1991; BRAAK e BRAAK, 1991; BRAAK *et al.*, 2006). A área CA1 é relatada como a primeira área do hipocampo a ser afetada, tanto em dementes como não dementes, e ainda, alguns autores apontam que esta região é seletivamente vulnerável a prejuízos como hipóxia e isquemia (ARNOLD *et al.*, 1991; MARKESBERY, 1997; SERRANO-POZZO, 2011).

Da a mesma forma que foi observada no presente estudo, Braak e Braak (1991) em estudo clínico-patológico, através das técnicas de prata e IHQ, com cérebro humano, observou e distinguiu etapas controladas da progressão da lesão neuronal por EN. Os primeiros a aparecerem no hipocampo, na fase intermediária da DA, são observados em CA1, posteriormente em CA2 e com o

avançar da doença todas as outras áreas estão envolvidas. Esta progressão tem uma considerável variação interindividual, pois, a literatura também relata que CA2 resiste ao desenvolvimento de mudanças, mas existem casos com envolvimento precoce e grave de CA2 com emaranhados mais grosseiros, facilmente diferenciados dos vistos em CA1 e CA3 (BRAAK e BRAAK, 1991).

Com relação as PS, ao contrário dos EN, o acúmulo é visto principalmente no isocórtex e com uma deposição muito menos previsível. Aparecem mais tardiamente na formação do hipocampo (ARNOLD *et al.*, 1991; BRAAK e BRAAK, 1991). Apesar dessa variação na evolução das PS Braak e Braak distinguiu a progressão em três fases: Fase A, placas em porções basais do frontal, lobos temporal e occipital; Fase B, com todas as áreas isocortical associação afetadas, enquanto a formação do hipocampo só é levemente envolvida e o córtex sensorial, o motor e visuais são desprovidos de PS. A Fase C é caracterizada por deposição de PS nas áreas isocortical primárias e, em alguns casos, o aparecimento desse depósito na camada molecular do cerebelo e núcleos sub-corticais, tais como estriado, tálamo, hipotálamo, núcleo subtalâmico e núcleo rubro (BRAAK e BRAAK, 1991).

Em outro estudo, semelhante ao descrito do Braak e Braak, os padrões de disseminação dos EN do envelhecimento saudável para a Doença de Alzheimer, utilizando a IHQ, determinou um recrutamento hierárquico que reflete a conectividade neuroanatômica das sub-regiões do hipocampo, área alvo precoce de processos neurodegenerativos do envelhecimento, cujo envolvimento é fundamental para as perturbações da memória. A expressão de EN no hipocampo também foi mais evidente CA1, em indivíduos que apresentaram comprometimento cognitivo leve podendo ser considerado um

precursor clínico da DA. Em poucos casos com maior gravidade da patologia, CA2 teve maior expressão, comparado com CA1, e não foram observadas placas senis, sugerindo que os emaranhados precedem as placas. Já as alterações patológicas em CA3/4 (componentes da via perforante, associada com a formação da memória), estão mais associadas com casos de demência clínica (LACE *et al.*, 2009).

Existe um complexo e controverso conjunto de circuitos no interior do hipocampo, que recebe e processa informações. Nas diferentes áreas do hipocampo, a informação projeta-se de CA1 a CA4. Refletido no envolvimento progressivo de diferentes sub-regiões dentro do hipocampo, ao seguir principalmente ligações neuroanatômicas, em vez de suscetibilidade celular intrínseca, embora a combinação de suscetibilidade celular e proliferação patológica através de conectividade não sejam excluídas (LACE *et al.*, 2009).

No presente estudo, a maior faixa etária dos indivíduos com DA foi de 86 anos ou mais (38,2%) e em todas as faixas a expressão dos EN através da IHQ com TAU foi maior que a das PS em todas as áreas, provavelmente, pela progressão da doença com aparecimento primeiro dos EN e pelo anticorpo utilizado não ser específico para marcar os compostos beta-amilóide das PS. Mesmo assim, estas puderam ser observadas e ao correlacionar a proporção entre PS/EN nas regiões do hipocampo e três faixas etárias, foi identificada uma diferença nos número de PS/EN em CA1 em todas as faixas (< 75 anos, entre 76 e 85 anos e 86 anos ou mais). Além disso, nesta mesma região, diferente das demais, os EN têm sempre em maior quantidade independente da idade, tendo um aumento proporcional ao envelhecimento. A diferença entre PS/EN em CA2/3 e CA4 só foi significativa nas faixas de 76 a 85 anos e 86 a

mais. Demonstrando que uma maior idade influencia e determina o aparecimento de lesões cerebrais e as diferenças existentes na duração e curso clínico da DA entre os indivíduos, decorrem da variação dos padrões de progressão em função da idade.

Já é sabido que o envelhecimento do cérebro é o principal fator de risco para o desenvolvimento de disfunção cognitiva e desenvolvimento de patologias degenerativas relacionadas à idade. Várias hipóteses sugerem que a intensidade da patologia se correlacionada com deterioração intelectual, que por sua vez atravessa o processo de envelhecimento. O critério do limite de placas é estabelecido em função da idade. Os emaranhados neurofibrilares e placas senis são achados marcantes na DA e em indivíduos saudáveis (GIMENEZ E VARGAS, 2007; LACE *et al.*, 2009; CASTELLANI e PERRY, 2014).

A prevalência da Doença de Alzheimer no presente estudo foi maior nas mulheres, concordando com a literatura nacional e internacional. Contudo, é importante ressaltar que esse maior número de mulheres afetadas se deve a fatores como a maior longevidade, e ainda, a maior sobrevivência das mulheres pós diagnóstico de DA comparado aos homens (LOPES e BOTTINO, 2002; 2010; SUH *et al.*, 2004; TALMELLI *et al.*, SUH *et al.*, 2006; APRAHAMIAN *et al.*, 2009; GONÇALVES e CARMO, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2015).

Com relação ao total de PS e EN nas três áreas dos hipocampus de indivíduos do sexo masculino e sexo feminino, não houve diferenças significativas. A quantidade de alterações parece não variar com o sexo ou não há um sexo com maior quantidade. Tanto para homens quanto para mulheres, CA1 foi à área com maior expressão de emaranhados, já para as

placas senis não houve diferença. Diferindo do relatado na literatura, onde com relação ao sexo, as alterações parecem ser maiores em mulheres no período pós-menopausa (CUMMINGS *et al.*, 1998; GIMENEZ e VARGAS 2007; YUDOFISKY e HALES, 2014).

Recentemente, a terapia de reposição hormonal em mulheres na pós-menopausa vem sendo discutida como fator de proteção. Nas mulheres, apesar de não haver comprovação da redução de risco de DA, o estrógeno é estudado como um hormônio protetor, onde o cérebro é um importante órgão-alvo com efeitos diretos sobre sua função na vasculatura e o sistema imune. Muitas ações do estrógeno são potencialmente relevantes para mudanças cognitivas que ocorrem após a menopausa, mas para a maioria das implicações clínicas são ainda pouco claras. Parece aumentar a plasticidade sináptica, o crescimento de neurites, neurogênese hipocampal e potencial de ação em longo prazo, além de proteger contra apoptose e contra a lesão neural em uma variedade de configurações experimentais, incluindo a toxicidade induzida por neurotransmissores excitatórios, β -amilóide, stress oxidativo, e a isquemia (BLENNOW, 2006; HENDERSON, 2008; APRAHAMIAN *et al.*, 2009).

Referente à análise do grau de escolaridade, em anos de estudo, em contraste com o revisado na literatura, não foi observada uma relação inversamente proporcional entre escolaridade e expressão de PS e EN no hipocampo. Nossos dados indicam que um alto nível intelectual não impede o aparecimento de alterações neuropatológicas características da DA. No entanto, algumas pesquisas trazem, que além do envelhecimento, outro fator de risco mais evidente, seria níveis de escolaridade baixos como um risco para a doença numa relação linear entre o estado intelectual e o número de placas,

supondo que quanto maior o grau de escolaridade, maior o estado intelectual. A escolaridade avançada seria parte dos fatores protetores para a doença, provavelmente pelo conseqüente aumento da densidade e complexidade sináptica ou dendríticas de regiões corticais mobilizadas para as demandas do aprendizado, levando a maiores limiares de reserva cognitiva e maior capacidade de compensação de deficiências intelectuais dos indivíduos com maior escolaridade. Os sujeitos com alta escolaridade apresentam melhor rendimento em testes neuropsicométricos mais simples como o Mini-Exame do Estado Mental (CUMMINGS *et al.*, 1998; BLENNOW, 2006; VARGAS e GIMENEZ, 2007; APRAHAMIAN *et al.*, 2009; REITZ e MAYEUX, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2015).

Talvez, a relação vista por estes estudos de países desenvolvidos com melhores condições de vida, não observada nesta análise seja variável até mesmo nas diferentes regiões do Brasil, visto que, o desenvolvimento da inteligência e da educação do ser humano é atribuível a uma complexa rede de características neuroanatômicas, genéticas, cognitivas e psicológicas interagindo e sendo transformada pelo ambiente ou contexto onde se insere as diferentes populações. Tal ambiente é determinado pela cultura, ambiente familiar, educação, nível socioeconômico e nutricional. Sendo observada uma correlação entre o padrão de vida e capacidade intelectual ou cognitiva, que reflete o nível de escolaridade, em algumas culturas, apenas média de anos de estudo (YUDOFISKY E HALES, 2014; SILVA MARTIN, *et al.*, 2014; MOHAJERI *et al.*, 2015).

Pessoas com histórico de complexa atividade intelectual e alta escolaridade tendem a desenvolver os sintomas da doença em um estágio

mais avançado da atrofia cerebral, pois é necessária uma maior perda de neurônios para que os sintomas de demência comecem a aparecer. (YUDOFKY E HALES, 2014; SILVA MARTIN, *et al.*, 2014; MOHAJERI *et al.*, 2015).

Conclusão

A Imunohistoquímica foi considerada o melhor método para detectar as lesões da Doença de Alzheimer em todas as análises realizadas. A prata e a hematoxilina eosina, podem subdiagnosticar a doença por baixa capacidade na visualização. No hipocampo, CA1, foi a área mais acometida em todos os indivíduos, assim como encontrado na literatura. Diferente do esperado, o sexo masculino e feminino não demonstraram diferenças importantes, mesmo sabendo-se do efeito protetor do hormonal, assim como a um maior grau de escolaridade. Este último achado pode ser influenciado pelo padrão de vida da população de estudo, podendo ser diferente em países desenvolvidos e com melhores condições de vida.

Referências

Associação Brasileira de Alzheimer- **ABRAZ**, Acesso:<http://www.abraz.com.br/>], 2014.

AHMED, S. et al. Connected speech as a marker of disease progression in autopsy-proven Alzheimer's disease. **Brain a Journal of Neurology**, London, v.136, p.3727-3737, 2013.

ANDRADE-MORAES, C. H. et al. Cell number changes in Alzheimer's disease relate to dementia, not to plaques and tangles. **Brain**, v. 136, n. 12, p. 3738-3752, 2013.

APRAHAMIAN, Ivan; MARTINELLI, J. E; YASSUDA, M. S. Doença de Alzheimer: revisão da epidemiologia e diagnóstico. **Rev Bras Clin Med**, v. 7, n. 5, p. 27-35, 2009.

ARNOLD, S. et al. The Topographical and Neuroanatomical Distribution of Neurofibrillary Tangles and Neuritic Plaques in the Cerebral Cortex of Patients with Alzheimer's Disease. **Neurology**. v. 51, p. 2-17, 1998.

BLENNOW, K; LEON, M. J;ZETTERBERG, H. **Alzheimer's disease**. Seminar, v. 368, p. 387-403, 2006.

BURLÁ, C. et al. Panorama prospectivo das demências no Brasil: um enfoque demográfico. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 10, p. 2949-2956, 2013.

BYRNE, U. T.E. et al. High-throughput quantification of Alzheimer's disease pathological markers in the post-mortem human brain. **Journal of neuroscience methods**, v. 176, n. 2, p. 298-309, 2009.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. **Acta neuropathologica**, v. 82, n. 4, p. 239-259, 1991.

BRAAK, H. et al. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. **Acta Neuropathol**. P. 389-404, 2006.

CAÇÃO, J. C. et al. Polimorfismo da apolipoproteína e nos familiares em primeiro grau de pacientes com doença de Alzheimer familiar ou esporádica. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 65, n. 2-A, p. 295-298, 2007.

CARAMELLI, P. et al. Diagnóstico de doença de Alzheimer no Brasil. **Dementia e Neuropsychologia, Brazil**, p. 11-20, 2011.

CASTELLANI, R. J.; PERRY, G.. The complexities of the pathology-pathogenesis relationship in Alzheimer disease. **Biochemical pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 671-676, 2014.

CUMMINGS, J. et al. Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. **Neurology**. v. 51, p. 65-67, 1998.

DE PAULA, V.J.R. et al. Neurobiological pathways to Alzheimer's disease Amyloid-beta, Tau protein or both? **Dementia & Neuropsychologia**. v.3, n.3, p.188-194, 2009.

FERNANDES, L.; COUTINHO, L. Alterações encontradas em cérebros de indivíduos acima dos 65 anos e sua correlação com demência de Alzheimer. **Arq. Neuro-Psiquiatria**, v.55, n.2, p.298-304, 1997.

GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V. PEREIRA; D. L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 61-84, 2013.

GONÇALVES. E.; CARMO, J. Diagnóstico da Doença de Alzheimer na População Brasileira: um Levantamento Bibliográfico. **Revista Psicologia e Saúde**. v. 4, n. 2, p. 170-176, 2012.

SELKOE, D.;HARDY, J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease:Progress and Problems on the Road to Therapeutics. **Science**. v. 297, p.256-256, 2002.

HARTMANN, A. P. B. J. et al. Hyperphosphorylated tau protein in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and other dementias: preliminary findings. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 62, n. 3B, p. 751-755, 2004.

HENDERSON, V. Cognitive Changes After Menopause: Influence of Estrogen. **Clin Obstet Gynecol**. v. 3, p. 618-626, 2008.

HYMAN, B. T. et al. National Institute on Aging–Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease.**Alzheimer's & Dementia**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2012.

JIMÉNEZ, B.; VARGAS, P.. Enfermedad de Alzheimer. Concepto. Etiopatogenia. Manifestaciones clínicas. Criterios de sospecha. Formas de presentación. Historia natural. Diagnóstico diferencial. **Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**, v. 9, n. 77, p. 4928-4935, 2007.

KARRAN, E.; MERCKEN, M.; DE STROOPER, B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 9, p. 698-712, 2011.

LACE, G. et al. Hippocampal tau pathology is related to neuroanatomical connections: an ageing population-based study. **Brain**, p. 1324–1334, 2009.

LOPES, M.; BOTTINO C. Prevalência de demência em diversas regiões do mundo: análise dos estudos epidemiológicos de 1994 a 2000. **Arq Neuropsiquiatria**, p.61-69, 2002.

MARKESBERY, W. Neuropathological Criteria for the Diagnosis of Alzheimer's Disease. **Neurobiology of Aging**. V. 18, n. s4, p. 13-19, 1997.

MICHAEL, R. et al. Absence of amyloid-beta in lenses of Alzheimer patients: A confocal Raman microspectroscopic study. **Experimental eye research**, v. 119, p. 44-53, 2014.

MIRRA, S. S. et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 41, n. 4, p. 479-479, 1991.

MOHAJERI, et al. Inadequate supply of vitamins and DHA in the elderly: Implications for brain aging and Alzheimer-type dementia. **Nutrition**. v. 31, p. 261-275, 2015.

PUZZO, D. et al. Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: Practical considerations and guidelines. **Biochemical pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 450-467, 2014.

REITZ, C.; MAYEUX, R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. **Biochemical pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 640-651, 2014.

SERRANO-POZO, A. et al. Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. **The American journal of pathology**, v. 179, n. 3, p. 1373-1384, 2011.

SILVA MARTIN, et al. Influência do nível socioeconômico sobre os fatores de risco cardiovascular. **JBM**. v.102, n. 2, p. 34-37, 2014

Suh, G. et al. A longitudinal study of Alzheimer's disease: rates of cognitive and functional decline. **Int J Geriatr Psychiatry**. v. 19, n. 9, p. 817-24, 2006.

TALMELLI, et al. Nível de independência funcional e déficit cognitivo em idosos com doença de Alzheimer. **Rev Esc Enferm USP**. v 44, n. 4, p. 933-939, 2010.
TAKEDA, T. et al. Four-repeat tau-selective deposition in subthalamic nucleus and motor cortex in Alzheimer disease. **Clinical Neurology and Neurosurgery**,v.115,p.,2013.

TEIXEIRA, J. et al. Doença de Alzheimer: estudo da Mortalidade no Brasil, 2000-2009. **Cad. Saúde Pública**. v. 31, n. 4, p. 1-12, 2015.

VALENTE, T. et al. Immunohistochemical analysis of human brain suggests pathological synergism of Alzheimer's disease and diabetes mellitus. **Neurobiology of disease**, v. 37, n. 1, p. 67-76, 2010.

VANDENBERGHE, R. et al. Amyloid PET in clinical practice: Its place in the multidimensional space of Alzheimer's disease. **NeuroImage: Clinical**, v. 2, p. 497-511, 2013.

VERDILE, G. et al. The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught?. **Pharmacological Research**, v. 50, n. 4, p. 397-409, 2004.

World Health Organization- (**WHO**) and Alzheimer's Disease International .

[Acesso:

http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2012/dementia_20120411/en/],
2014

WU, G. et al. Decrease in Brain Soluble Amyloid Precursor Protein b (sAPPb) in Alzheimer's Disease Cortex. **Journal of Neuroscience Research**, v.89, p. 822–832,2011.

YUDOFKY, S.; HALES, R. **Fundamentos de Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento**. Artmed.São Paulo. 2ed, p. 133-137, 2014.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A melhor expressão de emaranhados neurofibrilares e placas senis foi observada através da imunohistoquímica com anticorpo anti-TAU.
- Para melhores resultados e melhor classificação das colorações mais fidedignas na detecção de placas senis e emaranhados neurofibrilares, é importante a análise de imunohistoquímica com anticorpo específico para placas senis e assim, correlacionar sua contagem em diferentes grupos. Da mesma forma, outras colorações da histologia convencional também podem ser avaliadas, como o vermelho congo e o PSA (Ácido Periódico de Schiff), no intuito de realizar um *ranking* das colorações mais sensíveis.
- O presente estudo será submetido a uma revista científica a ser decidida pelos pesquisadores envolvidos, após as sugestões da banca e correção final. (Revista Human Pathology, A2, Fator de Impacto 2,791)

REFERÊNCIAS

Associação Brasileira de Alzheimer- **ABRAZ**, Disponível em: <<http://www.abraz.com.br/>>. Acesso em: 03. dez. 2014.

AHMED, S. et al. Connected speech as a marker of disease progression in autopsy-proven Alzheimer's disease. **Brain a Journal of Neurology**, London, v.136, p.3727-3737, 2013.

ANDRADE-MORAES, C. H. et al. Cell number changes in Alzheimer's disease relate to dementia, not to plaques and tangles. **Brain**, v. 136, n. 12, p. 3738-3752, 2013.

APRAHAMIAN, Ivan; MARTINELLI, J. E; YASSUDA, M. S. Doença de Alzheimer: revisão da epidemiologia e diagnóstico. **Rev Bras Clin Med**, v. 7, n. 5, p. 27-35, 2009.

ARNOLD, S. et al. The Topographical and Neuroanatomical Distribution of Neurofibrillary Tangles and Neuritic Plaques in the Cerebral Cortex of Patients with Alzheimer's Disease. **Neurology**. v. 51, p. 2-17, 1998.

BALLARD, C. et al. **Alzheimer's disease**. Seminar , v. 377, p. 1019–31, 2011

BLENNOW, K; LEON, M. J;ZETTERBERG, H. **Alzheimer's disease**. Seminar, v. 368, p. 387–403, 2006

BURLÁ, C. et al. Panorama prospectivo das demências no Brasil: um enfoque demográfico. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 10, p. 2949-2956, 2013.

BYRNE, U. T.E. et al. High-throughput quantification of Alzheimer's disease pathological markers in the post-mortem human brain. **Journal of neuroscience methods**, v. 176, n. 2, p. 298-309, 2009.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. **Acta neuropathologica**, v. 82, n. 4, p. 239-259, 1991.

BRAAK, H. et al. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. **Acta Neuropathol.** P. 389-404, 2006..

CAÇÃO, J. C. et al. Polimorfismo da apolipoproteína e nos familiares em primeiro grau de pacientes com doença de Alzheimer familiar ou esporádica. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 65, n. 2-A, p. 295-298, 2007.

CARAMELLI, P. et al. Diagnóstico de doença de Alzheimer no Brasil. **Dementia e Neuropsychologia, Brazil**, p. 11-20, 2011.

CASTELLANI, R. J.; PERRY, G.. The complexities of the pathology–pathogenesis relationship in Alzheimer disease. **Biochemical pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 671-676, 2014.

CUMMINGS, J. et al. Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. **Neurology**. v. 51, p. 65-67, 1998.

DIAS, F. L. da C. et al. Perfil clínico e autonômico de pacientes com doença de Alzheimer e demência mista. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 5, p. 435-441, 2013.

FERNANDES, L.; COUTINHO, L. Alterações encontradas em cérebros de indivíduos acima dos 65 anos e sua correlação com demência de Alzheimer. **Arq. Neuro-Psiquiatria**, v.55, n.2, p.298-304 , 1997.

GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V. PEREIRA; D. L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 61-84, 2013.

GONÇALVES. E.; CARMO, J. Diagnóstico da Doença de Alzheimer na População Brasileira: um Levantamento Bibliográfico. **Revista Psicologia e Saúde**. v. 4, n. 2, p. 170-176, 2012.

SELKOE, D.;HARDY, J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease:Progress and Problems on the Road to Therapeutics. **Science**. v. 297, p.256-256, 2002.

HARTMANN, A. P. B. J. et al. Hyperphosphorylated tau protein in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and other dementias: preliminary findings. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 62, n. 3B, p. 751-755, 2004.

HENDERSON, V. Cognitive Changes After Menopause: Influence of Estrogen. **Clin Obstet Gynecol.** v. 3, p. 618-626, 2008.

HERRUP, K. Reimagining Alzheimer's disease—an age-based hypothesis. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 50, p. 16755-16762, 2010.

HYMAN, B. T. et al. National Institute on Aging–Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2012.

JACOB, K. D. et al. Alzheimer's disease-associated polymorphisms in human OGG1 alter catalytic activity and sensitize cells to DNA damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 63, p. 115-125, 2013.

JIMÉNEZ, B.; VARGAS, P.. Enfermedad de Alzheimer. Concepto. Etiopatogenia. Manifestaciones clínicas. Criterios de sospecha. Formas de presentación. Historia natural. Diagnóstico diferencial. **Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**, v. 9, n. 77, p. 4928-4935, 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 3-4, 14-15, 296. 2013.

KARRAN, E.; MERCKEN, M.; DE STROOPER, B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 9, p. 698-712, 2011.

LACE, G. et al. Hippocampal tau pathology is related to neuroanatomical connections: an ageing population-based study. **Brain**, p. 1324–1334, 2009.

LEITE, F. Envelhecimento populacional e a composição etária de beneficiários de planos de saúde. **Instituto de Estudos de Saúde Suplementar**. 2011.

LIRAZ, O.; BOEHM-CAGAN, A.; MICHAELSON, D. M. ApoE4 induces Abeta42, tau, and neuronal pathology in the hippocampus of young targeted replacement apoE4 mice. **Mol Neurodegener**, v. 8, p. 16, 2013.

LOPES, M.; BOTTINO C. Prevalência de demência em diversas regiões do mundo: análise dos estudos epidemiológicos de 1994 a 2000. **Arq Neuropsiquiatria**, p.61-69, 2002.

MARKESBERRY, W. Neuropathological Criteria for the Diagnosis of Alzheimer's Disease. **Neurobiology of Aging**. V. 18, n. s4, p. 13-19, 1997.

MCKHANN, G. et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. **Neurology**. v.34, n.7, p. 939-944, 1984.

MICHAEL, R. et al. Absence of amyloid-beta in lenses of Alzheimer patients: A confocal Raman microspectroscopic study. **Experimental eye research**, v. 119, p. 44-53, 2014.

MIRRA, S. S. et al. Making the diagnosis of Alzheimer's disease. A primer for practicing pathologists. **Arch Pathol Lab Med**. v. 117, n. 2, p. 132-144, 1993.

MIRRA, S. S. et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 41, n. 4, p. 479-479, 1991.

MOHAJERI, et al. Inadequate supply of vitamins and DHA in the elderly: Implications for brain aging and Alzheimer-type dementia. **Nutrition**. v. 31, p. 261-275, 2015.

NIJHOLT, D. A.T. et al. The unfolded protein response is associated with early tau pathology in the hippocampus of tauopathies. **The Journal of pathology**, v. 226, n. 5, p. 693-702, 2012.

PUERTAS, M. del C. et al. Plasma renin–angiotensin system-regulating aminopeptidase activities are modified in early stage Alzheimer's disease and show gender differences but are not related to apolipoprotein E genotype. **Experimental gerontology**, v. 48, n. 6, p. 557-564, 2013.

PUZZO, D. et al. Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: Practical considerations and guidelines. **Biochemical pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 450-467, 2014.

REITZ, C.; MAYEUX, R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. **Biochemical pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 640-651, 2014.

SELFRIDGE, J. E. et al. Role of mitochondrial homeostasis and dynamics in Alzheimer's disease. **Neurobiology of disease**, v. 51, p. 3-12, 2013.

SERRANO-POZO, A. et al. Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. **The American journal of pathology**, v. 179, n. 3, p. 1373-1384, 2011.

SILVA MARTIN, et al. Influência do nível socioeconômico sobre os fatores de risco cardiovascular. **JBM**. v.102, n. 2, p. 34-37, 2014

Suh, G. et al. A longitudinal study of Alzheimer's disease: rates of cognitive and functional decline. **Int J Geriatr Psychiatry**. v. 19, n. 9, p. 817-24, 2006.

TALMELLI, et al. Nível de independência funcional e déficit cognitivo em idosos com doença de Alzheimer. **Rev Esc Enferm USP**. v 44, n. 4, p. 933-939, 2010.

TAKEDA, T. et al. Four-repeat tau-selective deposition in subthalamic nucleus and motor cortex in Alzheimer disease. **Clinical Neurology and Neurosurgery**,v.115,p.,2013.

TEIXEIRA, J. et al. Doença de Alzheimer: estudo da Mortalidade no Brasil, 2000-2009. **Cad. Saúde Pública**. v. 31, n. 4, p. 1-12, 2015.

TEIPEL, S. J. Risk and resilience: A new perspective on Alzheimer's disease. **Geriatric Mental Health Care**, v. 1, n. 3, p. 47-55, 2013.

TORRÃO, A. S. et al. Different approaches, one target: understanding cellular mechanisms of Parkinson's and Alzheimer's diseases. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34, p. s194-s205, 2012.

VALENTE, T. et al. Immunohistochemical analysis of human brain suggests pathological synergism of Alzheimer's disease and diabetes mellitus. **Neurobiology of disease**, v. 37, n. 1, p. 67-76, 2010.

VANDENBERGHE, R. et al. Amyloid PET in clinical practice: Its place in the multidimensional space of Alzheimer's disease. **NeuroImage: Clinical**, v. 2, p. 497-511, 2013.

VERDILE, G. et al. The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught?. **Pharmacological Research**, v. 50, n. 4, p. 397-409, 2004.

World Health Organization- (**WHO**) and Alzheimer's Disease International .
[Acesso:
http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2012/dementia_20120411/en/],
2014

WU, G. et al. Decrease in Brain Soluble Amyloid Precursor Protein b (sAPPb) in Alzheimer's Disease Cortex. **Journal of Neuroscience Research**, v.89, p. 822–832,2011

YUDOFISKY, S.; HALES, R. **Fundamentos de Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento**. Artmed.São Paulo. 2ed, p. 133-137, 2014.

APÊNDICE

APÊNDICE A – FÓRMULARIO DE COLETA DE DADOS

COMPARAÇÃO DE PLACAS E EMARANHADOS NA DOENÇA DE ALZHEIMER ATRAVÉS DA HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA APÊNDICE 1- FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

Hipocampo nº. _____

RELATÓRIO NEUROPATÓLOGICO CASO Nº _____

Pesquisador: _____

Data da coleta de dados ____/____/____

Data da Digitação ____/____/____

Dados Pessoais

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: _____

Profissão: _____ Procedência: _____

História Clínica

Diagnóstico Necroscópico

- Braak e Braak: estágios entorrinais (I / II) estágios límbicos, hipocampo e amígdalas (III / IV) e estágios neocorticais (V / VI).
- CERAD: 0(nenhuma placa), A(esparsas), B(moderadas) e C(frequentes).
- Diagnóstico: possível, provável e definido.

Análise da Imunohistoquímica

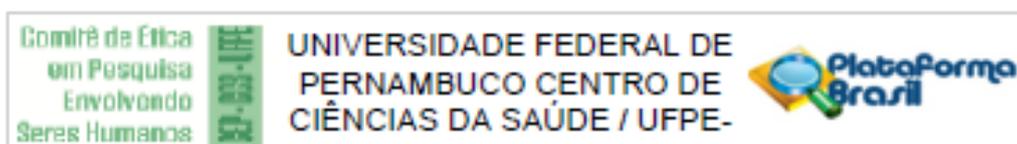
Análise da Histologia Convencional

PRATA _____

HE _____

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/CCS/UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: COMPARAÇÃO DE PLACAS E EMARANHADOS NA DOENÇA DE ALZHEIMER ATRAVÉS DA HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA

Pesquisador: Lidier Roberta Moraes Nogueira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 44265315.1.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.100.327

Data da Relatoria: 03/06/2015

Apresentação do Projeto:

Projeto de Pesquisa apresentado ao Programa de Pós-graduação em Patologia para realização de Mestrado em Patologia pelo CCS/UFPE. Trata-se de um estudo comparativo de placas e emaranhados na doença de Alzheimer através da histologia e imunohistoquímica do tipo observacional e analítico transversal. O estudo será realizado no laboratório do departamento de Pós Graduação em Patologia (POSPAT) da UFPE em conjunto com o Serviço de Verificação de Óbito (SVO) da UFPE. O estudo será composto por todos os blocos parafinados de tecido cerebral (hipocampo) de indivíduos com diagnóstico de Doença de Alzheimer e indivíduos não portadores. Os quais foram obtidos, identificados e arquivados pelo Prof^o Dr. Roberto José Vieira de Melo do Departamento de Patologia da UFPE após as necropsias realizadas desde de 2000 até 2014.

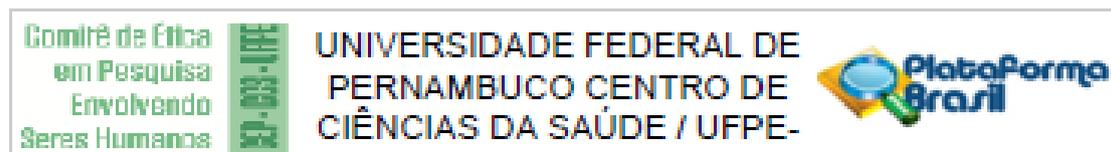
Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Estudar a presença de placas senis e emaranhados neurofibrilares em cortes histológicos de hipocampus de portadores de Doença de Alzheimer avaliando aspectos clínicos, sócio-demográficos, histológicos e imunohistoquímico.

Objetivos Secundários:

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepcca@ufpe.br



Continuação do Protocolo: 1.100.327

Em cortes histológicos de hipocampo de indivíduos portadores de Doença de Alzheimer e de indivíduos não portadores:

- Verificar dentre os métodos de coloração utilizados qual o melhor para identificação e quantificação de placas senis e emaranhados neurofibrilares na histologia;
- Identificar e quantificar o número de placas senis e emaranhado neurofibrilares através da Imunohistoquímica;
- Traçar o perfil clínico, sócio-demográfico dos indivíduos cujos hipocampus foram analisados;
- Correlacionar o número médio de placas senis e emaranhados neurofibrilares, observados através da histologia e Imunohistoquímica e o perfil do indivíduo;
- Estimar uma escala numérica de quantificação das placas senis e emaranhados neurofibrilares obtidas pelos métodos de coloração em comparação com a Imunohistoquímica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os pesquisadores envolvidos declaram que não há risco para a pesquisa, pois a análise será baseada em dados e amostras de arquivos. Além disso, declaram que os riscos são relacionados a extravios de material coletado e quebra de sigilo, porém nos comprometemos a manter o sigilo de todas as informações que serão coletadas por meio do termo de confidencialidade dos dados.

Benefícios:

O estudo tem como benefício a obtenção de dados relacionados ao melhor método de avaliação neuropatológica de tecido cerebral na Doença de Alzheimer. Esses resultados permitirão que futuramente possam ser eleitos a melhor coloração para identificar as placas senis e os emaranhados neurofibrilares e assim evitados os subdiagnósticos, além de trazer conhecimento para toda comunidade científica.

Os resultados do estudo poderão ser publicados, porém o nome dos indivíduos e sua identidade não serão revelados, de forma que ele não poderá ser identificado, mantendo-se sua identidade em sigilo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Considerando o grande número de indivíduos que podem desenvolver doenças neurodegenerativas causadoras de demências como a DA, através da realização desta pesquisa será possível identificar dentre alguns métodos de coloração utilizados para o diagnóstico de DA, qual o mais eficiente e confiável para observar as placas senis e os emaranhados neurofibrilares,

Endereço: Av. de Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
 UF: PE Município: RECIFE E-mail: cepccs@ufpe.br
 Telefone: (81)2128-8588

Continuação do Parecer: 1.100.327

além de correlacionar os achados histológicos obtidos por esta melhor técnica com as características clínicas e sócio-demográficas. Os resultados também contribuirão para diminuir o número de diagnósticos falso – negativos ou subdiagnóstico de DA. O trabalho está bem escrito, com uma boa bibliografia e dentro das normas necessárias para sua aprovação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

a- Carta de anuência - o documento foi devidamente apresentada.

b- Folha de rosto – o documento foi devidamente apresentado.

c- Autorização para uso dos dados – O documento foi devidamente apresentado.

d- Termo de confidencialidade – o documento foi devidamente apresentado.

Recomendações:

Verificar e corrigir o ano Inicial dos prontuários que serão usados na pesquisa; se será a partir de 2000 ou 2008.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma pendencia

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está **APROVADO** para Iniciar a coleta de dados. Informamos que a **APROVAÇÃO DEFINITIVA** do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as Instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (Item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo

Endereço: Av. de Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

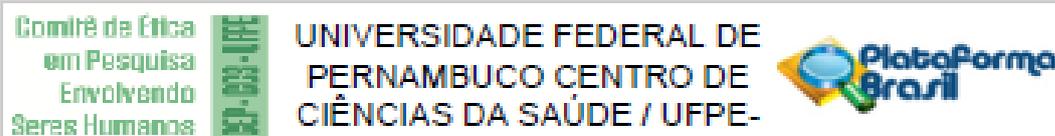
CEP: 50.740-800

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2128-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.100.327

Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (Item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

RECIFE, 10 de Junho de 2015

Assinado por:
Gláete Cristina Sena da Silva Pinho
 (Coordenador)

Endereço: Av. de Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81) 3126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br