

INVESTIGAÇÃO DOS NÍVEIS CIRCULANTES DE TGF-BETA EM PORTADORES DA DOENÇA DE ALZHEIMER COM DIFERENTES HABILIDADES VISO-ESPACIAIS E CONSTRUCIONAIS.

MELO, Natália Cruz e^{1,3}; BORGES, Marlos Antônio²; MOLINARI- MADLUM, Eugênia Emília Walquíria Inês^{1,4}

¹Laboratório de Imunopatologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. CEP: 74001-970, Brasil.

²Hospital Geral de Goiânia Anis Rassi.

Palavras-Chaves: TGF-Beta, Doença de Alzheimer, disfunção viso-espacial e construcionais.

1. INTRODUÇÃO

O progressivo envelhecimento da população mundial devido aos avanços tecnológicos, sociais e da medicina, proporcionou o aumento da longevidade e conseqüentemente o surgimento de doenças ligadas a senilidade.

O Brasil é um dos países em desenvolvimento nos quais o envelhecimento da população está ocorrendo com maior velocidade. Nos últimos 50 anos houve um aumento expressivo da população com 60 anos ou mais. Em 1950, essa população era de aproximadamente 2 milhões, e correspondia a 4,1% da população total. No ano 2000 esta população aumentou para 13 milhões, e passou a corresponder a 7,8% da população total. Nos próximos 50 anos estima-se que a população idosa mundial será de 58 milhões, o que corresponderá a 23,6% da população total (SCAZUFCA, et al 2002).

Um dos grandes problemas atuais de saúde pública na geriatria é a Doença de Alzheimer (DA) que compromete as funções cognitivas e mentais, que envolvem o declínio da memória afetando significativamente a qualidade de vida.

A DA foi caracterizada em 1907, pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer, como uma afecção neurodegenerativa, progressiva e irreversível, de aparecimento insidioso, que acarreta perda da memória e diversos distúrbios cognitivos (SMITH, et al 1999).

Revisado pelo orientador

² Pesquisador do projeto

³ Orientanda, E-mail: natallimel@hotmail.com

⁴ Profa. Dra./ Orientadora; E-mail: molinari@iptsp.ufg.br

As características do declínio cognitivo e funcional da doença são acompanhadas de distúrbios comportamentais em quase 90% dos pacientes (BOZZOLA, et al 1992; GUIMARÃES, et al 2008). Quanto aos primeiros sintomas, observa-se um prejuízo na memória, na orientação espaço-temporal, no pensamento, na concentração e na linguagem. Algumas das modificações de conduta são: o surgimento de transtornos de humor, alterações sexuais, mudança de apetite, delírios e alucinações, apatia e indiferença, desinibição, distúrbios de atividade psicomotora e distúrbios do sono (MANGONE, et al 1995 e ALLEGRI, et al 2001).

Do ponto de vista neuropatológico, observa-se no cérebro de indivíduos com DA atrofia cortical difusa, a presença de grande número de placas senis e novos neurofibrilares, degenerações grânulo-vacuolares e perda neuronal. Verifica-se ainda um acúmulo da proteína b-amilóide nas placas senis e da microtubulina *tau* nos novos neurofibrilares. Acredita-se que a concentração das placas senis esteja correlacionada ao grau de demência nos indivíduos afetados. (KATZAMAN, et al 1986 e SMITH, et al 1999).

O fator transformador do crescimento beta (TGF- β) integra uma família de polipeptídeos com a capacidade de regular uma fascinante variedade de processos celulares, incluindo proliferação celular, diferenciação, mobilidade, aderência e morte.

TGF- β s são hiperexpressos em várias lesões traumáticas (KLEMPET et al, 1992; LOGAN et al, 1992), lesão hipóxica (LINDHOLM, et al 1992), e em doenças neurodegenerativas, como Parkinson (VAWTER, et al 1996), e mal de Alzheimer (CHAO, et al 1994; FLANDRES et al, 1995; LIPPA et al, 1995; PERESS, et al 1995; VAWTER, et al 1996).

A expressão de TGF- β está alterada na AD (FLANDERS, et al 1995; VAWTER, et al 1996), onde aumento foi encontrado no LCR e soro (CHAO, et al 1994). Estudos detalhados revelaram um aumento desta citocina na deposição das placas senis (VAWTER, et al 1992).

Os resultados acima são indicativos de que as citocinas podem desempenhar um papel fundamental na inflamação associada com doenças crônicas degenerativas com alterações no cérebro. O entendimento da imunossenescência e o papel do TGF- β ainda são obscuros, mas são de extrema importância para elucidação do diagnóstico e tratamento da DA.

O teste do desenho do relógio (TDR) é um instrumento de avaliação cognitiva de fácil e rápida aplicação, especialmente em idosos, sendo fácil administrar a pontuação no teste

neuropsicológico apresenta excelente aceitação pelos sujeitos (SHULMAN, et al 2000, BOZIKAS, et al 2001).

Do ponto de vista do domínio cognitivo aferido, o TDR avalia habilidades visoespaciais, construtivas e funções executivas (SPREEN e STRAUS, 1998; ATALAIA-SILVA, et al 2008). Através deste teste é possível avaliar distúrbios cognitivos em diferentes formas de demência. Os pacientes com demência do tipo Alzheimer, a doença de Huntington, doença vascular isquêmica, e a doença de Parkinson, apresentam comprometimento significativo no TDR em comparação com indivíduos saudáveis (CHAN-WEINER, et al 1999 e BOZIKAS, et al 2001). Outra ferramenta bastante útil para a psicologia na identificação de indivíduos afetados por distúrbios neurológicos são os Testes de Fluência Verbal (TFV), que avaliam a memória e a função cognitiva.

A fluência verbal é geralmente definida como a capacidade de produzir palavras em condições específicas e, dentro de um tempo fixo (NUTTER-UPHAM, et al 2008), parece estar alterada em múltiplos processos patológicos, tais como as demências degenerativas do tipo Alzheimer ou fronto-temporal, nas lesões frontais esquerdas ou bilaterais e nas enfermidades psiquiátricas como a esquizofrenia e depressão (RODRIGUES, et al 2008).

2. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi investigar os níveis séricos de TGF- β nas diferentes habilidades visoespaciais e construcionais em idosos portadores da Doença de Alzheimer.

3. METODOLOGIA

3.1 Casuística

A amostra foi constituída por idosos portadores da Doença de Alzheimer entre 60 e 100 anos inclusos no do Programa de Atendimento ao Paciente com Doença de Alzheimer do Hospital Geral de Goiânia.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado pelos entrevistados incluiu todas as informações pertinentes à pesquisa de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde que estabelece as diretrizes e normas que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos. O protocolo utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal do Hospital Geral de Goiânia (CEPH-HGG- N°. 447/09).

3.2 Testes

3.2.1 Teste do Relógio (TDR)

O TDR foi aplicado de maneira individualizada, os parâmetros analisados foram disfunção viso-espacial e construcional. Um aplicador qualificado solicitou aos indivíduos para que desenhassem 11h20min.

3.2.2 Teste de Fluência Verbal

O TFV foi aplicado de maneira individualizada, o parâmetro analisado foi a fluência semântica no gênero de animais e frutas. Um aplicador qualificado solicitou aos indivíduos para que nomeassem os nomes de animais e frutas em um determinado tempo de 1 minuto.

3.3 Anamnese

Na anamnese foram anotadas as informações relatadas pelo paciente sobre seu estado, abordando queixas que envolvem a perda de memória recente, alteração no comportamento psicomotor e na orientação viso-espacial.

3.4 Análise Clínica

A avaliação clínica foi efetuada pelo geriatra responsável pelo programa de Assistência aos indivíduos portadores de Alzheimer no Estado de Goiás.

3.5 Coleta de Sangue de Idosos de Portadores da Doença de Alzheimer

As amostras de sangue foram coletadas em tubos estéreis à vácuo com e sem anticoagulante por profissionais qualificados, seguindo as normas de biossegurança. Após a separação do soro e plasma, estes foram alíquotados e armazenados em condições adequadas para posterior dosagem do TGF- β .

3.6 Dosagem do TGF- β

A análise das concentrações do TGF- β foi determinada por ensaio Imunoenzimático de captura - ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) com kit de alta sensibilidade específico para esta citocina (*Human TGF- β -1 Instant ELISA—No.BMS249/2INST*). Todo o procedimento foi realizado conforme preconizado pelo manual

do fabricante. Foram pipetados 100 µl de água destilada em todos os pocinhos das amostras e 120 µl de água destilada nos pocinhos dos padrões e branco. Em seguida foram colocados 50 µl de cada amostra homogeneizando delicadamente, a placa foi coberta com uma fita adesiva transparente, e incubou-se por 3 h em temperatura de 18 a 25° C.

Após o tempo de incubação, a microplaca foi lavada 6 vezes com 400 µl de tampão de lavagem, a secagem foi feita com a utilização de papel absorvente. Foram pipetados 100 µl da Solução Substrato TMB nos pocinhos, esperou-se 10 minutos de incubação em temperatura ambiente evitando a exposição de luz intensa. A reação foi interrompida quando o padrão mais alto estava com coloração azul escuro com a solução stop. As leituras foram realizadas em leitora de microplaca ajustada para o comprimento de onda (450 nm) recomendado pelo fabricante.

3.7 Análise Estatística

As variáveis numéricas foram avaliadas para distribuição gaussiana dos dados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste t de Student não pareado foi realizado para analisar os dados obtidos quando a média de dois grupos amostrais foi comparada. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. O processamento dos dados e a análise estatística foram realizados através de GraphPad Prism Software 3.02.

4 RESULTADOS

Foram analisados 3 grupos subdivididos pelo desempenho dos indivíduos no TFV, o Grupo 1 composto por 25 portadores da DA que atingiram de 0 a 7 pontos, o Grupo 2 21 portadores da DA com pontuação entre 8 a 9 pontos, enquanto o grupo 3 com 24 portadores da doença com pontuação acima de 10 pontos.

Quando o desempenho no TFVA foi avaliado (Figura 1) entre portadores da DA, melhor desempenho foi observado entre as mulheres, exceto no grupo 2 onde a proporção de idosos do sexo masculino foi maior. Diferenças significativas foram encontradas nos grupos (1 e 2) e (1 e 3) entre as mulheres com valores de $p=0,0315$ e $p=0,0001$, Média= M (4,933 ± 0,5207); (4,933 ± 0,5207) e Dp (1,629; 1,780; 3,101), respectivamente.

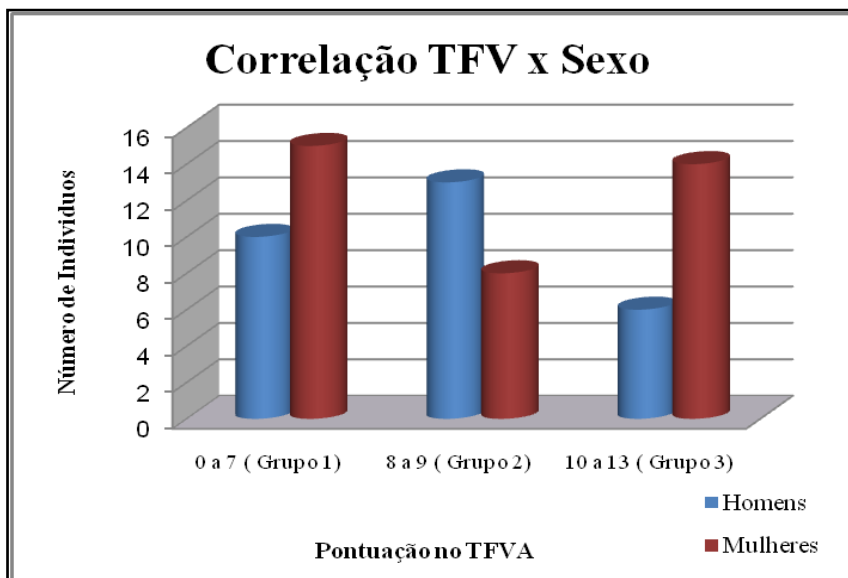


Figura 1- Correlação entre o TFV e o Sexo dos portadores da DA.

Entre os idosos do sexo masculino diferenças significativas foram encontradas nos grupos (1 e 3), com valores de $p=0,0027$, $M= (5,636 \pm 0,4912)$; $(9,571 \pm 1,172)$, respectivamente.

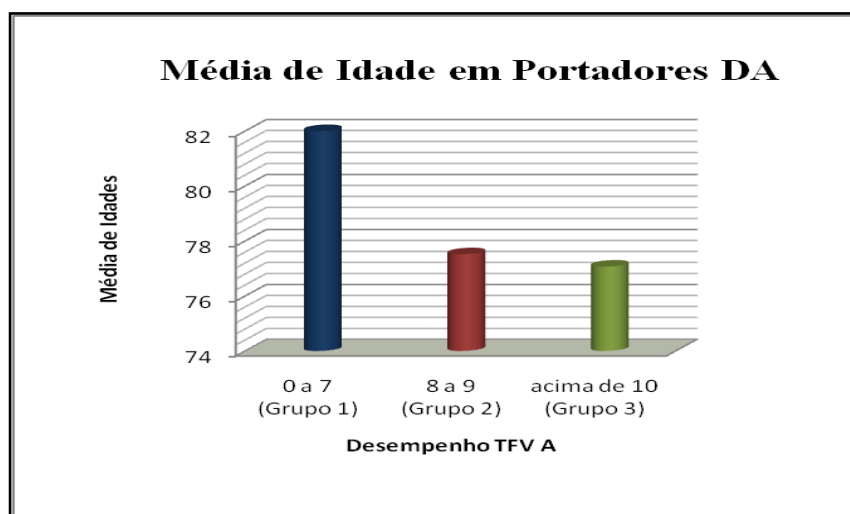


Figura 2- Média de Idade dos portadores da DA com diferentes desempenhos do TFV.

Quando a idade dos portadores da DA foi analisada nos diferentes grupos (Figura 2), o grupo com maior comprometimento no TFV foi o dos indivíduos com menor média de idade. Entre os grupos 2 e 3 (8 a 9 e acima de 10) não houve diferenças estatisticamente significativas.

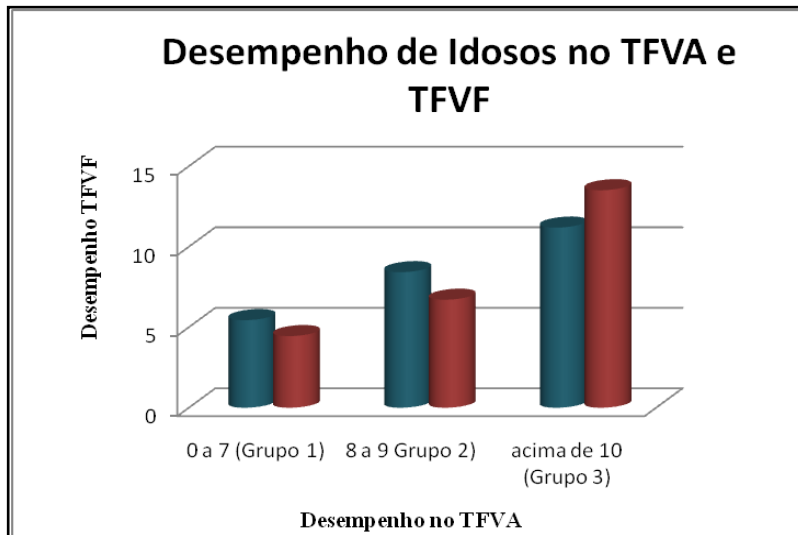


Figura 3- Desempenho de Idosos portadores da DA no TFVA e TFVF.

Quando o desempenho dos idosos portadores da DA no TFVA e TFVF foi analisado em conjunto, processos de memória distintos para os gêneros de frutas e animais foram detectados, uma vez que o desempenho no TFVA foi maior em todos os grupos estudados. Quando comparamos o desempenho no TFVA e TFVF nos grupos 2 e 3, encontramos valores extremamente significativos com valores de $p=0,0003$ e $p=0,0004$, $M(8,381 \pm 0,1615)$; $(6,714 \pm 0,3851)$ e $Dp(1,170; 2,922)$ respectivamente.

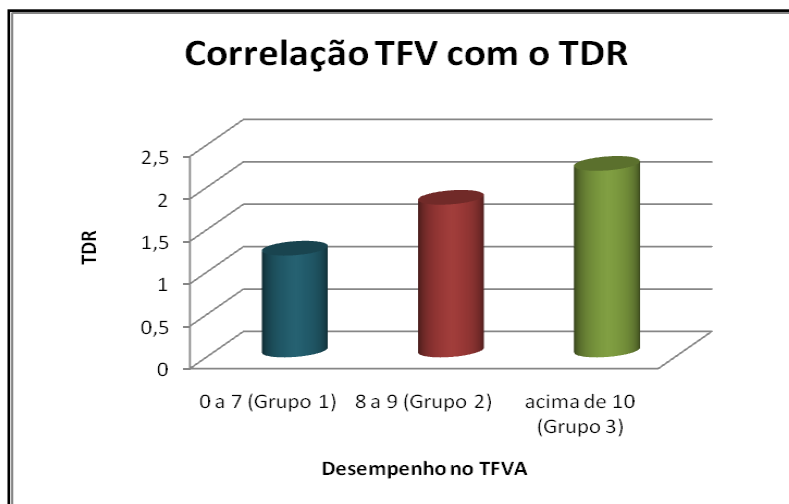


Figura 4- Correlação entre o TFV e TDR em portadores DA.

Correlação diretamente proporcional foi identificada entre o desempenho dos portadores da DA no TFVA e no TDR (Figura 4). O grupo que apresentou menores escores no TFVA, também mostrou menor desempenho no TDR. Resultados semelhantes ocorreram

com os outros grupos, para os quais houve também houve coincidência no resultado dos dois testes, contudo estas diferenças não foram estatisticamente significativas.

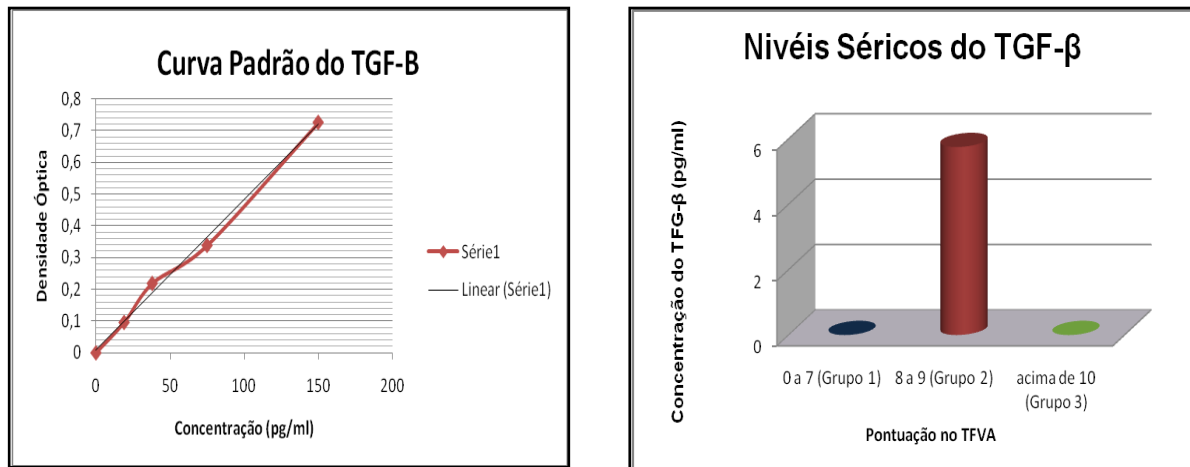


Figura 5.a- Curva Padrão para a dosagem do TGF- β . b- Níveis séricos do TGF- β

Quando os níveis séricos do TGF- β foram avaliados entre os portadores da DA, níveis detectáveis desta citocina foram encontrados apenas nos indivíduos do grupo 2 com desempenho no TFVA (Figura 5).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo maior proporção de mulheres acometidas pela DA foi observada, exceto no grupo com desempenho de 8 a 9 onde tivemos maior proporção de indivíduos do sexo masculino foi observada. Esses resultados são condizentes com vários estudos que apontam a DA mais prevalente no sexo feminino, este predomínio chegou à razão de duas mulheres para um homem foram relatados (KOMAHASHI, et al 1994; POUZA, et al 1995; PARK, et al 2002; LOPES e BOTTINO, 2002). Entretanto, cerca de 25% dos estudos descreveram prevalência maior no sexo masculino, com diferenças que não foram estatisticamente significativas. Leve predomínio do sexo masculino, tem sido descrito nos casos de demência em negros americanos, resultado oposto ao observado nos brancos americanos (LOPES e BOTTINO, 2002).

Quando a idade dos portadores da DA foi analisada observamos que no grupo com maior comprometimento da DA e conseqüentemente menor desempenho no TFVA, os indivíduos eram mais idosos. A prevalência da demência aumenta progressivamente com o envelhecimento, sendo a idade o maior fator de risco para a doença. A partir dos 65 anos, sua prevalência dobra a cada cinco anos. Entre 60 e 64 anos apresenta prevalência de 0,7%,

passando por 5,6% entre 70 e 79 anos, e chegando a 38,6% nos nonagenários. A incidência parece não diminuir mesmo na faixa etária dos muito idosos, acima dos 95 anos (SMITH, et AL 1999).

Uma ferramenta bastante útil para a psicologia na identificação de indivíduos afetados por distúrbios neurológicos são os Testes de Fluência Verbal, que avaliam a memória e a função cognitiva. Em comparação com idosos saudáveis e pacientes com DA o TFV, os pacientes tendem a apresentar déficits significativos em fluência verbal (NUTTER-UPHAM, et AL 2008). Investigação de fluência verbal em pré-clínicos na AD é, portanto, de importância diagnóstica e preditiva.

Quando o TFVA e o TFVF foram comparados, uma diferença na formação da memória de animais e frutas foi observada entre os indivíduos analisados no presente estudo, uma vez que em todos os grupos melhor desempenho no TFVA foi observado.

Correlação interessante foi observada entre o TFVA e TDR, pois o desempenho dos indivíduos estudados são semelhantes em ambos os testes. Esse resultado é de suma importância no diagnóstico, uma vez que o TFVA e TDR são ferramentas eficazes na identificação de indivíduos com déficit de memória, cognição e disfunção viso-espacial que são alterações características DA. Desta forma, podem contribuir significativamente para um diagnóstico eficaz, além de ser um parâmetro na classificação da gravidade da doença.

Os testes neuropsicológicos são instrumentos que auxiliam o diagnóstico precoce de processos demências. Aqueles utilizados para rastreio cognitivo são caracterizados por serem de fácil aplicação e por necessitarem de pouco tempo de execução. São importantes, uma vez que a maior parte dos casos de demência pode ser identificada em locais de atendimento onde há escassez de tempo e de recursos humanos especializados, tais como os ambientes de assistência primária à saúde (ATALAIA-SILVA, et al 2008).

Alguns estudos indicam que a expressão de TGF- β está alterada na AD (FLANDERS, et al 1995; VAWTER, et al 1996), onde aumento foi encontrado no LCR e soro (CHAO, et al 1994). Outros relatam aumento dessa citocina na deposição das placas senis (WAWTER, et al 1992).

Apesar de relatos anteriores apontarem o TGF- β como uma citocina indicativa de gravidade da DA, no presente estudo, quando os níveis séricos do TGF- β foram avaliados nos indivíduos com maior comprometimento da DA, esta citocina não foi detectada. Os resultados aqui obtidos são sugestivos de que esta citocina pode estar envolvida em uma resposta imunossupressora por desempenhar também a função de anti-inflamatória, entretanto estudos posteriores são necessários e estão em andamento em nosso laboratório.

6. CONCLUSÕES

Em conjunto, os resultados aqui obtidos demonstram que o declínio na performance da fluência verbal pode ser associado com déficits de memória, TDR e agravamento da DA. Demonstram também que um número maior de indivíduos do sexo feminino são acometidos e que existe uma relação direta com o faixa etária. Não foram detectadas alterações nos níveis séricos de TGF- β nos grupos em estudo. Estes dados são úteis para auxiliar na identificação de pessoas com maior comprometimento da DA, como também no desenvolvimento de estratégias para a prevenção e tratamento de doenças neurológicas, melhorando o prognóstico dos idosos acometidos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás-FAPEG pelo apoio financeiro a este projeto e ao Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Federal de Goiás-PIVIC/CNPQ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEGRI. R. R.F, Harris F.P, SERRANO. C, DELAVAL. D.N. Perfis Diferenciais de Perda de Memória entre a Demência Frontotemporal e a do Tipo Alzheimer. **Rev. Psicologia: Reflexão e Crítica**, v. 14, p. 317-324, 2001.

ATALAIA-SILVA. K. C, LOURENÇO. R. A. Tradução, adaptação e validação de construto do Teste do Relógio aplicado entre idosos no Brasil. **Rev Saúde Pública**, v. 42, p. 930-937, 2008.

BOZIKAS, V.P, KOSMIDIS, M.H, KOURTIS. A, GAMVRULA. K, MELISSIDIS. P, TSOLAKI. M, KARAVATOS. A. Clock drawing test in institutionalized patients with schizophrenia compared with Alzheimer's disease patients. **Rev. Schizophrenia Research**, v.59, p.173– 179, 2002.

BOZZOLA, F. G, GORELICK. F.B, FREELS. S. Personality changes in Alzheimer's disease. **Rev. Arch Neurology**, v. 49, p. 297-300, 1992.

CHAN-WEINER. D.A., SULLIVAN. E.V, SHEAR. P.K., FAMA. R, LIM. K.O, YESAVAGE. J.A, TINKLENBERG. J.R., PFFERBAUM. A. Brain structural and cognitive correlates of clock drawing performance in Alzheimer's disease. **Rev. J. Int. Neuropsychol. Soc**, v. 5, p. 502– 509, 1999.

CHAO. C.C, FREY. W.H, ALA. T.A, TOURTELLOTTE. W.W, PETERSON. P.K Transforming growth factor-b in Alzheimer's disease. **Rev. Clin Diagnv Lab Immunol**, v. 1, p. 109–110, 1994.

GUIMARÃES, H. C, RICHARD. L, TEIXEIRA. A.L, GOMES. R.B, CARAMELLI. P. Neurobiology of apathy in Alzheimer's disease. **Rev. Arq Neuropsiquiatr**, v. 66, p. 436-443, 2008.

KATZMAN, R. Alzheimer's disease. **Rev. N Engl J Med**, v. 314, p. 964-973, 1986.

KLEMP. N.D, SIRIMANNE. E, GUNN. A.J, KLEMMPT. M, SINGH. K, WILLIAMS. C, GLUCKMAN. Hypoxia–ischemia induces transforming growth factor-b1 mRNA in the infant rat brain. **Rev. Brain Res** v.13, p. 93–101, 1992.

KOMAHASHI. T, OHMORI. K, NAKATO. T. Epidemiological survey of dementia and depression. **Rev. J Psychiatry Neurol**, v, 48, p.517-526, 1994.

LINDHOLM. D, CASTREN. E, KIEFER. E, ZAFRA. F, THOENEN. H. Transforming growth factor-b1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. **Rev. J Cell Biol**, v.117, p.395–400, 1992.

LIPPA. C.F, SMITH. T.W, FLANDERS. K.C. Transforming growth factor-b: neuronal and glial expression in CNS degenerative diseases. **Rev. Neurodegeneration**, v.35, p.425–432, 1995.

LOGAN. A, FRAUSTCHY. S. A, GONZALEZ. A.M, SPORN. M.B, BAIRD. A. Enhanced expression of transforming growth factor-b1 in the rat brain after a localized cerebral injury. **Rev. Brain Res**, v. 587, p. 216–225, 1992.

LOPES. M.A, BOTTINO. C.M.C. Prevalência de demência em diversas regiões do mundo. Análise dos estudos epidemiológicos de 1994 a 2000. **Rev. Arq Neuropsiquiatr**, v. 60, p. 61-69, 2002.

MANGONE. C. A, ALLEGRI. R. F., Síndromes demenciales. **Rev. Introduccion a la neuropsicologia clinica**, v.4, p. 217-232, 1995.

NUTTER-UPHAM. K. E, SAYKIN. A.J, RABIN. L. A, ROTH. R.M, WISHT. H.A, PAREN, FLASHAMANI. L. A. Verbal fluency performance in amnesic MCI and older adults with cognitive complaints. **Rev. Archives of Clinical Neuropsychology**, v. 23, p. 229–241, 2008.

PARK. J, KO. H.J, PARK. Y.N, JUNG. C. Dementia among the elderly in a Korean community. **Rev. Br J Psychiatry**, v. 164, p. 796-801, 2004.

PERESS. N.S, PERILLO. E. Differential expression of TGF-b1, 2, and 3 isotypes in Alzheimer's disease: a comparative immune histochemical Study with cerebral infarction, aged human, and mouse control brains. **Rev. J Neuro pathol Exp Neurol**, v. 54, p. 802–811, 1995.

POUZA. S.L, REGLA. J.L, FRANCH. V, PINEDO. L.F. The prevalence of dementia in Girona, **Rev. Neurology**, v.10, p. 189-193, 1995.

RODRIGUES, A.B, YAMASHITA, E.T, CHIAPPETA. ALML. Teste de Fluência Verbal no adulto e no idoso: Verificação da aprendizagem verbal. **Rev. CEFAC**, v.10, p. 443-451, 2008.

SCAZUFCA. M, CERQUEIRA. ATAR, MENEZES. PR, PRINCE. M, VALLADA. HP, MIYAZAKI. MCOS, DOMINGOS. NAM, ANTUNES. EH, MACEDO. GC, ALMEIDA. SA e MATSUDA. CMCB; Investigações epidemiológicas sobre demência nos países em desenvolvimento. **Rev Saúde Pública**, v. 36, p.773-778, 2002.

SHULMAN. K.L. Clock-drawing: is it the ideal cognitive screening test? **Rev. Int J Geriatr Psychiatry**, p. 548-561, 2000.

SMITH, Marília de Arruda Cardoso, Doença de Alzheimer. **Rev Bras Psiquiatria Genética**, vol. 21, p. 4-7, 1999.

SPREEN. O, STRAUS. E. A compendium of neuropsychological tests. Administration, norms, and commentary. **J Neuro pathol Exp Neurol**, v. 86, p. 136–141, 1998.

VAWTER. M.P, DILLON-CARTER. O, TOURTELLOTTE. W.W, CARVEY. P, FREED. W.J. TGF- β 1 and TGF- β 2 concentrations are elevated in Parkinson's disease in ventricular cerebro spinal fluid. **Rev. Exp Neurol**, v.142, p. 313–322, 1992.