

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras

Detecção de elementos diagnósticos neuropatológicos da Doença de
Alzheimer pela lectina
KM⁺ em tecido nervoso obtido no Banco de Encéfalos Humanos do Grupo
Brasileiro de Estudos
em Envelhecimento Cerebral e em pacientes com Doença de Alzheimer,
diagnóstico definitivo.

Ribeirão Preto
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras

Detecção de elementos diagnósticos neuropatológicos da Doença de
Alzheimer pela lectina
KM⁺ em tecido nervoso obtido no Banco de Encéfalos Humanos do Grupo
Brasileiro de Estudos
em Envelhecimento Cerebral e em pacientes com Doença de Alzheimer,
diagnóstico definitivo.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia
Ciências e Letras da Universidade de São Paulo
(FFCLRPUSP) para a obtenção do título de Doutor em
Psicobiologia.

Aluna: **Alina Ozório de Oliveira**

Orientador: **Prof. Dr. Antonio Roberto Martins**

Ribeirão Preto

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Alina Ozório

Detecção de elementos diagnósticos neuropatológicos da Doença de Alzheimer pela lectina KM⁺ em tecido nervoso obtido no Banco de Encéfalos Humanos do Grupo Brasileiro de Estudos em Envelhecimento Cerebral e em pacientes com Doença de Alzheimer, diagnóstico definitivo.

Ribeirão Preto, 2008.

94 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Martins, Antonio Roberto

1. Doença de Alzheimer. 2. glicoconjugados. 3.lectina KM⁺.

*Dedico esta tese aos pacientes e seus familiares
por tornarem esse trabalho possível. Muito obrigada.*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Roberto Martins, desejo manifestar o meu reconhecimento pelo apoio e crítica exigente que sempre demonstrou, os quais foram determinantes para minha formação.

Aos membros da banca examinadora por ter aceitado o convite em participar deste trabalho.

À Renata, secretária do departamento de psicobiologia, pelo auxílio na parte burocrática.

Às funcionárias da FMRPUSP Vani Maria Alves Correa e Diva Amábile Montanha de Souza pelo apoio na parte técnica.

Ao meu marido Reinaldo e minha filha Sofia pelo amor incondicional, pela paciência e pela compreensão. Amo muito vocês.

À minha mãe só tenho uma palavra “Obrigada”. Amo você.

Ao meu pai e meu irmão o meu agradecimento pelo constante apoio.

A minha avó Sarah e meu avô Lauro (*in memorium*) pelas instruções e ensinamentos que vou levar por toda minha vida. Vou amá-los para sempre.

A todos meus tios, tias e primos por ter me ensinando o valor da palavra “Família”.

À minha nova família (Sgotti) pelo carinho e compreensão em todas as turbulências da vida.

Aos meus colegas de laboratório Ana Luísa, Carolina, Elizabete, Liliane e Thaís pelos seus comentários e sugestões, que muito contribuíram para o meu trabalho.

Aos meus amigos, que tenho certeza “são para sempre” Ana, Bete, Carol, César, Lili, Fabíola, Roberta Costa, Sandy e Vani pela amizade sincera e gostosa que surgiu em um curto período de tempo.

A CAPES, pelo apoio ao projeto, concedendo uma bolsa de doutorado.

”Não há escola que se iguale a um lar descente,
nem professores que se igualem a pais virtuosos e honestos.”

Mahatma Ghandi

Índice

Resumo	3
Summary	6
Introdução	
Doença de Alzheimer	8
Diagnóstico da Doença de Alzheimer	12
Lectinas	15
Lectina KM ⁺	17
Objetivos	20
Materiais e Métodos	
1. Purificação da lectina KM ⁺ por cromatografia de afinidade	22
2. Análise eletroforética da homogeneidade de amostras KM ⁺ em gel de poliacrilamida e em condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE)	23
3. Biotinilação da lectina KM ⁺	24
4. Análise eletroforética de KM ⁺ biotiniada	24
5. Casuística	25
6. Colorações usadas para análise microscópica	
6.1 Coloração por hematoxilina-eosina	26
6.2 Coloração por prata, método de Bielschowsky	26
6.3 Coloração por vermelho Congo	27
7. Recuperação de Ligantes de KM ⁺	27
8. Histoquímica	28
9. Contagem de placas senis nos córtices cerebrais	29
10. Preparação de amostras de homogeneizado de tecido nervoso	29
11. Eletroforese de amostras de tecido nervoso sob condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE)	30

12. Eletrotransferência	30
13. Detecção de ligantes de KM^+ em membranas de nitrocelulose – “Western Blot”	31
14. Dosagem de proteína	32
Resultados	
1. Purificação e Biotinilação da lectina KM^+	34
2. Efeito do desmascaramento de sítios de ligação de KM^+	37
3. Efeito dos açúcares sobre a interação de KM^+ com secções do córtex cerebral humano	37
4. Expressão de ligantes de KM^+ no córtex cerebral de indivíduos controles	39
5. Expressão de ligantes de KM^+ em estruturas características da Doença de Alzheimer em indivíduos com diferentes CDRs	39
6. Descrição da população	41
7. Densidade das placas	41
8. Detecção de ligantes de KM^+ usando Western Blot	53
Discussão	56
Conclusões	62
Apêndice	64
Referências bibliográficas	86

Lista de Abreviaturas e Siglas

A β - beta-amilóide

BCIP - 5-bromo-4-cloro-3-indofil-fosfato

CERAD – Consórcio para Estabelecer um Registro a Doença de Alzheimer

ConA – Concanavalina A

CRD – domínio globular de reconhecimento de carboidrato

DA – Doença de Alzheimer

CDR- índice de demência clínica

DAB - 3,3'-diaminobenzidina.

EB – Extrato Bruto

NBT - azul de nitro tetrazolio

NINCDS-ADRDA - Instituto Nacional de Doenças Neurológicas de Comunicação e Acidentes Vasculares/ Doença de Alzheimer e Associação com Doenças Relacionadas

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida – Sistema desnaturante

TEMED - N,N,N',N'tetrametilendiamina

AVE - acidente vascular encefálico

EAP - edema agudo do pulmão

TEP - trombo embolia pulmonar

IAM - infarto agudo do miocárdio

BPC – Broncopneumonia

resumo

KM⁺ é uma lectina extraída da semente de jaca (*Artocarpus integrifolia*) que se liga especificamente a D(+) manose. Doença de Alzheimer (DA) é uma demência com desenvolvimento progressivo, caracterizada por mudanças patológicas cerebrais específicas. Mostramos uma comparação entre a detecção de placas senis em cérebros de pacientes com demência possuindo índice de demência clínica (CDR), usando a coloração por prata (Bielschowsky) e histoquímica com a lectina KM⁺.

Cérebros obtidos em autopsia no Banco de Cérebros e Programa de Envelhecimento Cerebral (PEC) da FMUSP foram fixados em formalina e embebidos em parafina. A detecção das estruturas características da doença de Alzheimer foi feita com as seguintes colorações: hematoxilina-eosina, vermelho Congo, prata (método modificado de Bielschowsky) e histoquímica com a lectina KM⁺. A contagem das placas senis foi feita por dois observadores, em duplo cego, de acordo com os critérios do CERAD. O critério do CERAD baseia-se determinação semiquantitativa de placas senis neocorticais, em um campo de 100x em microscopia óptica; a análise semiquantitativa foi feita usando a coloração por prata e histoquímica para KM⁺. A correlação entre os métodos de diagnóstico foi feita usando o método de Spearman. A histoquímica foi feita em secções tratadas em microondas usando biotínil-KM⁺. A detecção foi feita com kit Elite ABC e a marcação usando H₂O₂ e DAB. O *Western Blot* foi feito com homogeneizado cerebral preparados sob condições desnaturantes e redutoras e revelados com azul de nitro tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indofil-fosfato (NBT/BCIP).

Placas senis dos tipos neuríticas e amorfas, neurônios neurofibrilares, neuritos distróficos e depósitos perivasculares que são estruturas características da doença de

Alzheimer foram fortemente marcados com biotínil-KM⁺ nos cérebros de pacientes CDR 0, 0,5, 1 e 3. Células nervosas em cérebros sem placas senis também foram marcadas com biotínil-KM⁺. Houve correlação ($p < 0.01$ ou $p < 0.001$) entre os dois observadores na contagem das placas senis e também nas duas colorações usadas como métodos de diagnósticos, Bielschowsky e histoquímica com a lectina KM⁺.

A lectina KM⁺ permitiu a detecção de todos os marcadores patológicos de DA, em especial de placas senis. Assim, a lectina KM⁺ poderia ser utilizada como método pelo menos complementar para o diagnóstico neuropatológico da Doença de Alzheimer.

SUMMARY

KM⁺ is a D(+) mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia* that binds to several brain glycoconjugates, including laminin. KM⁺ differs from concanavalin A regarding its specificity towards D(+)-mannose-containing polysaccharides.

Brains obtained at autopsy from patients having estimated clinical dementia ratings (CDR) were formalin-fixed, paraffin-embedded. AD diagnosis was done according to CERAD's criteria. Sections of cortex were stained with hematoxylin-eosin, Congo red, and silver by the Bielschowsky method. Adjacent sections were stained for KM⁺ binding sites (BS) after antigen retrieval, using biotynil-KM⁺, and the ABC method, using DAB as chromogen. Semiquantitative assessment of AD was based on the number of neocortical senile plaques per 100x microscopic field, estimated using Bielschowsky and KM⁺ BS. Correlation between these diagnostic methods was tested using the Spearman method.

We compare here the density of senile plaques obtained using the CERAD's approach to that using KM⁺ lectin.

KM⁺ BS were strongly labeled in neuritic and amorphous types of senile plaques, dystrophic neurites and neurofibrillary tangles in brains of CDR 0, 0,5, 1 and 3. The lectin KM⁺ detected all pathologic landmarks of AD. Nerve cells in brains without senile plaques were also stained. There was a good correlation ($p < 0.01$ or $p < 0.001$) between plaque densities estimated using Bielschowsky's and KM⁺ methods.

introdução

Doença de Alzheimer

Os primeiros relatos sobre Doença de Alzheimer (DA) foram apresentados em novembro de 1906 no 37º Encontro de Psiquiatria do Sudoeste da Alemanha em Tübingen por Alois Alzheimer. No trabalho intitulado “Uma doença peculiar do córtex cerebral” Alzheimer relatou as manifestações clínicas e os achados neuropatológicos em Auguste D., uma mulher de 51 anos que fora admitida na Instituição Psiquiátrica de Frankfurt com uma “rara” doença no córtex cerebral. Tal doença causava perda progressiva da memória, alucinação e desorientação seguida por depressão. Os exames patológicos revelaram atrofia e lesões específicas que foram definidas por Alzheimer como “falta de células no córtex cerebral e massa amorfa de filamentos entre as células nervosas” (Dahm, 2006; Zilka and Novak, 2006).

Nos dias de hoje, a doença de Alzheimer, a forma de demência mais comum em adultos, é definida como uma doença neurodegenerativa progressiva, caracterizada por declínio sutil das funções relacionadas à memória, por mudanças na personalidade, por deterioração das funções da linguagem e por eventuais disfunções motoras. Sua causa não é conhecida, e em alguns casos tem uma alta incidência familiar, indicando assim componente genético (Khachaturian, 1985). Possui um estágio pré-clínico relativamente prolongado, seguido por um estágio onde ocorre perda progressiva de funções cognitivas e de conexões sinápticas (Katzman e Kawas *et al.*, 1994).

O aumento da expectativa de vida das populações de países industriais desenvolvidos ocasionou no crescimento do número de pessoas idosas e conseqüentemente das doenças relacionadas a essa faixa etária, sobretudo os síndromes demenciais (SDs); estima-se que 50-60% dos SDs são DA. Mundialmente é estimado um número superior a 24 milhões de pessoas com demência em 2001 e prevê-se 81 milhões com demência em 2040 (Ferri *et al.*, 2005). Estudos populacionais sugerem que

há aproximadamente quatro milhões de pessoas nos Estados Unidos com diagnóstico de DA (Evans *et al.*, 1989). No Brasil, estima-se que de 1 entre 5 indivíduos terão mais de 65 anos em 2030 (Brito-Marques, 2001). A prevalência de demência nesta faixa etária é de 1,4%, aumentando para cerca de 32% acima dos 85 anos de idade (Hofman *et al.*, 1991).

O cérebro de paciente com DA mostra perda neuronal do córtex cerebral, do hipocampo e de alguns núcleos adjacentes (Coleman e Flood, 1987; Hansen *et al.*, 1988). Esta perda neuronal leva a uma atrofia cerebral que é acompanhada por duas lesões histopatológicas, os enovelados neurofibrilares e as placas neuríticas.

Os enovelados neurofibrilares contém polímeros intracelulares insolúveis de proteína tau hiperfosforilada. Estes polímeros interferem na integridade do citoesqueleto (Trojanowsky *et al.*, 1993) induzindo disfunção neuronal e eventualmente a destruição de neurônios e sinapses. Estes enovelados geralmente estão associados a placas de amilóide e são encontrados em células nervosas do córtex cerebral [em corpos celulares, em dendritos apicais e distais (como filamentos do neuropilo) e em neuritos dismórficos], na formação hipocampal e em alguns núcleos subcorticais (Spillantini e Goedert, 1998).

As placas neuríticas são formadas por depósitos fibrilares extracelulares de uma mistura heterogênea de polipeptídeos conhecidos como proteínas centrais de placas amiloidogênicas (APCP), que tem como principal componente a proteína β -amilóide.

A β -amilóide, é constituído por peptídeos insolúveis de 40 a 42 resíduos de aminoácidos e é derivado do processamento proteolítico da proteína precursora de amilóide (PPA) (Hellström-lindahl, 2000) (Figura 1). PPA é definida como molécula de adesão e apresenta sítios ligantes para heparina e laminina no domínio extracelular e parece ser capaz de mediar interação célula-célula ou célula-matriz (Sheetz *et al.*, 1998;

Cotman *et al.*, 1998). O β -amilóide atua como molécula de adesão e em contato com o corpo da célula neuronal desencadeia apoptose. Na DA, β -amilóide agiria como um substrato e também na organização de outros substratos e moléculas de adesão na formação da placa senil. Nestas placas existem ainda moléculas de adesão celular (como glicosaminoglicanos, heparan-sulfato, laminina, N-CAM, e β -amilóide/PPA), fatores neurotróficos (FGF-2), interleucinas e também fatores de crescimento e citocinas em sítios com reações inflamatórias, que podem estimular o crescimento da placa ou iniciar degeneração neuronal (Sheetz *et al.*, 1998; Cotman *et al.*, 1998; Hellström-lindahl, 2000).

Estudos histoquímicos e imunoquímicos têm revelado outras proteínas que se associam aos depósitos amiloidogênicos das placas neuríticas. Estas proteínas incluem proteoglicanas (Snow *et al.*, 1988), molécula de adesão intercelular ICAM-1 (Frohman *et al.*, 1991), acetilcolinesterase (Ulrich *et al.*, 1990), proteases incluindo enzimas lisossomais (Cataldo e Nixon, 1990), tromboplastina (McComb *et al.*, 1991), inibidores de proteases incluindo α_1 -antitripsina (Gollin *et al.*, 1992) e α_1 -antiquimotripsina (Abraham *et al.*, 1988). Componentes abundantes de carboidratos vêm sendo vista no interior da placa amiloidogênica da DA (Szumanska *et al.*, 1987; Snow *et al.*, 1988, 1989, 1990; Behrouz *et al.*, 1989; Mann *et al.*, 1989).

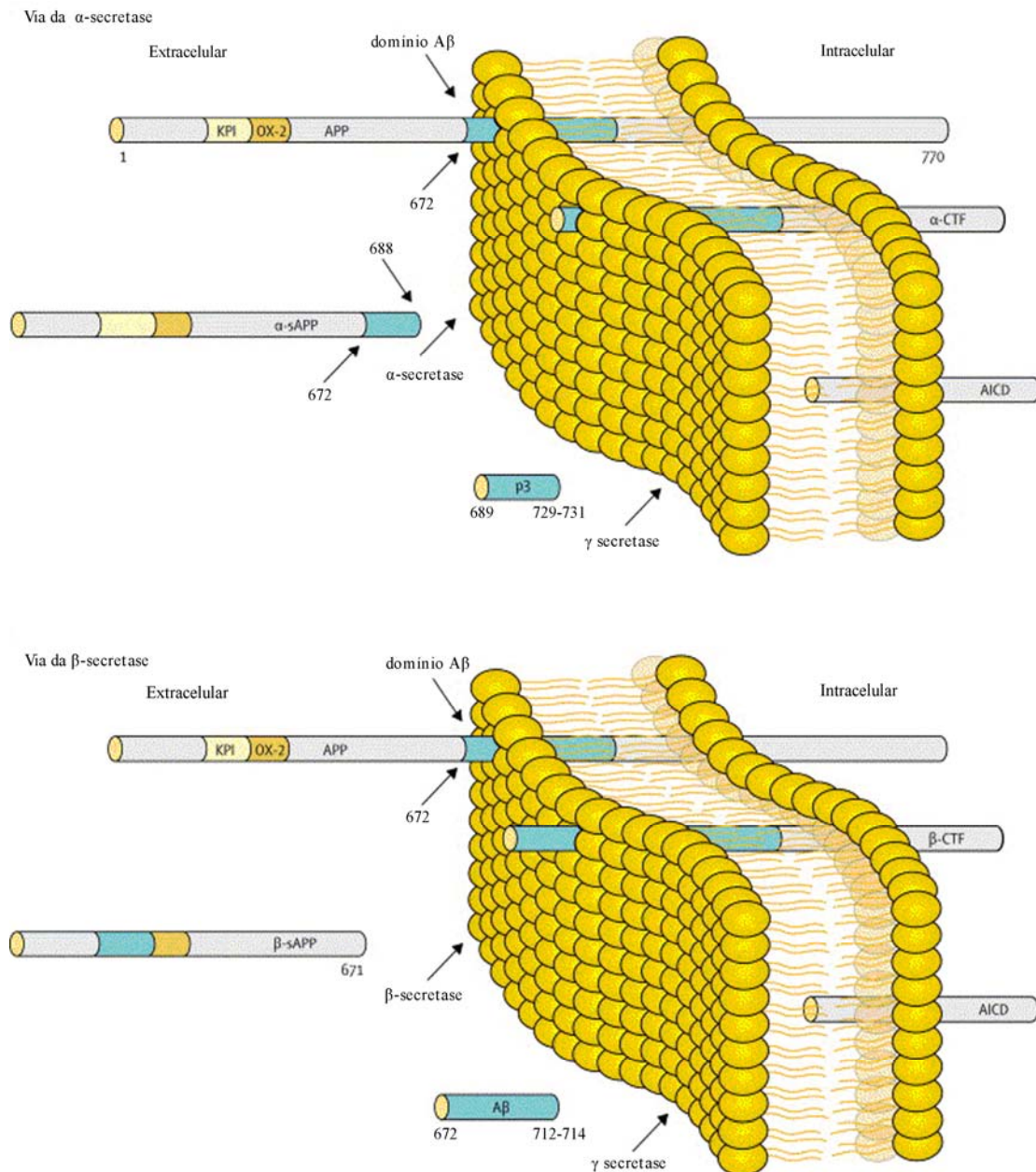


Figura 1- Formação de A β . APP é uma proteína transmembrana com N-terminal extracelular. O domínio A β está parcialmente embebido na membrana plasmática. APP pode ser processada através de duas vias. Na via α -secretase há a clivagem da ligação 688-689, localizada no meio do domínio A β , liberando um fragmento de APP solúvel. O fragmento C-terminal (CTF) é clivado pela γ -secretase liberando um pequeno peptídeo p3. O domínio intracelular (AICD) é então metabolizado no citoplasma. Na via da β -secretase há uma clivagem no início do domínio A β , liberando β sAPP solúvel. O fragmento CTF é clivado pela γ -secretase liberando um complexo A β de 40 ou 42 aminoácidos. O AICD é metabolizado no citoplasma. Figura modificada de Blennow *et al.*, 2006.

Diagnóstico da Doença de Alzheimer

Os critérios clínicos para o diagnóstico de DA incluem exames clínicos e testes neuropsicológicos que foram padronizados pelo Consórcio para Estabelecer um Registro de DA (CERAD). Os testes neuropsicológicos consistem na avaliação das principais manifestações cognitivas, tais como memória, linguagem, práxis, estado intelectual e escala de depressão. A bateria de testes clínicos avalia a história médica, exame neurológico e testes laboratoriais do paciente, que fornecem o mínimo de informação necessária para diagnosticar uma DA provável. Os testes clínicos e cognitivos caracterizam manifestações primárias de DA, discriminando-as de alterações cognitivas associadas à idade do paciente. O critério usado para o diagnóstico clínico de DA pelo CERAD foi adaptado, com pequenas modificações, do Instituto Nacional de Doenças Neurológicas de Comunicação e Acidentes Vasculares/ Doença de Alzheimer e Associação com Doenças Relacionadas (NINCDS-ADRDA), que define os níveis de confiabilidade de diagnóstico da DA como possível, provável e definitivo. O nível possível está presente quando evidências clínicas indicam que a DA é responsável pela demência e características atípicas (por exemplo, disfunção da linguagem severa) ou outros distúrbios capazes de prejudicar a cognição (por exemplo, acidente vascular cerebral) estão presentes. O nível provável diz respeito a distúrbio típico diagnosticado clinicamente, não acompanhado por outras causas reconhecidas de demência. O nível definitivo se refere à doença histologicamente verificada. O critério do NINCDS-ADRDA é bem aceito e tem bom valor para prever diagnóstico histológico de DA. As modificações feitas pelo CERAD no diagnóstico do DA provável não alteram substancialmente o conjunto original de critérios; elas especificam características típicas

da doença, o início gradual e a perda progressiva de memória em período de pelo menos 12 meses (Morris *et al.*, 1989).

Três critérios neuropatológicos são aceitos internacionalmente para o diagnóstico da DA: de Braak (Braak e Braak, 1991), CERAD (Mirra *et al.*, 1991) e a combinação dos dois critérios ou NIA-RIA, Instituto Nacional de Envelhecimento e Instituto de Associação de Alzheimer, Ronald e Nancy Reagan (NIA-RIA, 1997).

O critério de Braak é baseado na distribuição de enovelados neurofibrilares, que tem início na área transentorrinal (estágio I), estende-se para a região entorrinal (estágio II), prolonga-se para o hipocampo (estágio III), aumenta em número (estágio IV), compromete os neocórtices de associação (estágio V) e finalmente compromete o córtex primário (estágio VI). Estes estágios são divididos em fases: entorrinal (I e II), límbica (III e IV) e neocortical (V e VI), correspondentes, respectivamente, à função cognitiva normal, à função cognitiva danificada e à demência (Figura 2). Este critério requer somente o uso de uma coloração para o diagnóstico histológico, o método de Gallyas-Braak, não levando em consideração as informações clínicas do paciente. Possui alta especificidade e moderada sensibilidade e é adequado para investigações em pesquisa.

O CERAD (Mirra *et al.*, 1991) recomenda a análise histológica de, no mínimo, cinco regiões anatômicas: giro frontal médio, giros temporais superior e médio, lobo parietal inferior, hipocampo e córtex entorrinal. Neste protocolo recomenda-se: o uso da coloração hematoxilina-eosina para uso geral; o método de Bielschowsky, uma coloração por prata, para a detecção de placas e enovelados neurofibrilares; a coloração por Tioflavina S, um fluoróforo para visualização de placas e enovelados neurofibrilares, que é aceita como uma alternativa à coloração por prata; e a coloração por vermelho Congo, recomendado para visualizar amilóide cerebral em microscopia de luz polarizada.

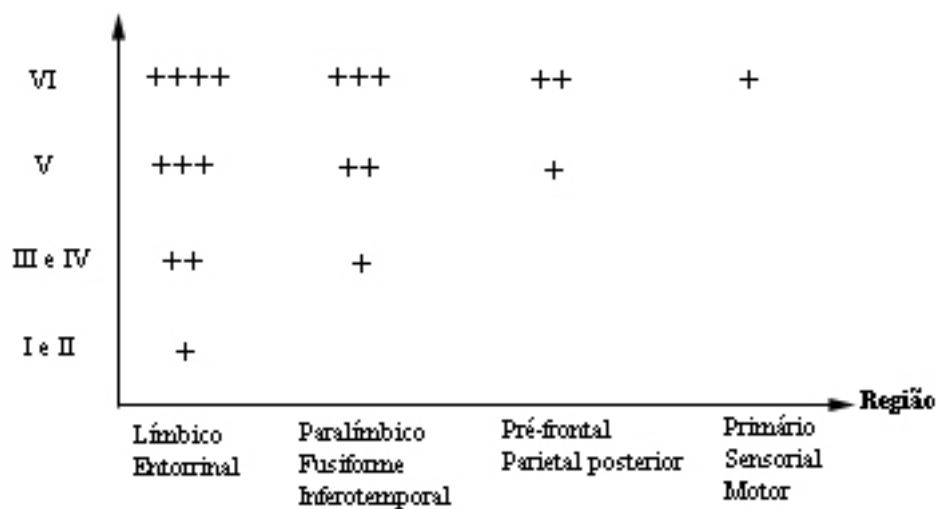


Figura 2- Progressão regional de enovelados neurofibrilares em função do CDR. Um, dois, três e quatro sinais de + se referem à baixa, média, alta e muito alta densidade de *tangles* neurofibrilares, respectivamente. Os estágios I e II (CDR 0) são mudanças relacionadas com a idade; III e IV (CDR 0,5) estão relacionadas a danos cognitivos moderados; estágio V (CDR 1) está relacionado à demência variável, e o estágio VI (CDR 3) a demência. CDR: índice clínica de demência. Figura modificada de Mesulam., 1999.

O uso de outras metodologias, como imuno-histoquímica e histoquímica, pode ser usado como complemento das colorações propostas pelo CERAD.

O diagnóstico neuropatológico padronizado pelo CERAD para avaliação *post-mortem* de pacientes com e sem demência é constituído por três passos:

(1) análise semiquantitativa da frequência de placas senis e enovelados neurofibrilares em áreas do neocórtex de maior densidade de placas. Depósitos de amilóide vascular e placas que contém núcleos de amilóide são também anotados;

(2) o índice de placas relacionado à idade é determinado combinando a idade do paciente no momento do óbito e a medida semi-quantitativa da densidade de placas na região do neocórtex mais severamente afetada;

(3) o *score* placa/idade é então integrado com informações clínicas a respeito da ausência ou presença de demência para avaliar a probabilidade da hipótese do

diagnóstico de DA. O critério para o diagnóstico neuropatológico do CERAD está baseado somente na análise semiquantitativa de placas senis neocorticais do tipo neurítica. Esta análise não requer a especificação do número de placas amorfas, pois alguns neuropatologistas acreditam que as placas amorfas são encontradas mais comumente em indivíduos idosos não dementes, enquanto que as placas neuríticas são estruturas patognomônicas da DA.

O critério do NIA-RIA associa os estágios V/VI de Braak e o nível de diagnóstico neuropatológico C do CERAD com alta probabilidade de DA; os estágios III/IV de Braak e o nível B do CERAD com probabilidade intermediária de DA e estágios I/II de Braak e o nível A do CERAD como baixa probabilidade de diagnóstico de Doença de Alzheimer. Este critério não inclui a história clínica do paciente.

Lectinas

A primeira descrição de uma lectina foi feita há 113 anos por Stillmark (1888, 1889), que estudando a toxicidade de sementes de mamona, *Ricinus communis*, obteve um extrato que provocava aglutinação de células vermelhas do sangue de animais de diferentes espécies (Lis & Sharon., 1986). No decorrer dos últimos 20 anos, foram descritas muitas outras lectinas, havendo crescimento significativo da pesquisa em lectinologia, particularmente no que se refere à compreensão de suas funções biológicas.

As lectinas permaneceram sem definição adequada durante muitos anos, dando margem a que o termo fosse utilizado para descrever substâncias muito diferentes entre si. A definição de lectina mais completa foi formulada por Kocourek & Horejsi citados por Etzler (1985). De acordo com estes autores, lectinas são proteínas não pertencentes ao sistema imunológico, porém capazes de reconhecer sítios específicos em moléculas e

ligar-se de forma reversível a carboidratos, sem alterar a estrutura covalente das ligações glicosídicas dos sítios. Possuem origem vegetal e animal e são reconhecidas pela presença de, no mínimo, um domínio não-catalítico que se liga de forma reversível a um mono- ou oligossacarídeo específico. Sua nomenclatura é originada da denominação científica das espécies em que são purificadas, de acordo com o protocolo de purificação, pela designação dos monossacarídeos aos quais têm especificidade ou ainda pela designação do tecido do qual foram extraídas (Kennedy *et al.*, 1995).

As lectinas ou hemaglutininas podem ser caracterizadas e detectadas por sua habilidade em aglutinar eritrócitos, em certos casos com alta especificidade (Lis & Sharon, 1973), são específicas em suas reações com grupos sanguíneos humanos ABO e MN e subgrupo A1 (Sharon & Lis, 1972). Todos estes efeitos são produzidos pela habilidade de se ligarem a tipos específicos de açúcares na superfície celular (Deshpande & Damodaran, 1990). Além dessas propriedades, as lectinas podem promover estimulação mitogênica de linfócitos e aglutinação de células cancerosas (Lis & Sharon, 1973; Liener, 1981). Embora reconheçam e se liguem a açúcares simples tais como glicose, manose, galactose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina ou fucose, a afinidade é muito maior para com os constituintes de glicoproteínas: ácido siálico e N-acetilgalactosamina contendo cadeias de glicanos, encontrados em animais e seres humanos (Nicolson, 1974; Peumans & Van Damme, 1996).

Dois aspectos da organização das lectinas auxiliam na compreensão do papel que exercem. O primeiro se refere ao fato que a atividade ligante a açúcar é atribuível a uma porção limitada da molécula, correspondendo tipicamente a um domínio globular de reconhecimento de carboidrato (CRD), de menos de 200 aminoácidos. O segundo diz respeito a que os CRDs de muitas lectinas relacionam-se entre si, quanto à sequência de

aminoácidos, o que faz com que as lectinas conhecidas, em sua grande maioria, possam ser reunidas em um número relativamente pequeno de grupos ou famílias (Weis & Drickamer, 1996).

A análise estrutural tridimensional das lectinas conduziu a identificação dos CRDs, que corresponderiam a fendas rasas na superfície da proteína, diferentes dos sítios mais profundos de ligação, que envolvem o açúcar, encontrados em algumas enzimas e proteínas periplasmáticas (Vyas, 1991).

As lectinas estão sendo usadas em reações histoquímicas para localizar carboidratos em vários tecidos e como marcadores específicos de tecidos normais e tumorais. Mudanças no modo de ligação da lectina pode fornecer informação a respeito das características de uma doença ou lesão. Elas também são eficazes na identificação de resíduos de carboidratos em algumas patologias cerebrais, como a DA e Síndrome de Down (Kiatipattanasakul *et al.*, 1998).

Lectina KM⁺

KM⁺ é uma lectina extraída da semente de jaca (*Artocarpus integrifolia*) (ver Rosa *et al.*, 1999) que se liga especificamente a resíduos de D-manose. KM⁺ promove atividade mitótica em células humanas (Miranda-Santos *et al.*, 1991) e induz migração de neutrófilos (Santos-de-Oliveira *et al.*, 1994). A migração de neutrófilos é mediada pela interação simultânea do glicoconjugado com a superfície de leucócitos e com o endotélio vascular (Ganiko *et al.*, 1998; Ganiko *et al.*, 2005) e é potencializada pela interação de KM⁺ e laminina, que é um ligante tecidual de KM⁺. KM⁺ reconhece laminina tipo I em capilares pulmonares (Ganiko *et al.*, 2005), e reconhece uma proteína com massa molecular em torno de 220 kDa no cerebelo de rato, que corresponde à cadeia leve da laminina tipo I (Teixeira *et al.*, 2004).

É um tetrâmero com massa molecular de 52 kDa, formado por associação não covalente de cadeias polipeptídicas de 13 kDa, possuindo um domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) por monômero. KM^+ liga-se de forma específica a monossacarídeos α -D-manose e α -metil-D-manosídeo. Difere da Concanavalina A por ligar-se seletivamente ao trissacarídeo [Man α 1-3]-[Man α 1-6]-Man, ao passo que Concanavalina A liga-se seletivamente a [Man α 1-2]-Man. Sua estrutura primária apresenta 52% de identidade com a sequência de aminoácidos da jacalina, também presente na semente de jaca, sugerindo uma origem evolutiva comum. A jacalina liga-se seletivamente a glicoconjugados que contém resíduos de D-galactose (Bunn-Moreno & Campos Neto, 1985). O modelo molecular de reconhecimento de carboidratos pela KM^+ foi baseado em dados de sua estrutura primária e de sua modelagem molecular por homologia com a estrutura tridimensional da jacalina (Rosa *et al.*, 1999). A especificidade de ligação da KM^+ a glicoconjugados torna-a uma ferramenta potencial para o “screening”, isolamento e caracterização de glicoconjugados.

A especificidade das lectinas com relação a diferentes carboidratos possibilita a sua utilização em pesquisas na área biológica e médica tais como: investigação da superfície de células, caracterização de eritrócitos, caracterização de estádios de desenvolvimento de organismos diversos, purificação de glicoproteínas, morfologia de neurônios e identificação de conexões neurais no sistema nervoso central (Kennedy *et al.*, 1995).

OBJETIVOS

Propomos verificar:

- 1- Se a lectina KM^+ detecta estruturas características da doença de Alzheimer em tecidos corticais de pacientes com CDRs (0, 0.5, 1 e 3),
- 2- Se há correlação na estimativa número de placas senis feita por dois observadores independentes (duplo cego),
- 3- Se a estimativa do número de placas usando o protocolo proposto pelo CERAD, com a coloração de Bielschowsky e com a histoquímica para KM^+ , apresentavam correlação.
- 4- Se há diferenças na detectabilidade de glicoconjugados usando a metodologia de Western Blot entre áreas corticais e em pacientes, que de acordo com o diagnóstico neuropatológico, apresentavam placas senis com relação aos que não tinham placas senis.

Materiais e métodos

1. Purificação da lectina KM⁺ por cromatografia de afinidade

O pó de semente de *Artocarpus Integrifolia* foi suspenso em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4 contendo NaCl 150 mM. Essa suspensão foi incubada durante 1 hora a 4°C em agitação constante, em seguida foi centrifugada a 12.000g (Rotor Ray, cod 5) a 4°C por 10 minutos. O primeiro sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4 contendo NaCl 150 mM, e incubado “overnight” a 4°C com agitação constante. A solução foi centrifugada novamente a 12.000g (Rotor Ray, cod 50) a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado (Extrato Bruto, EB), aliquoteado e estocado a -20°C e posteriormente submetido à cromatografia em coluna de afinidade Agarose-D-galactose e Agarose-D-manose.

Para separar as lectinas jacalina e KM^+ presentes na semente de *Artocarpus integrifolia*, o EB foi aplicado a uma coluna (6,5 x 0,9 cm) de Agarose-D-galactose (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) com a intenção de remover a jacalina. A coluna foi previamente equilibrada em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4 contendo NaCl 150 mM; a fração contendo jacalina foi eluída em solução tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4 contendo NaCl 150 mM e 0,5 M de D(+) Galactose (Sigma). A fração não ligada à resina foi eluída com tampão fosfato de sódio pH 7,4 contendo NaCl 150 mM, denominada fração K, que foi recromatografada diversas vezes para garantir que a mesma estivesse livre de jacalina.

A fração K foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna de Agarose-D-manose. Após a aplicação da amostra a coluna foi lavada com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4 contendo NaCl 150 mM e a fração que não se ligou a coluna foi denominada KM^- . A fração KM^+ ligada ao gel foi eluída com solução tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4 contendo NaCl 150 mM e 0,2 M de D(+) Manose (Sigma).

A absorvância do eluato foi determinada utilizando espectrofotômetro Beckman modelo 25.

A fração KM^+ foi dializada contra água Milli-Q, concentrada e estocada a $-20^{\circ}C$.

2. Análise eletroforética da homogeneidade de amostras KM^+ em gel de poliacrilamida e em condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE)

As amostras de KM^+ foram analisadas eletroforéticamente em gel de poliacrilamida a 12,5% (Laemmli, 1970) na presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% (p/v) em tampão Tris 24,8 mM, glicina 192 mM, pH 8,3 utilizando o sistema de eletroforese vertical Mini V-8.10 Vertical Eletroforesis System (Gibco BRL, Life Technologies, Inc, Gaithersburg, USA). As amostras foram preparadas com adição de tampão de Laemmli, na proporção de 1 μ l de tampão para 4 μ l de amostra. Das amostras de KM^+ , foram analisadas duas frações das quais uma delas foi fervida por 3 min. a $100^{\circ}C$ e a outra fração não foi fervida. A corrida eletroforética foi feita em voltagem constante de 200V (150-200mA) por 45 minutos à temperatura ambiente. Foram usados como controles jacalina e KM^+ homogênea, e como controles de massa molecular foram utilizados kit de marcadores de baixa massa molecular (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) constituído por: fosforilase B (97,4 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa). Os géis foram corados pelo método de Prata (Blum *et al.*, 1987). A análise eletroforética foi realizada para a constatação da homogeneidade das amostras purificadas e para determinação da massa molecular da amostra KM^+ purificada.

3. Biotinilação da lectina KM^+

O procedimento usado para biotinilação descrito pela “Molecular Probes, Inc.”, foi ligeiramente modificado. A amostra de KM^+ (0,5mg) foi adicionada a 110 μ l da solução de bicarbonato de sódio 0,8M, pH 8,3, sob agitação constante. A seguir foi adicionado lentamente à solução da lectina KM^+ 20 μ l de 10mg/ml biotina-XX-SE [éster succimidil do ácido 6-((biotinoila) aminohexanoi) aminohexanóico], sob agitação constante por 1 hora à temperatura ambiente. A solução de biotina-XX-SE foi preparada dissolvendo 6mg biotina-XX-SE em 0,6ml de dimetilsulfoxido (Merck). A solução da biotina foi preparada imediatamente antes do uso em frasco escuro, pois a biotina-XX-SE se decompõe a temperatura ambiente, sob luz natural. A reação da biotina-XX-SE com KM^+ foi interrompida adicionando 440 μ l de etanolamina 2 M, pH 7,5, incubando-se por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação. A seguir os subprodutos da biotinilação foram removidos por cinco ciclos sucessivo de diluição e concentração, diluição com tampão fosfato de sódio 50 mM contendo NaCl 0,15M, pH7,4 para 2ml, cada diluição seguida por concentração até 0,1 ml, utilizando Centricon 3 (2800 G, 4°C). A solução de biotinil- KM^+ foi aliquoteada e estocada a -20°C.

4. Análise eletroforética de KM^+ biotinilada

Foram submetidas à SDS-PAGE amostras de 3 μ g da lectina biotinilada nas mesmas condições descritas no item 1.2. Foi feita a eletroforese de dois géis, sendo que um gel foi corado pelo método de Blum *et al.*, 1987 e o outro gel foi transferido para membrana de nitrocelulose em sistema vertical Mini V-8.10 utilizando tampão Tris 24,8 mM, glicina 192 mM, pH 8,3, contendo metanol 10% (v/v). A eletrotransferência foi feita a 150V, 85-135 mA por 2 horas. A seguir, a membrana foi pré-incubada com tampão de bloqueio [tampão fosfato de sódio 10 mM, pH7,4, contendo NaCl 150 mM,

Tween-20 0,05% (v/v) e BSA 5% (p/v)] por 16 horas a 4°C. As membranas foram incubadas por 2 horas com Kit ABC-fosfatase alcalina (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories) diluída a 1:100 (v/v) em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM. A atividade da fosfatase alcalina foi revelada usando como substratos azul de nitro tetrazolio (NBT) e 5-bromo-4-cloro-3-indofil-fosfato (BCIP) (ambos da Promega). A reação foi interrompida com água Milli-Q.

Como marcadores de migração eletroforética (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) foram utilizados: fosforilase B (97,4 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa).

5. Casuística

Neste trabalho foram utilizados blocos de córtex cerebral humano provenientes do Banco de Encéfalos do Programa de Envelhecimento Cerebral (PEC) da Faculdade de Medicina da USP de acordo com os protocolos aprovados pela Comissão de Ética da FMRP-USP.

As amostras de tecido cerebral obtidas no PEC FMUSP foram provenientes de autópsia de pacientes cujos familiares e/ou cuidadores responderam a questionários padronizados para avaliação neurocomportamental que permitiram estadar os quadros demenciais dos pacientes, como definido pelo Banco de Cérebros e Programa de Envelhecimento Cerebral (PEC) da FMUSP, que realizaram as coletas de tecidos. As amostras foram divididas de acordo com o índice de diagnóstico clínico (CDR) (ver Apêndice I). Foram 17 casos com CDR 1, 20 casos com CDR 0,5 e 18 casos com CDR 3, totalizando cinquenta e cinco (55) casos, mais casos-controle pareados para região

cerebral, faixa etária e sexo que não tenham história de doença neuropsiquiátrica e tenham CDR 0 (17 casos).

Os tecidos foram fixados em formalina 10% (v/v) por cerca de 20 dias, desidratados em uma bateria de concentrações crescentes de etanol (Merck), diafanizados em xilol (Merck) e incluídos em parafina (Merck, Histosec.). Para obter cortes de 8µm de espessura foi utilizado um micrótomo (Leica, modelo RM2065). Os cortes foram coletados em lâminas gelatinizadas.

Para a análise microscópica dos casos foram utilizados três tipos de colorações: hematoxilina-eosina (HE), Bielschowsky e vermelho Congo. A análise das secções foi feita utilizando lupa (Olympus modelo SZH10) e microscópio óptico (Olympus modelo BX60).

6. Colorações usadas para análise microscópica

6.1. Coloração por hematoxilina-eosina

Secções de tecido nervoso com 8µm de espessura foram corados com hematoxilina-eosina pelo método de Harris modificado. Os cortes foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol e montados sob lamínula com Permount (Fisher).

6.2. Coloração por prata, método de Bielschowsky

Secções de 8µm montadas sobre lâminas foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em água destilada. Os cortes foram incubados com nitrato de prata 20% (p/v) a 37 °C por 15 minutos no escuro. Foram lavados com água destilada a 37°C e impregnados em solução de prata amoniacal por 10 minutos a 37°C. Em seguida, foram colocados em uma solução [8 gotas de amônia concentrada, 8 gotas de solução C

(40% formaldeído, 0,5g de ácido cítrico, 2 gotas de ácido nítrico e 100ml de água destilada), de 1 a 5 minutos. As secções a seguir foram lavados com água amoniacal fresca, água destilada, fixadas em tiosulfato de sódio por 2 minutos e lavadas em água destilada com 3 trocas de 3 minutos cada (Mirra *et al.*, 1993)

As secções foram desidratadas em álcool diafanizadas e montadas sob lamínula com Permount (Fisher).

6.3. Coloração por vermelho Congo

Os cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados em água destilada. Posteriormente foram colocados, por uma hora, em solução de vermelho Congo a 0,25% (p/v) e depois diferenciados em solução alcalina [500ml de álcool 80% (v/v) e 20g de cloreto de sódio]. Em seguida foram lavados em água corrente e água destilada e corados com hematoxilina de Harris. Novamente, os cortes foram desidratados rapidamente com 3 banhos de álcool, diafanizados em xilol e montados sob lamínulas com Permount (Fisher).

7. Recuperação da Ligantes de KM^+

Para recuperar ligantes da lectina KM^+ em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina utilizamos a técnica proposta por Martins e colaboradores (1999). Foi utilizado forno de microondas modelo Sharp RB-4A33 com capacidade interna de 34l e com uma frequência de 2,45GHz e potência máxima, 900W.

As lâminas foram colocadas em jarras plásticas de Coplin contendo tampão citrato de sódio 10 mM, pH6,0. Os Coplins foram colocados no microondas durante 20 minutos em potência máxima e deixados esfriar a temperatura ambiente por 30 minutos. Os controles receberam o mesmo tratamento que os tratados.

8. Histoquímica

As secções de tecidos foram hidratadas com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4 contendo 0,9% (p/v) de NaCl, e em seguida foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 30 vol%. A recuperação de ligantes de KM⁺ foi realizada conforme procedimento descrito acima, e após esfriar as secções foram incubadas com tampão Tris-Gly (0,1 M Gly, pH 7,4 ajustado com Tris-base 0,1 M) à temperatura ambiente. A seguir, as secções foram tratadas com tampão de bloqueio [tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo 450 mM de NaCl, 0,3% (v/v) de Triton X-100 e soro albumina bovina 5%] por 4 horas. Em seguida as secções foram lavadas com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo 450 mM de NaCl. O bloqueio da biotina endógena foi feito com solução de avidina-biotina (Biotin Blocking System, Dako). As secções foram então incubadas com 0,18µg/ml de biotilil-KM⁺ diluída em tampão de bloqueio, por uma noite, à temperatura ambiente. Em seguida as secções foram lavadas com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo 450 mM de NaCl. A biotilil-KM⁺ foi detectada usando Kit Elite ABC-peroxidase (Vector) e novamente lavadas com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo 450 mM de NaCl. A detecção de KM⁺ foi feita usando H₂O₂ e diaminobenzidina (DAB) e a reacção foi interrompida com H₂O. A seguir as secções foram desidratadas em alcoóis, diafanizadas com xilol e montadas sob lamínula com Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ).

As secções foram analisadas utilizando microscópio óptico JENAMED 2 (Carl Zeiss) e lupa modelo SZH10 (Olympus) e fotografadas com microscópio óptico, modelo BX60 (Olympus) utilizando óptica Nomarski.

9. Contagem de placas senis nos córtices cerebrais

As lâminas, foram coradas pelo método de Bielschowsky (rotina CERAD; Mirra *et al.*, 1991) e aquelas marcadas com KM^+ (Oliveira, 2000), assim obtidas foram analisadas pelo neuropatologista Luciano Serafini Neder e pela pós-graduanda Alina Ozório de Oliveira onde desconheciam a hipótese diagnóstica do quadro neurológico. As análises foram documentadas em formulário contendo os itens propostos pelo CERAD, sem que um tenha acesso ao laudo do outro (duplo cego). A concordância entre os dois diagnósticos foi avaliada caso a caso.

A correlação entre os métodos diagnósticos foi realizada usando o método de Spearman com o programa SPSS. Os gráficos foram construídos usando o programa Prism (ver 4.01; GraphPad Software).

10. Preparação de amostras de homogeneizado de tecido nervoso

Córtex obtidos de autópsia de pacientes com CDR variáveis (0, 1 e 3) foram homogeneizados em tampão Tris HCl 25 mM, pH 7,4, contendo 0,32 M de sacarose e inibidores de proteases (EDTA 10 mM, Benzamidina 1mM, PMSF 0,3 mM e Aprotinina 1 μ l/ml) na proporção de 1:10 (p/v). A homogeneização foi realizada com pistilo de teflon girando a 1000 rpm, com 10 incursões do pistilo, em banho de gelo. Uma alíquota foi separada para a dosagem de proteínas. Outra amostra foi preparada para SDS-PAGE por adição do tampão de Laemmli (na proporção de 1 μ l de tampão para 4 μ l da amostra). Estas amostras foram agitadas, fervidas por 3 minutos e estocadas em nitrogênio líquido ou submetidas à SDS-PAGE, gradiente linear de 5 a 20%.

11. Eletroforese de amostras de tecido nervoso sob condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE)

O procedimento de eletroforese foi feito de acordo com Laemmli & Favre, 1973. As amostras obtidas, descritas no item 4, foram aplicadas em mini-géis (6,0 cm x 8,0 cm x 0,75 cm), com gel de separação de gradiente linear de poliacrilamida de 5% a 20%, preparado com tampão Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8, TEMED (N,N,N',N'tetrametilenodiamina) 0,125% (v/v), persulfato de amônio 0,065% (p/v) e acrilamida 5% (p/v); o gel de empilhamento foi preparado com concentração de 6% de acrilamida/bis-acrilamida, com tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, contendo TEMED 0,125% (v/v), persulfato de amônio 0,065% (p/v) e acrilamida-bisacrilamida 5% (p/v)

Foram aplicadas em cada poço do gel de empilhamento amostras protéicas do homogeneizado, 30µg por poço, e os padrões de peso molecular foram aplicados nas raias laterais dos géis. O padrão de peso molecular continha as proteínas: miosina V (205 kDa), β-galactosidase de *Escherichia coli* (116 kDa, fosforilase b de músculo de coelho (97,5 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica de eritrócito bovino (29 kDa) e calmodulina (17 kDa) (kit 6H, Sigma).

A corrente elétrica usada no início da corrida eletroforética foi de 10 mA por gel até todas as amostras entrarem no gel de separação; posteriormente a corrente foi aumentada para 20 mA por gel e mantida até o final de corrida eletroforética.

12. Eletrotransferência

A eletrotransferência de proteínas de gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose foi realizada de acordo com o método de Towbin *et al.*, 1979. Após a SDS-PAGE o gel foi lavado com solução tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,3, contendo SDS 0,1% (p/v), glicina 100 mM e etanol 18% (v/v). O “sanduíche” foi montado com

camadas sucessivas de: suporte plástico, esponja, folha de papel de filtro, gel, membrana de nitrocelulose, papel de filtro esponja e suporte plástico. Este “sanduíche” foi colocado em uma cuba para transferência contendo o mesmo tampão acima descrito. As amostras foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose com voltagem constante e igual a 35 volt/gel por 4 horas.

13. Detecção de ligantes de KM^+ em membranas de nitrocelulose – “Western Blot”

Para visualização de bandas de proteínas na membrana de nitrocelulose, estas foram coradas com Ponceau 5% (p/v) diluído em ácido tricloroacético 3% (p/v), por 10 minutos e lavadas com água Milli-Q.

As membranas de nitrocelulose foram lavadas com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4 contendo 0,9% (p/v) de NaCl e 0,3% (p/v) Triton X-100, em seguida as membranas foram tratadas com tampão de bloqueio [tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo 450 mM de NaCl, 0,3% (p/v) de Triton X-100 e soro albumina bovina 5%] por 2,5 horas. O bloqueio da biotina endógena foi feito com solução de avidina-biotina (Biotin Blocking System, Dako) e posteriormente as membranas foram incubadas com 0,018 μ g/ml de biotinil- KM^+ diluída em tampão de bloqueio por 3 horas. Em seguida as membranas foram lavadas com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo 450 mM de NaCl e incubadas com Kit Elite fosfatase alcalina (Vector) e novamente lavadas com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo 450 mM de NaCl. As membranas foram reveladas com NBT/BCIP . O controle negativo foi obtido pela omissão da biotinil- KM^+ .

14. Dosagem de proteína

A determinação de proteínas foi feita usando o método de Lowry *et al.*, 1951, usando soro albumina bovina (BSA) como padrão. A absorvância foi determinada em espectrofotômetro Beckman, modelo 25 com comprimento de onda de 750 nm. O cálculo da massa protéica relativa foi obtido usando regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, com o programa Microsoft Excel 2000.

Resultado

1. Purificação e Biotinilação da lectina KM⁺

A purificação da lectina KM^+ presente no extrato bruto de semente de *Artocarpus integrifolia* foi feita usando colunas de afinidade Agarose-D-galactose e Agarose-D-manose. A jacalina apresenta afinidade pela agarose-D-galactose e KM^+ pela agarose-D-manose. A primeira cromatografia foi feita usando a coluna agarose-D-galactose para remover a lectina jacalina do extrato bruto (Fig. 1A) e posteriormente o eluato não retido na coluna de Agarose-D-galactose foi cromatografado em uma coluna agarose-D-manose para purificar a lectina KM^+ (Fig. 1B).

A fração lectina KM^+ purificada foi analisada em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE) (Fig. 2, pistas 1 e 2). Amostras fervidas continham uma banda única com mobilidade eletroforética correspondente a 13kDa, correspondente a monômero de KM^+ (pista 1). As amostras não fervidas apresentaram bandas com aspectos difusos com massa molecular aparente entre 55 e 80kDa (pista 2). Em nenhuma das amostras fervidas de KM^+ foram detectadas bandas que correspondessem à contaminação com jacalina.

A KM^+ purificada foi biotinizada e submetida à SDS-PAGE. Os géis foram corados pelo método de prata (Blum *et al*, 1987) ou usados para *Western Blot*. Observamos no gel corado por prata que o padrão de migração eletroforética de amostras de Biotinil- KM^+ fervida (Fig. 3A, pista 3) e não fervida (Fig. 3A, pista 4) foi similar ao descrito para a amostra não biotinizada [Fig. 3A, pista 1 (fervida) e 2 (não fervida)]. No *Western Blot* revelado com estreptavidina-fosfatase alcalina e NBT/BCIP as amostras de KM^+ fervida (Fig. 3B, pista 1) e não fervida (Fig. 3B, pista 2) não foram detectadas, enquanto que amostras de biotinil- KM^+ fervida (Fig. 3B, pista 3) e não fervida (Fig. 3B, pista 4) foram detectadas. Esta análise mostra que a lectina KM^+ purificada foi biotinizada e é reconhecida por estreptavidina.

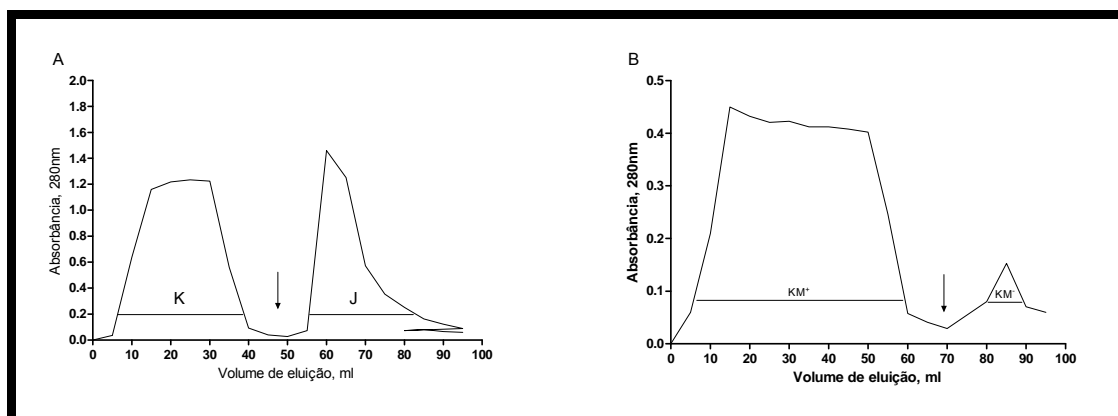


Figura 1- Purificação de KM^+ a partir de extrato bruto da semente de *Artocarpus integrifolia* por cromatografia de afinidade em coluna de Agarose-D-Galactose (A) e de Agarose-D-Manose (B). Amostras de 50ml do extrato bruto foram aplicadas em coluna de Agarose-D-Galactose (0,9cm x 3,5 cm) equilibrada com tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,4, contendo NaCl 150mM, a um fluxo de 4,2ml/h; foi coletada 1 fração por hora a 4°C. A coluna foi lavada com a solução tampão descrita acima, até se obter absorvância próxima a 0,05 UA (Unidade de Absorbância); as frações assim obtidas foram reunidas (Pool K). As frações contendo jacalina foram eluidas em tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,4, contendo NaCl 150mM e D-Galactose 0,5M (Pool J). A fração K foi cromatografada em coluna Agarose-D-Manose (0,9cm x 4,8cm) equilibrada em tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,4, contendo NaCl 150mM, a um fluxo de 4,2ml/h a 4°C, coletando 1 fração por hora. A coluna foi lavada com a solução tampão, até se obter absorvância próxima a 0,05 UA (fração KM^+). A fração contendo KM^+ foi eluída com tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,4, contendo NaCl 150mM e D-Manose 0,2M, coletando 4 frações por hora (Pool KM^+). A eluição foi monitorada pela medida da absorvância no comprimento de onda de 280nm. As setas indicam a eluição das frações contendo jacalina com tampão contendo D-Galactose 0,5M (A) e KM^+ com tampão contendo D-Manose 0,2M (B).

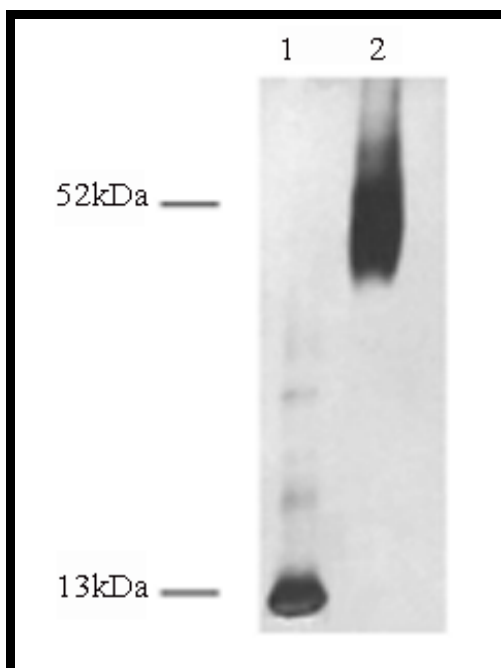


Figura 2- Análise eletroforética de KM^+ purificada por cromatografia de afinidade. Amostras de KM^+ purificada fervida por 3 minutos a $100^{\circ}C$ (pista 1) e não fervida (pista 2) foram analisadas por SDS-PAGE (gel poliacrilamida 12,5%). O gel foi corado pelo método de impregnação por prata. As amostras de KM^+ fervida e não fervida mostraram migrações eletroforéticas correspondentes a massas moleculares de aproximadamente 12kDa e 54kDa respectivamente.

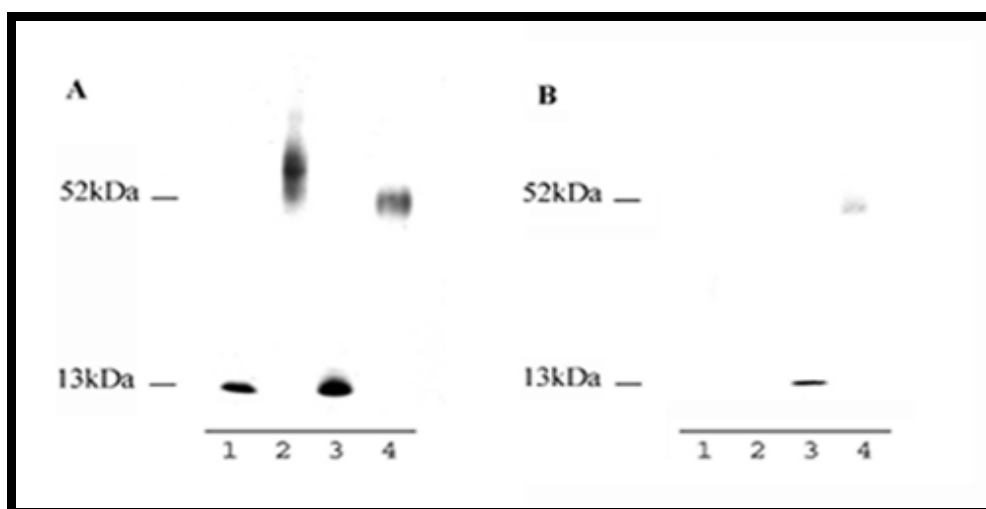


Figura 3- Análise eletroforética da biotilil- KM^+ . Lectina KM^+ e biotilil- KM^+ foram aplicados em gel de poliacrilamida 12,5%, sistema SDS-PAGE. O gel foi corado pelo método de prata (Painel A) ou transferidos para membrana de nitrocelulose (painel B). As membranas foram incubadas com estreptavidina-fosfatase alcalina e NBT/BCIP. Painel A, amostras de KM^+ fervida (pista 1) e não fervida (pista 2), amostras de biotilil- KM^+ fervida (pista 3) e não fervida (pista 4). A amostra de biotilil- KM^+ fervida apresentou uma banda com massa molecular de aproximadamente 13kDa, e a amostra de biotilil- KM^+ não fervida apresentou uma banda com massa molecular de aproximadamente 52kDa. Painel B, amostras de KM^+ e biotilil- KM^+ fervidas (pistas 1 e 3 respectivamente) e não fervida (pistas 2 e 4 respectivamente).

2. Efeito do desmascaramento de sítios de ligação de KM^+

O processamento, fixação e embebimento tissular em parafina geralmente mascaram sítios de ligação e epitopos tissulares (Shi *et al.*, 1991; Hewicker-Trutwein; 1995; Martins *et al.*, 1999). A alternativa que contornou esse problema foi usar a recuperação de ligantes de KM^+ por aquecimento do tecido em forno de microondas com o tampão citrato de sódio 10 mM, pH 6,0 (Oliveira, 2002).

3. Efeito de açúcares sobre a interação de KM^+ com secções de córtex cerebral humano

A análise da especificidade de ligação da biotínil- KM^+ a estruturas corticais foi feita pré-incubando a lectina com várias concentrações de diferentes açúcares.

A intensidade da ligação de biotínil- KM^+ (Fig. 4 A) ao córtex cerebral foi reduzida por D-manose 0,1 M (não mostrada aqui) e abolida quando a concentração de D-manose foi aumentada para 0,4 M (Figs. 4 B). Em contraste, a ligação de biotínil- KM^+ ao tecido cortical não foi reduzida por sua pré-incubação por D-galactose 0,1 M (não documentada) e 0,4 M (Fig. 4 C). Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que a ligação de biotínil- KM^+ a seus sítios tissulares ocorre por interação com resíduos de D-manose.

Em relação à marcação obtida incubando as secções corticais com biotínil- KM^+ apenas (Fig. 5A), a pré-incubação de HRP com biotínil- KM^+ aboliu a marcação (Fig. 5 B). Quando as secções foram incubadas primeiramente com biotínil- KM^+ e em seguida com 5 μ M de HRP (Fig. 5 C) ou primeiramente incubada com HRP 5 μ M e em seguida incubada com biotínil- KM^+ (Fig. 5 D) não houve alteração na intensidade de marcação quando comparada àquela da biotínil- KM^+ isoladamente (Fig. 5 A).

Estes resultados validam o uso do Kit Elite ABC para a detecção de sítios de ligação de biotínil- KM^+ em secções tissulares.

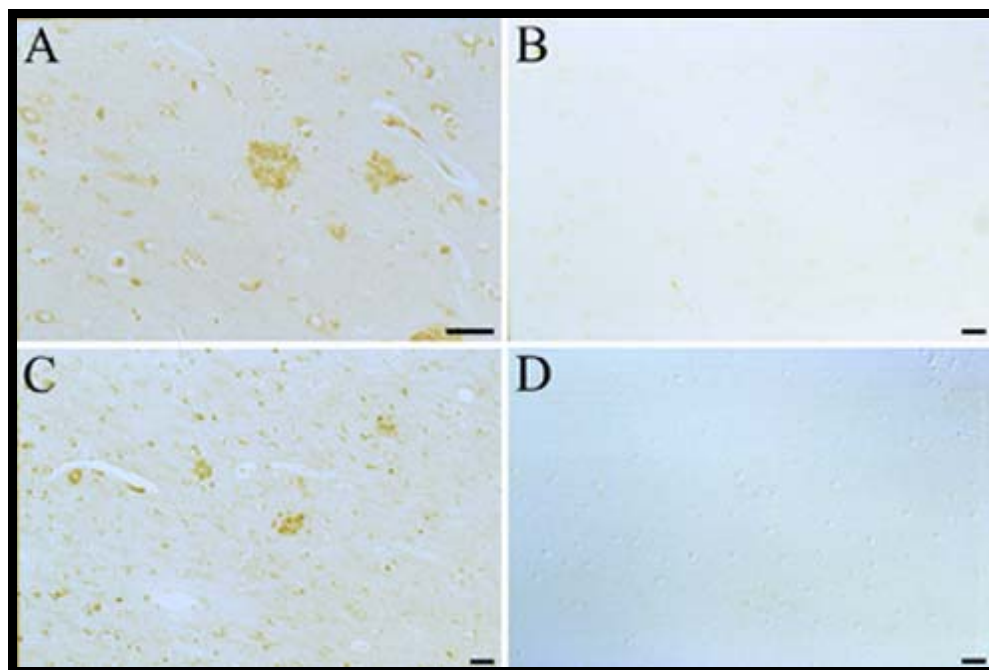


Figura 4- Análise da especificidade de ligação do biotínil-KM⁺ às secções corticais cerebrais. Secções de córtex cerebral humano foram submetidas à histoquímica com biotínil- KM⁺, sem (A) ou com pré-incubação com (B) 0,4M de D-manose e (C) 0,4M de D-galactose. Com 0,4M de D-galactose (C) a ligação de biotínil-KM⁺ ao tecido não foi alterada. (D) Controle obtido por omissão da incubação com biotínil-KM⁺, óptica Nomarski. Barra: 50µm.

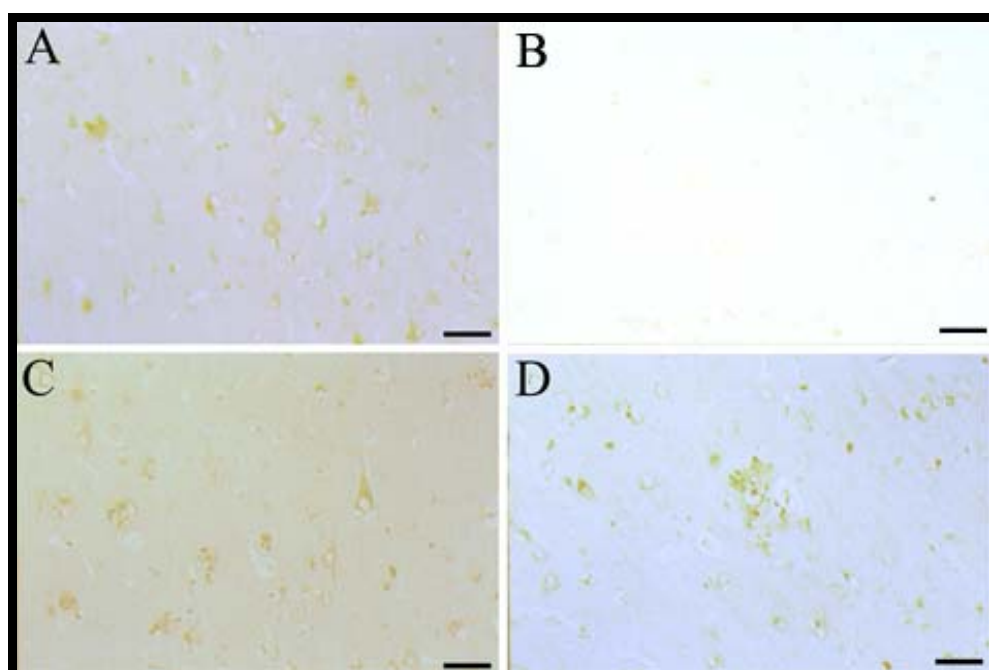


Figura 5- Efeito da peroxidase sobre intensidade de marcação do tecido cortical por biotínil-KM⁺. O efeito peroxidase, que é um componente do kit Elite ABC, foi testado em histoquímica de secções corticais com biotínil-KM⁺ (A), biotínil-KM⁺ pré-incubada com 5µM de HRP (B). A competição entre biotínil-KM⁺ e HRP por sítios tissulares, foi analisada incubando secções primeiramente com biotínil-KM⁺ e em seguida com 5µM de HRP (C) ou primeiramente 5µM de HRP seguida por incubação com biotínil-KM⁺ (D). Barra: 50µm.

4. Expressão de ligantes de KM^+ no córtex cerebral de indivíduos controles.

Histologicamente o córtex cerebral humano neocortex está organizado em seis camadas numeradas de I a VI da superfície externa (pia máter) em direção à substância branca. Tipos diferentes de neurônios são distribuídos através de diferentes camadas no córtex, como exemplo neurônios piramidais são encontrados nas camadas III e V.

Foi observada intensa marcação de ligantes de KM^+ em todas as camadas do córtex cerebral e também na substância branca. Em estruturas celulares foi observada intensa expressão de glicoconjugados ligantes de KM^+ em células não identificadas da camada granular, neurônios da camada II, IV e VI e neurônios piramidais das camadas III e V (Fig. 6).

5. Expressão de ligantes de KM^+ em estruturas características da Doença de Alzheimer em indivíduos com diferentes CDRs.

Colorações propostas pelo Consórcio para Estabelecer um Registro da Doença de Alzheimer (CERAD) para o diagnóstico neuropatológico da DA hematoxilina-eosina, Bielschowsky e Vermelho Congo foram usados em córtex de pacientes com diferentes CDRs com a finalidade de comparar os resultados obtidos com estas colorações com a reação histoquímica da lectina KM^+ . Foi observado detecção de placas senis (Fig. 7), neurônios com enovelados neurofibrilares (Fig. 8), depósitos de amilóide (Fig. 9), neurônios com neuritos distróficos (Fig. 10) e vasos com depósitos de amilóide (Fig. 11). Estas estruturas também foram encontradas em resultados obtidos com a histoquímica com a lectina KM^+ (não mostrado aqui) no córtex de pacientes com Doença de Alzheimer (diagnóstico definitivo).

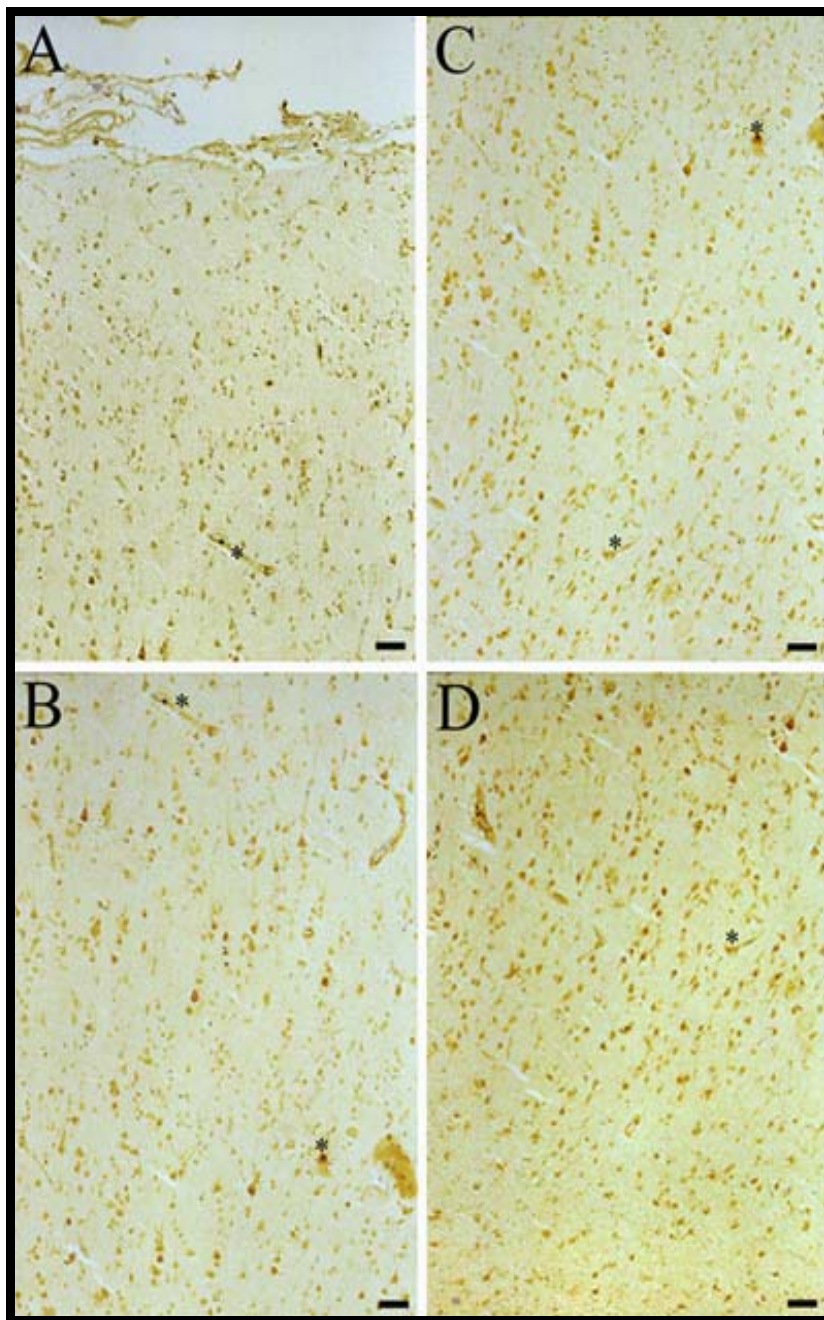


Figura 6- Ligantes de KM^+ no córtex occipital de uma paciente com CDR 1. A, mostra a superfície pial, as camadas I e II; painel B mostra as camadas III e IV; C mostra a camada V e o painel D mostra a camada VI e a substância branca. Os asteriscos indicam as estruturas correspondentes no painel posterior. Barra: 50 μ m.

A eosina é conhecida como uma xantina obtida por halogeneização de fluoresceína. A fluorescência da eosina pode ser vista com microscopia de fluorescência usando filtro para fluoresceína (ver De Rossi *et al.*, 2007) (Fig. 7 E).

6. Descrição da população

Neste trabalho foram usados 72 casos, listados na tabela 1, com proporção de indivíduos do sexo feminino e masculino de 38:34 respectivamente. A média de idade dos indivíduos estudados foi de 78,0 anos (desvio padrão de 9,61 e mediana de 80), sendo que para o sexo feminino foi de 80,8 anos e para o sexo masculino foi de 74,8 anos. Estes resultados, a distribuição de idade e do sexo nos CDRs, foram sumarizados na Fig. 12.

7. Densidade das placas

A análise semiquantitativa das placas senis foi feita por dois observadores, Luciano Serafini Neder e Alina Ozorio de Oliveira, de acordo com o protocolo estabelecido pelo CERAD em um campo óptico de 100x. A densidade das placas foi estimada como esparsa, moderada e frequente (Fig. 13)

Para garantir a detecção fidedigna da densidade das placas foi feita a análise da correlação entre os dois observadores, usando o método de Spearman. Os resultados obtidos mostraram concordância nas duas contagens, o que garantiu o uso da densidade das placas senis como parâmetro para comparação das duas colorações (prata, sugerida pelo CERAD e KM^+) (tabela 2).

A contagem das placas senis foi feita em seis regiões cerebrais (córtex frontal, temporal, parietal, hipocampo, occipital e mesencéfalo) e nos quatro CDRs pra as duas colorações (prata e KM^+) (Figs. 14 a 19). Observou-se correlação entre as duas colorações em todas as regiões e CDRs com exceção do mesencéfalo no CDR 3 onde não houve correlação. (Tabela 3).

Estes resultados indicam que a metodologia de impregnação por prata, método de Bielschowsky, pode ser substituída e/ou complementada pela histoquímica com a lectina KM^+ no diagnóstico neuropatológico da Doença de Alzheimer.

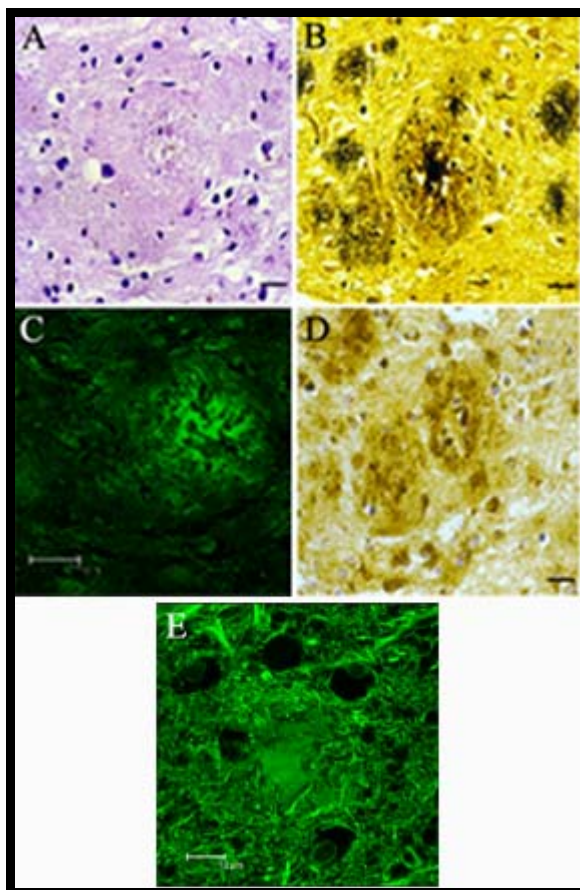


Figura 7– Detecção de placas senis. Placas senis foram detectadas pelas colorações de hematoxilina-eosina (A e E), Bielschowsky (B), vermelho-Congo (C) histoquímica e com biotínil- KM^+ (D). C, microscopia com luz polarizada e E, microscopia de fluorescência para eosina. Barra A, B e D: 50 μ m, C: 30 μ m e E: 10 μ m.

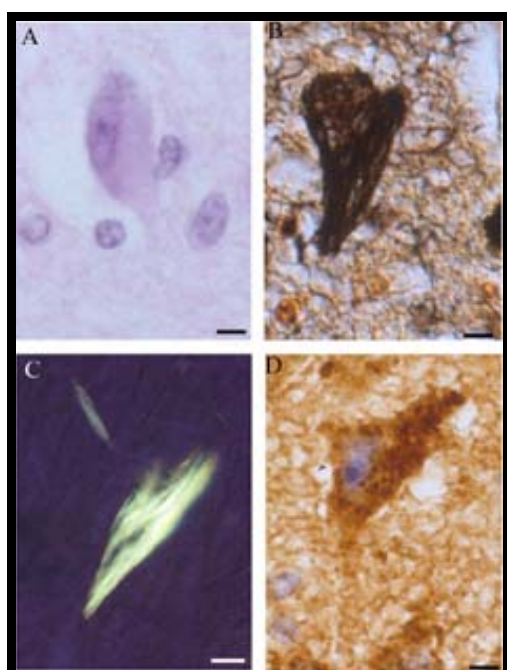


Figura 8– Detecção de enovelados neurofibrilares. A, hematoxilina-eosina; B, Bielschowsky; C, vermelho-Congo; D, histoquímica com KM^+ . B e D, óptica Nomarski e C, microscopia com luz polarizada. Barra: 10 μ m.

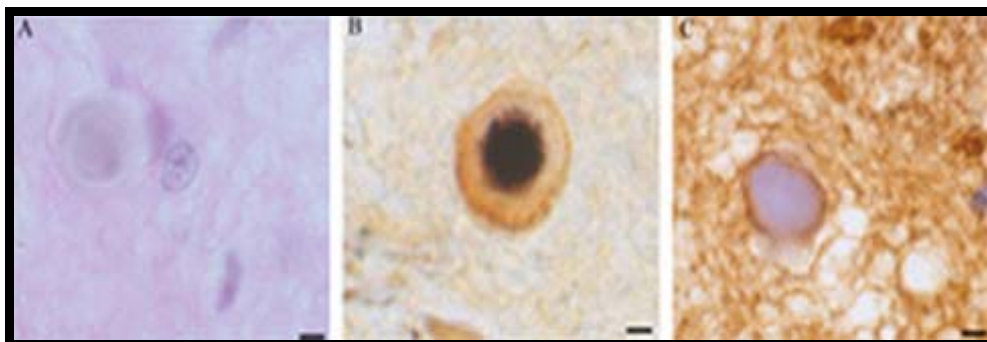


Figura 9– Detecção de corpóra amilácea. As colorações de hematoxilina-eosina (A), impregnação por prata (B), e reação histoquímica com KM^+ (C) foram usadas na detecção de corpóra amilácea. Barra: 10 μ m.

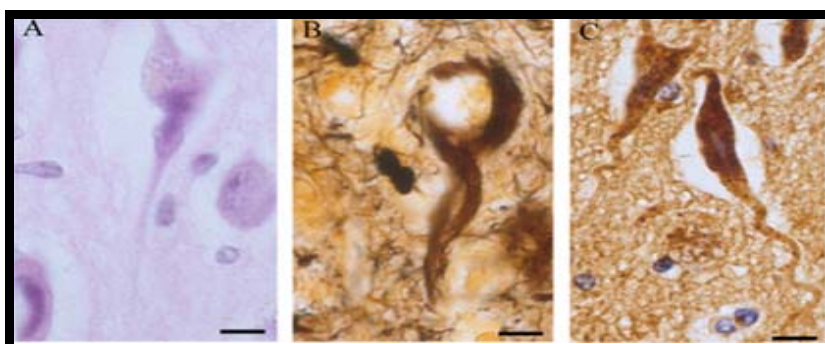


Figura 10– Detecção de neurito distrófico. A, hematoxilina-eosina; B, Bielschowsky; C, histoquímica com biotinil- KM^+ . Barra: 10 μ m.

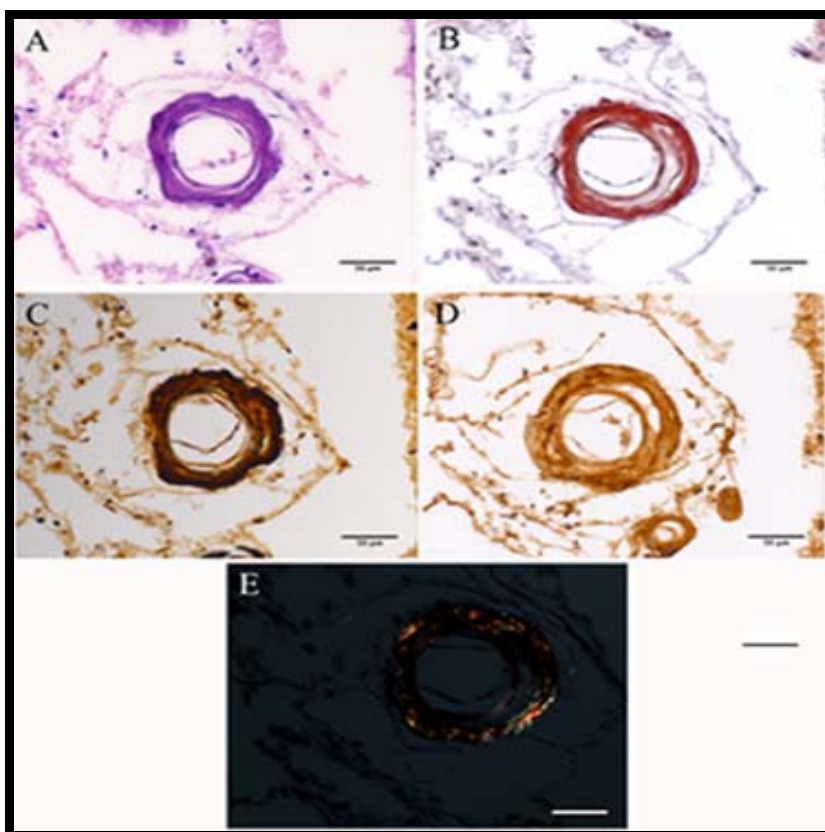


Figura 11- Detecção de vasos com depósitos de amilóide. As colorações hematoxilina-eosina (A), vermelho-Congo (B e E), impregnação por prata (C) e biotinil- KM^+ (D) foram usadas na detecção de vasos com depósitos de amilóide. E, microscopia com luz polarizada. Barra: 50 μ m.

Tabela 1- Casos estudados

Caso#	Idade	Sexo	CDR	Intervalo post moretm	Causa mortis	AVE	Dist. Tireóide	Depressão	Esquizofrenia	D. Parkinson
1	93	F	0	13h45min	Edema Pulmonar	-	-	-	-	-
2	71	F	0	12h45min	CA Gástrico	-	-	-	-	-
3	85	F	0	09h38min	Edema Pulmonar	-	-	-	-	-
4	83	F	0	21h34min	EAP	-	-	-	-	-
5	87	F	0	11h04min	TEP	-	-	-	-	-
6	54	F	0	12h00min	IAM	-	-	-	-	-
7	85	M	0	14h47min	BCP	-	-	-	-	-
8	79	M	0	09h50min	IAM	-	-	-	-	-
9	80	M	0	16h55min	Edema Pulmonar	SIM	-	-	-	-
10	64	M	0	13h40min	IAM	SIM	-	-	-	-
11	81	F	0	11h55min	Edema Pulmonar	-	-	SIM	-	-
12	80	M	0	#	-	-	-	-	-	-
13	77	M	0	06h30min	IAM	-	-	-	-	SIM
14	89	F	0	13h15min	Choque Hipovolêmico	-	-	-	-	-
15	55	M	0	10h53min	IAM	-	-	-	-	-
16	84	M	0	14h10min	Edema Pulmonar	-	-	-	-	-
17	82	F	0	12h40min	Edema Pulmonar	-	-	-	-	-
18	85	F	1	30h45min	IAM	-	-	-	-	-
19	79	M	1	17h56min	Cardiopatia Isquêmica	SIM	-	-	-	-
20	80	M	1	17h50min	IAM	-	-	-	-	-
21	64	F	1	12h55min	Neoplasia Maligna Laringea	-	-	-	-	-
22	81	M	1	17h45min	Edema Pulmonar	-	-	-	-	-
23	80	M	1	16h30min	TEP	-	-	-	-	SIM
24	77	F	1	12h40min	BCP	SIM	-	-	-	-
25	89	M	1	18h20min	-	-	-	-	-	-
26	55	F	1	11h13min	Dissecção de Aorta Ascendente	-	-	-	-	-
27	84	M	1	14h30min	Broncopneumonia	SIM	-	-	-	-
28	82	F	1	13h14min	EAP	SIM	-	-	-	-
29	85	F	1	10h50min	IAM	-	-	-	-	-
30	79	F	1	10h06min	Cardiopatia Isquêmica	-	-	-	-	-
31	80	M	1	18h55min	Cardiopatia Isquêmica	-	-	-	SIM	-
32	64	M	1	17h00min	Edema Pulmonar	-	-	-	-	-
33	81	F	1	13h50min	EAP	-	SIM	-	-	-
34	80	M	1	15h30min	EAP	-	SIM	-	-	-
35	77	F	3	#	-	-	-	-	-	-
36	83	F	3	12h03min	BCP	-	-	-	-	-
37	81	F	3	18h30min	TEP	-	-	-	-	-
38	81	F	3	17h15min	Edema Pulmonar	-	-	-	-	-
39	87	F	3	14h20min	IAM	-	SIM	-	-	-
40	68	M	3	12h37min	Edema Pulmonar	-	-	-	-	-
41	78	M	3	18h35min	Septicemia	SIM	-	-	-	-
42	89	F	3	15h20min	BCP	SIM	-	-	-	-
43	82	F	3	08h00min	Edema Pulmonar	-	-	-	-	-
44	74	M	3	14h50min	EAP	-	-	-	-	-
45	62	M	3	11h50min	Edema Cerebral	SIM	-	-	-	-
46	87	F	3	8h50min	BCP extrema	SIM	-	-	-	-
47	86	F	3	16h59min	Pneumonia Lobar	-	-	-	-	SIM
48	78	F	3	12h48min	Insuficiência Respiratória	SIM	-	-	-	SIM
49	89	M	3	14h48min	EAP	-	-	-	-	-
50	74	M	3	14h45min	EAP	SIM	-	-	-	-
51	84	M	3	12h20min	EAP	SIM	-	-	-	-
52	77	M	3	10h57min	BCP	-	-	-	-	-
53	72	F	0,5	13h51min	Edema Pulmonar	-	-	-	-	-
54	88	F	0,5	25h00min	Hemorragia Digestiva	-	-	-	-	-
55	75	F	0,5	11h29min	Colangite Aguda	-	-	-	-	-
56	75	M	0,5	27h50min	Edema Pulmonar	SIM	-	-	-	-
57	72	F	0,5	20h20min	Hemopericárdio	-	-	-	-	SIM
58	77	M	0,5	18h10min	IAM	-	-	-	-	-
59	71	M	0,5	08h40min	Edema Pulmonar	-	-	-	-	-
60	59	M	0,5	11h10min	Pneumonia Lobar Bilateral	-	-	-	-	-
61	84	F	0,5	09h40min	Tamponamento Cardíaco	-	-	-	-	-
62	67	F	0,5	14h12min	Cirrose Hepática	-	-	-	-	-
63	67	F	0,5	13h50min	IAM	-	SIM	-	-	-
64	69	M	0,5	24h15min	BCP	SIM	-	-	-	-
65	80	M	0,5	12h25min	Anemia Aguda	-	-	-	-	-
66	96	F	0,5	16h55min	Cardiopatia Isquêmica	SIM	-	-	-	-
67	77	M	0,5	17h30min	Edema Pulmonar	-	-	-	-	-
68	86	M	0,5	17h50min	BCP	-	-	-	-	-
69	75	F	0,5	16h20min	Edema Pulmonar	-	-	-	-	-
70	72	F	0,5	14h25min	Dano Alveolar Difuso	-	-	-	-	-
71	85	F	0,5	07h40min	TEP Bilateral	-	-	-	-	-
72	61	M	0,5	14h30min	Tamponamento Cardíaco	-	-	-	-	-

Abreviaturas – AVE: acidente vascular encefálico, EAP: edema agudo do pulmão, TEP: trombo embolia pulmonar, IAM: infarto agudo do miocárdio, BCP: Broncopneumonia, # dados não disponíveis.

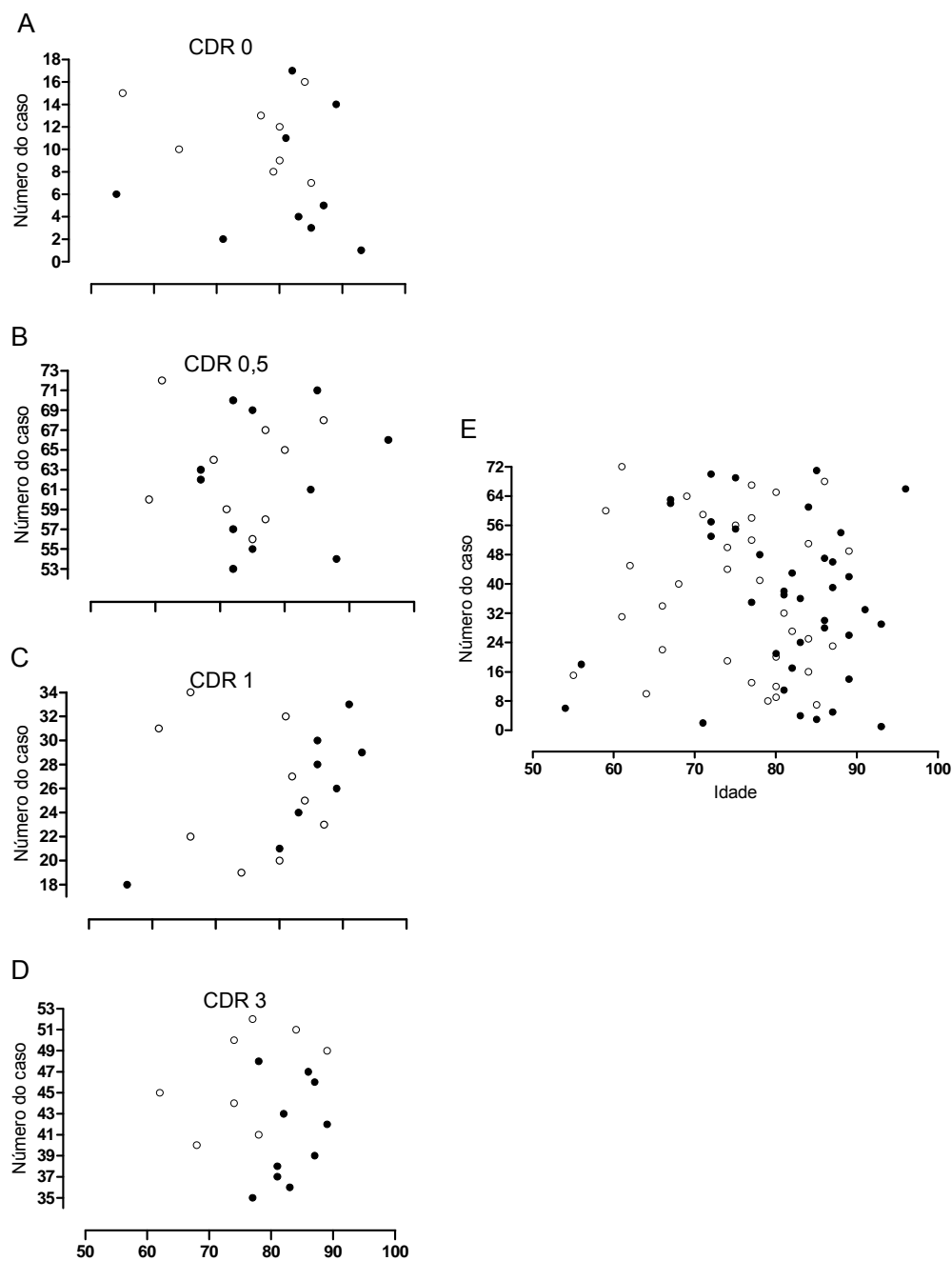


Figura 12- Distribuição de idade e sexo por CDR nos pacientes analisados. A, B, C e D mostram a distribuição etária e por sexo nos CDRs 0, 0,5, 1 e 3 respectivamente. No painel E, está sendo mostrado a sobreposição dos CDRs. círculo cheio – feminino; círculo vazio - masculino.

		Prata	KM ⁺
Frontal	Coeficiente de correlação, (ρ)	0,862**	0,761**
	Nível de significância (p)	< 0,001	< 0,001
Temporal	Coeficiente de correlação, (ρ)	0,663**	0,584**
	Nível de significância(p)	< 0,001	< 0,001
Parietal	Coeficiente de correlação, (ρ)	0,913**	0,804**
	Nível de significância(p)	< 0,001	< 0,001
Hipocampo	Coeficiente de correlação, (ρ)	0,914**	0,873**
	Nível de significância(p)	< 0,001	< 0,001
Occipital	Coeficiente de correlação, (ρ)	0,927**	0,752**
	Nível de significância(p)	< 0,001	< 0,001
Mesencéfalo	Coeficiente de correlação, (ρ)	0,691**	0,153
	Nível de significância(p)	< 0,001	0,243

Tabela 2 – Correlação na análise da densidade das placas pelos dois observadores. **coeficiente de correlação é significante a 0,01.

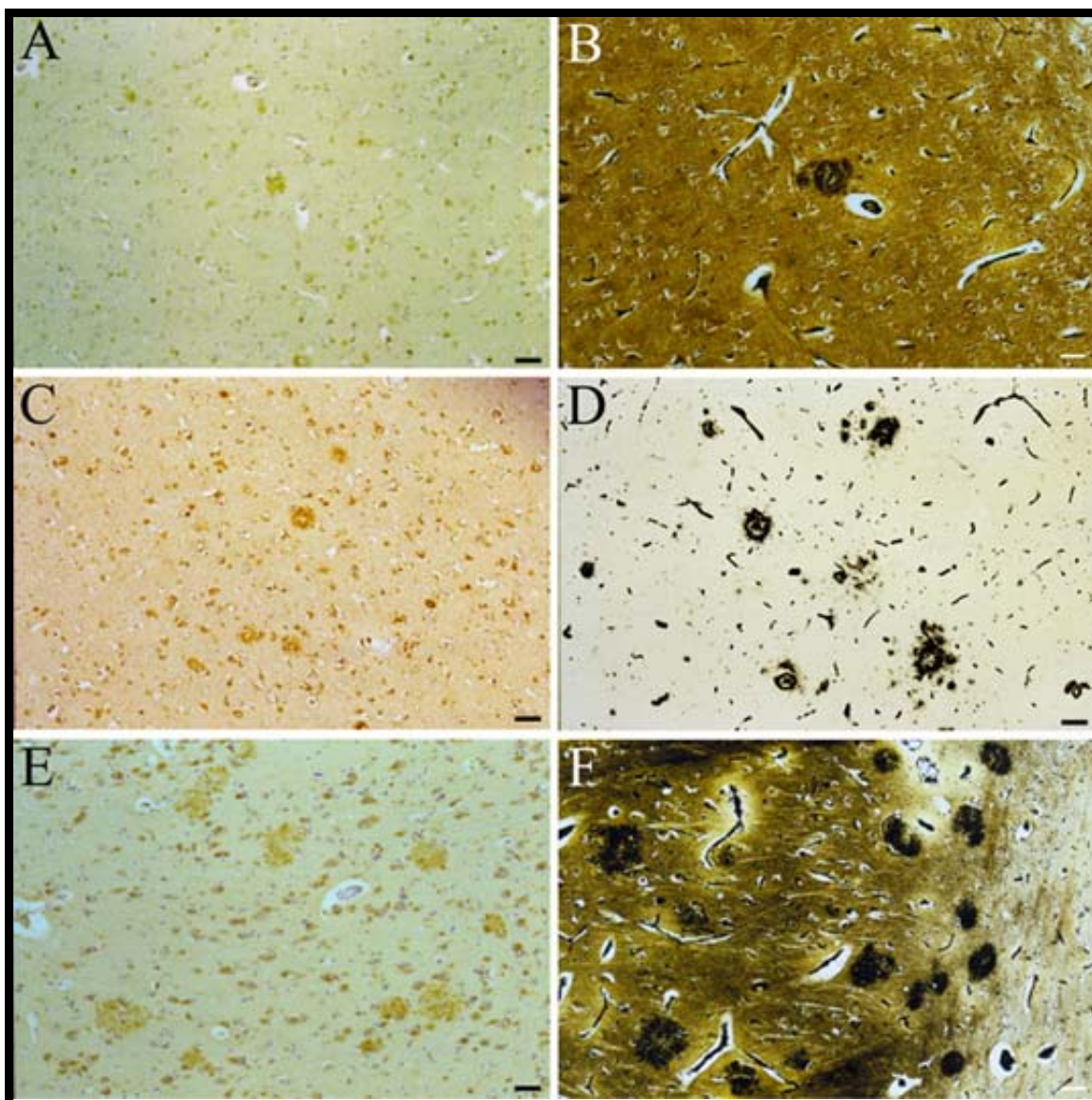


Figura 13- Densidade das placas. Seções de córtex de pacientes com CDRs diversos foram submetidas a reação histoquímica com biotilil-KM⁺ (A, C e E) e impregnação por prata (B, D e F). Os painéis A e B mostram a densidade de placas que foi nomeada como esparsa; C e D, a densidade das placas nomeadas como moderada, e E e F densidade das placas nomeadas como frequentes. Barra: 50 μ m.

Córtex Frontal

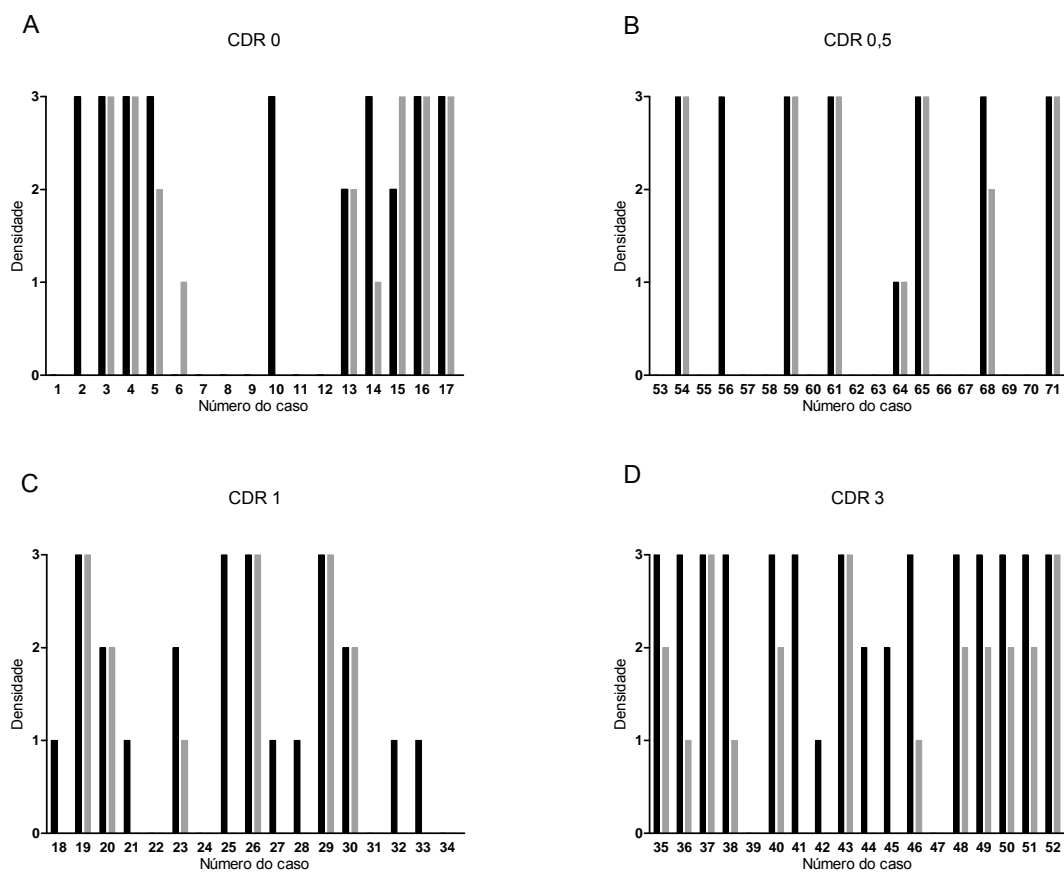


Figura 14 – Densidade das placas senis no córtex Frontal. A, B, C e D mostram a detecção da densidade das placas senis nos CDRs 0, 0,5, 1 e 3 em cada caso estudado. Eixo y os números 1, 2 e 3 equivalem a densidade de placas esparsas, moderadas e frequente, respectivamente. Barra preta - detecção por prata; barra cinza, detecção por KM⁺.

Córtex Temporal

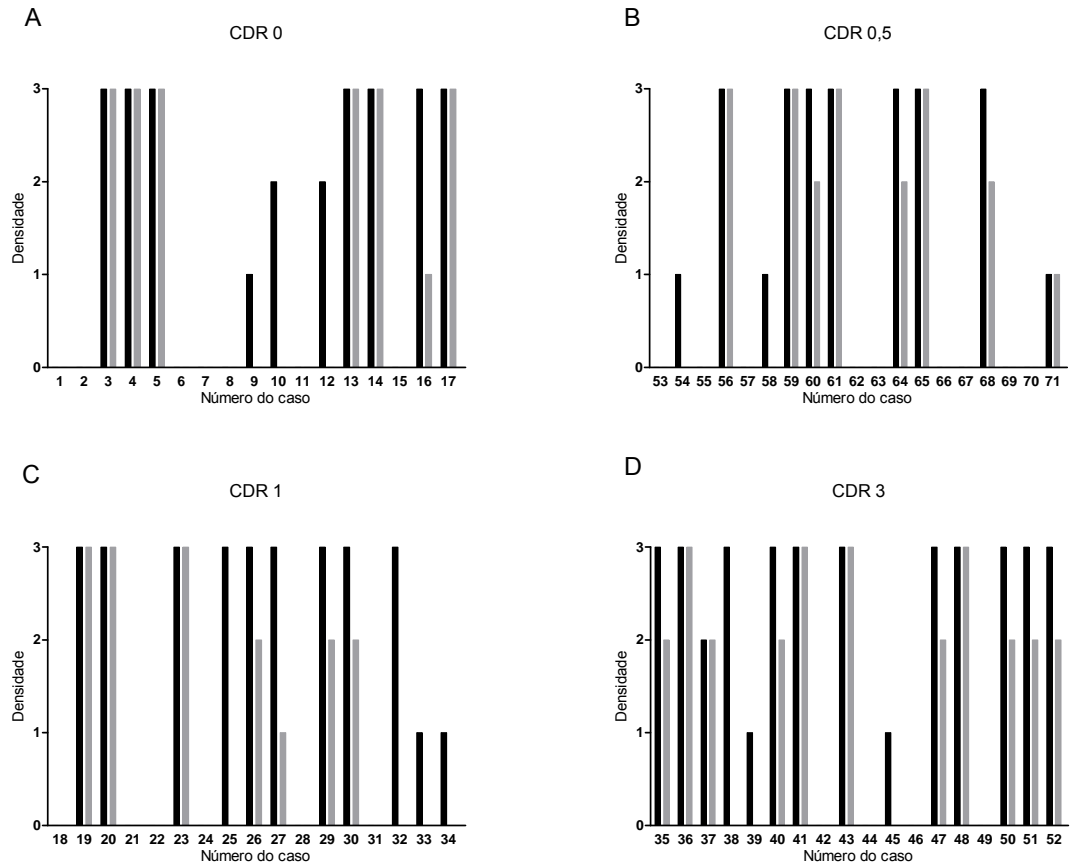


Figura 15 – Densidade das placas senis no córtex Temporal.

Córtex Parietal

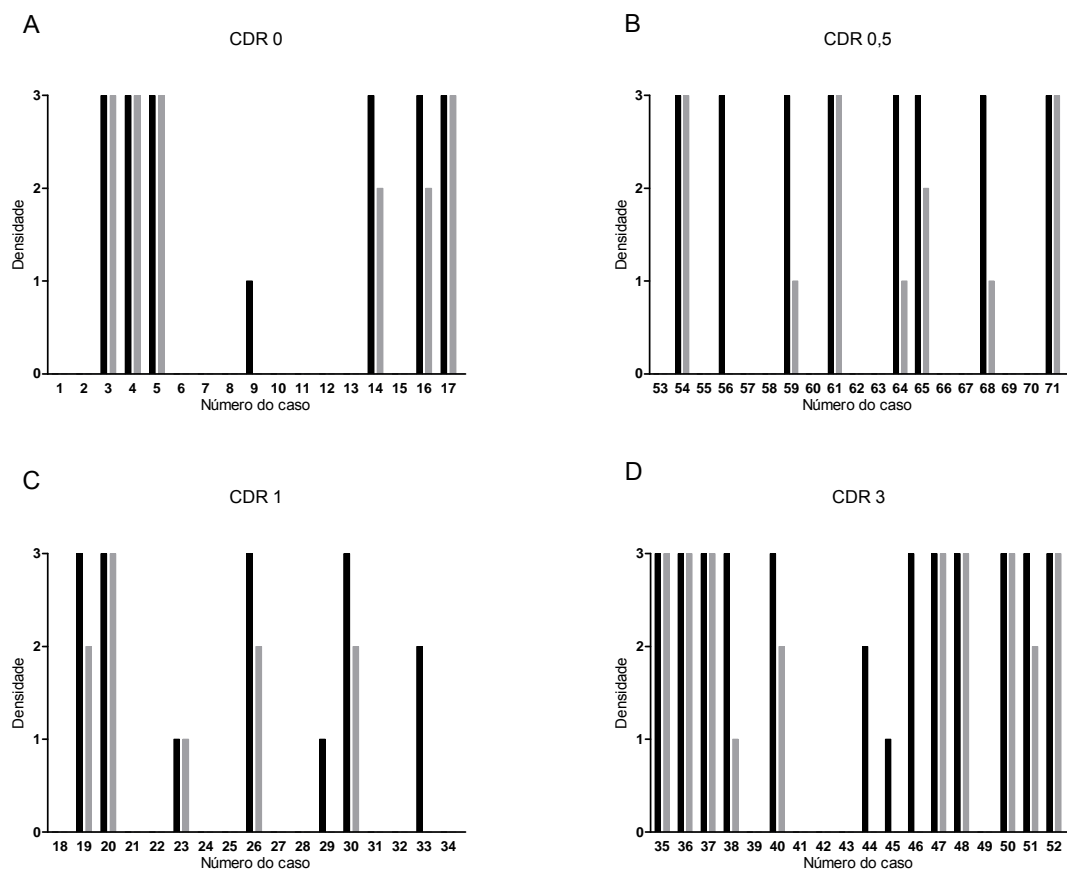


Figura 16 – Densidade das placas senis no córtex Parietal.

Hipocampo

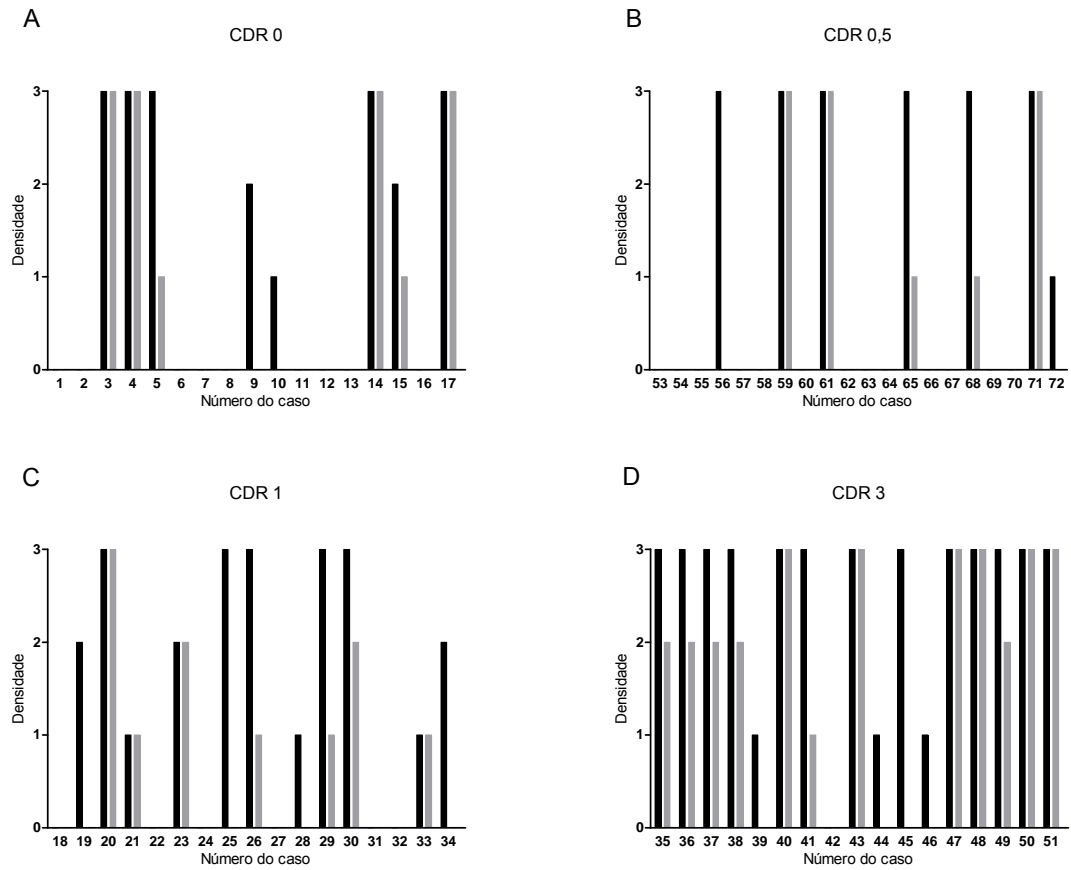


Figura 17 – Densidade das placas senis no Hipocampo.

Córtex Occipital

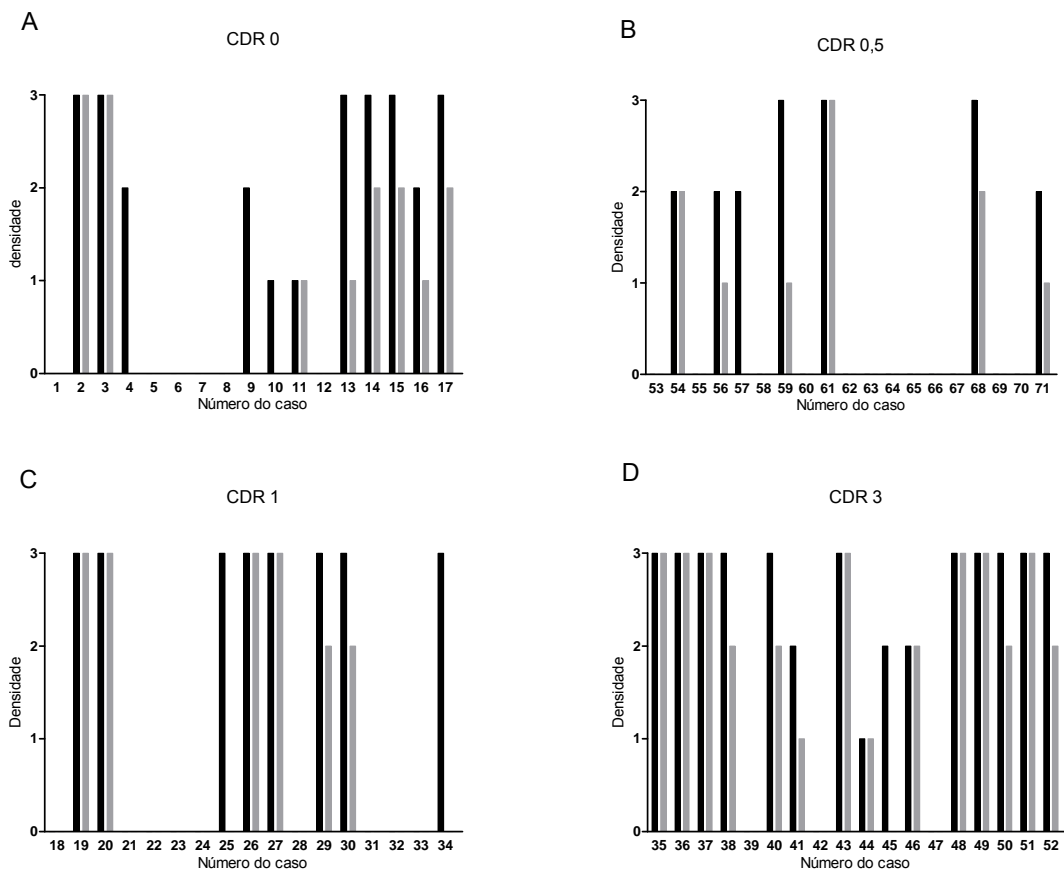


Figura 18 – Densidade das placas senis no córtex Occipital.

Mesencéfalo

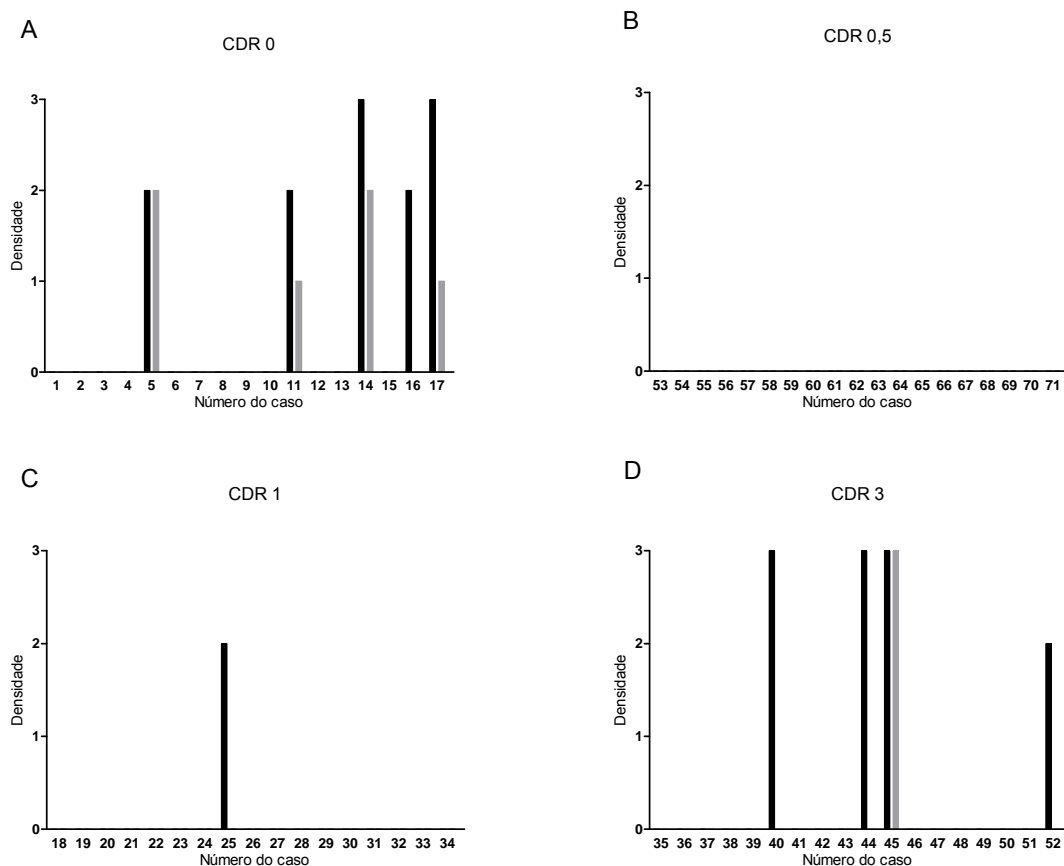


Figura 19 – Densidade das placas senis no Mesencéfalo.

		CDR 0	CDR 0,5	CDR 1	CDR 3
Frontal	Coeficiente de correlação, (ρ)	0,629**	0,867**	0,783**	0,700**
	Nível de significância	0,009	<0,001	0,001	0,002
Temporal	Coeficiente de correlação, (ρ)	0,904**	0,915**	0,719**	0,706**
	Nível de significância	<0,001	<0,001	0,002	0,002
Parietal	Coeficiente de correlação, (ρ)	0,924**	0,863**	0,864**	0,741**
	Nível de significância	<0,001	<0,001	<0,001	0,002
Hipocampo	Coeficiente de correlação, (ρ)	0,904**	0,928**	0,650**	0,708**
	Nível de significância	<0,001	<0,001	0,009	0,001
Occipital	Coeficiente de correlação, (ρ)	0,851**	0,896**	0,702**	0,800**
	Nível de significância	<0,001	<0,001	0,008	<0,001
Mesencéfalo	Coeficiente de correlação, (ρ)	0,871**			0,477
	Nível de significância	<0,001			0,084

Tabela 3 – Correlação entre as duas colorações da densidade das placas nos diferentes CDRs. ** coeficiente de correlação é significativa a 0,01.

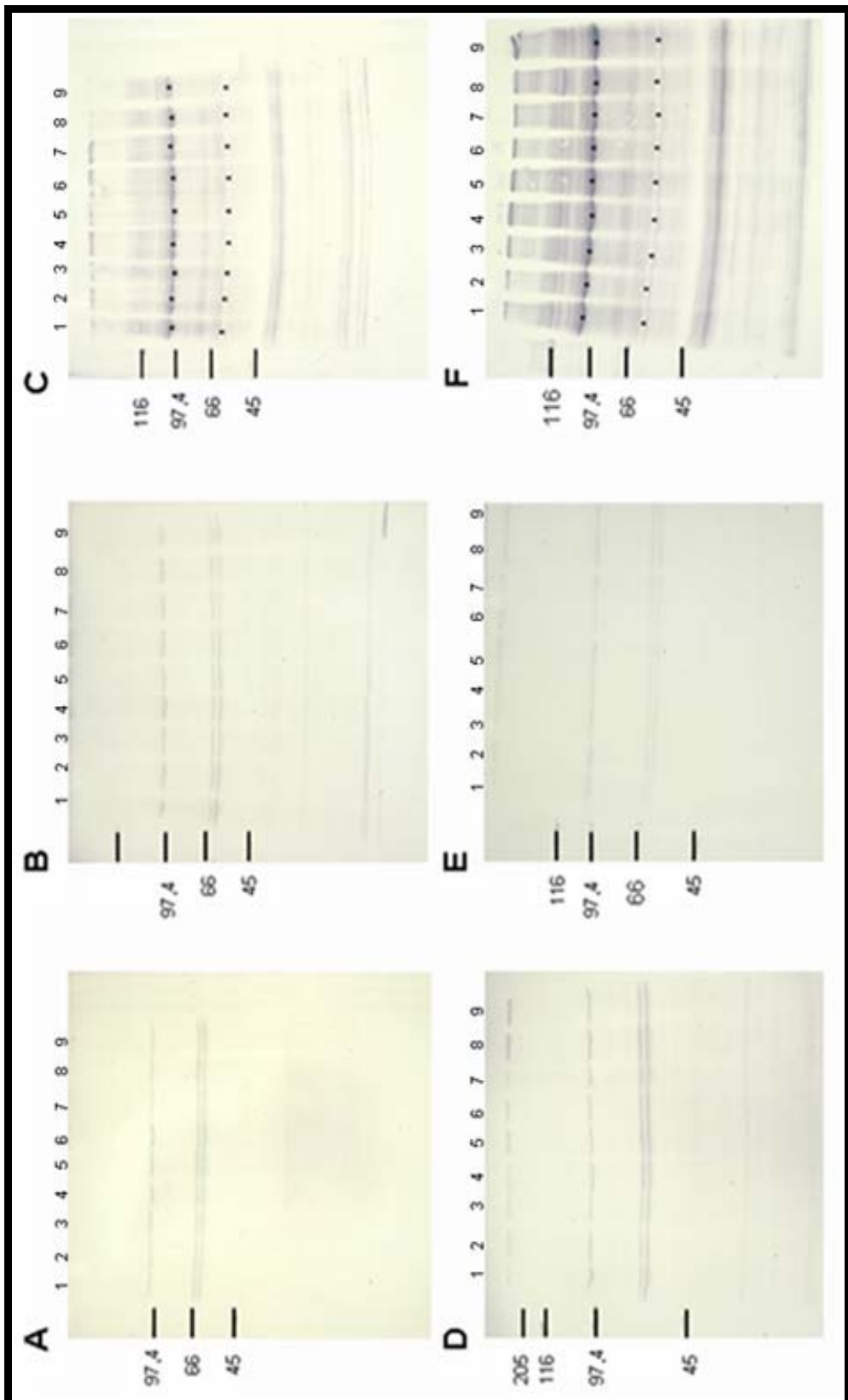
8. Detecção de ligantes de KM^+ usando Western Blot

Usamos Western Blot para detectar a expressão de ligantes de biotilil- KM^+ em amostras de córtex temporal (Fig. 20E) e parietal (Fig. 20C) de necropsias de pacientes com CDRs 0, 0,5 1, 2 e 3. Foi verificada uma acentuada diferença na detectabilidade de glicoconjugados nas regiões analisadas, mostrando uma maior detectabilidade no córtex temporal em relação ao córtex parietal. Foi verificada também a detecção de uma banda com massa molecular em torno de 116kDa em pacientes que não tinham placas senis (pistas 1, 2, 3, 4, 7 e 8) que não foi visualizada em pacientes com placas senis (pistas 5, 6 e 9).

Esses resultados mostram que existe diferença nos glicoconjugados detectados especificamente pela lectina KM^+ entre áreas corticais e também na ausência ou presença de placas senis

A especificidade da ligação da lectina KM^+ a glicoconjugado foi testada com a pré-incubação da biotilil- KM^+ com 0,4M de D-manose (Fig. 20B e E) onde a marcação do glicoconjugado foi abolida. Os painéis A e D representam o controle obtido pela omissão de biotilil- KM^+ em Western Blot e mostra bandas inespecíficas com cerca de 66kDa e 100kDa.

Figura 20– Detecção de ligantes de KM^+ em homogeneizado de necropsias do córtex temporal e parietal de pacientes com diferentes CDRs, usando Western Blot. Amostras de homogeneizado do córtex parietal (A, B e C) e temporal (D, E e F) de necropsia (30 μ g) de pacientes com CDR 0 (pista 1), 0,5 (pista 2 e 3), 1 (pista 4 e 5), 2 (pista 6, 7 e 8) 3 (pista 9), foram submetidos a SDS-PAGE (gradiente de 5 a 20%) em condições desnaturantes e redutoras. Os componentes separados foram eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas biotilil- KM^+ , pré-incubadas ou não com 0,4M de D-Manose. A lectina KM^+ foi detectada usando o Kit Elite fosfatase alcalina e revelada com NBT/BCIP. O controle negativo foi obtido pela omissão da biotilil- KM^+ . Os painéis C e F mostram blots obtidos por incubação com biotilil- KM^+ ; B e E mostram blots obtidos por incubação com biotilil- KM^+ pré-incubada com 0,4M de D-Man. Nos painéis A e D estão sendo mostradas bandas inespecíficas obtidas pela ausência de biotilil- KM^+ . Os asteriscos em C e F indicam bandas inespecíficas.



Discussão

A lectina KM^+ extraída da semente de *Artocarpus integrifolia*, purificada em nosso laboratório apresentou as mesmas propriedades da lectina extraída por Santos-de-Oliveira *et al* (1994), com monômero de massa molecular de 13 kDa, ligante específica dos monossacarídeos α -D-manose, α -D-glicose e α -metil-D-manopiranosídeo e não exibiu afinidade por α -D-galactose.

Inicialmente padronizamos a reação de histoquímica da lectina KM^+ em secções de córtex cerebral humano. O primeiro passo foi recuperar os sítios de ligação da lectina através do tratamento do tecido, expondo sítios de ligação que ficaram mascarados pelo processo de fixação, processamento e embebedimento em parafina.

O tratamento do tecido foi feito usando forno de microondas (Martins *et al.*, 1999), que facilita a ligação da lectina ao seu glicoconjugado específico, com tampão citrato de sódio 10 mM, pH 6,0. Este tratamento mostrou ser o mais eficiente dentre os testados, levando a um aumento significativo na detecção de ligantes para KM^+ .

A especificidade da ligação de KM^+ foi avaliada em estruturas do córtex cerebral humano, por pré-incubação da lectina com monossacarídeo. Esta ligação foi completamente inibida por D-Manose (0,4 M), porém não houve alteração de marcação quando foi utilizada a mesma concentração de D-Galactose. Essas observações indicam que a lectina KM^+ reconhece com alta afinidade glicoconjugados que possuem resíduo D-manose em córtex cerebral humano. Oligossacarídeos que contém resíduos de [Man α 1-3]-[Man α 1-6]-Man se liga intensamente a KM^+ mas não a Con A (Teixeira *et al.*, 2004; Rani *et al.*, 1999). O grau de afinidade de ligação da lectina KM^+ a carboidratos pode ser ordenado de maior para menor intensidade: [Man α 1-3]-[Man α 1-6]-Man \succ [Man α 1-3]-Man \succ GlcNac₂Man₃ \succ Me α Man \succ Man \succ [Man α 1-6]-Man \succ [Man α 1-2]-Man \succ Me α Glc \succ Glc.

A peroxidase (HRP) contida no Kit Elite ABC, é uma glicoproteína que contém resíduos de manose em sua estrutura ($\text{Man}\alpha 1-3[\text{Man}\alpha 1-6]\text{Man}\beta 1-2\text{GlcNAc}$) (Misquith *et al.*, 1994). Para validar nosso ensaio histoquímico usando esse Kit fizemos experimentos de adsorção/competição e deslocamento com HRP e lectina KM^+ . Quando a lectina foi pré-incubada com HRP a marcação do tecido foi abolida, confirmando a afinidade da lectina KM^+ pelos resíduos $[\text{Man}\alpha 1-3]-[\text{Man}\alpha 1-6]-\text{Man}$ contidos na estrutura da peroxidase. Quando incubamos primeiramente lectina KM^+ com o tecido e em seguida HRP ou o contrário, primeiro HRP e depois lectina KM^+ , a marcação do tecido foi a mesma apresentada quando somente a lectina KM^+ foi incubada, mostrando assim que não houve deslocamento da lectina KM^+ pela HRP, validando assim o uso do Kit Elite ABC.

Mudanças pós-transdução possuem um papel crucial no desenvolvimento do sistema nervoso central (Cole and Hart, 2001), determinam as funções de uma proteína e também desempenham funções em doenças cerebrais e neurodegenerações, como é o caso da Doença de Alzheimer (Castegna *et al.*, 2002). Pouco é conhecido sobre as proteínas glicosiladas no cérebro humano; recentemente vem sendo mostrado glicosilação alterada das proteínas tau (Liu *et al.*, 2002), colinesterases (Saez-Valero *et al.*, 2003) e tranferrina (van Rensburg *et al.*, 2002) em pacientes com DA, sugerindo a ocorrência de mudanças aberrantes no processo de glicosilação na Doença de Alzheimer.

Estudos proteômicos em cérebros de indivíduos com DA vêm identificando um grande número de proteínas que mostram alterações pós-transducionais, como exemplo temos a redução da glicosilação da proteína mediadora de resposta da colapsina 2 (CRMP-2) (que está envolvida no crescimento axonal, na regulação da polimerização dos microtúbulos e se associa com os envelados neurofibrilares em DA) no córtex

frontal de pacientes com DA e o aumento da glicosilação de uma chaperona multifuncional (HSC-71) no córtex temporal de pacientes com DA (Kanninen *et al.*, 2004).

Trabalhos anteriores como o de Mann *et al.*, (1988), que por reação histoquímica de lectinas observaram a presença de glicoconjugados em placas senis e neuritos distróficos e estudos preliminares realizados em nosso laboratório que mostraram ligantes de KM^+ no córtex cerebral e hipocampo de pacientes com Doença de Alzheimer em todas as estruturas caracteristicamente afetadas por esta doença, tais como placas neuríticas e amorfas, neuritos distróficos, emaranhados neurofibrilares e depósitos de amilóide perivasculares, nos levaram considerar o uso desta lectina como complemento das colorações propostas pelo CERAD em diferentes estágios (CDR 0,5, 1 e 3) da doença.

Na detecção das estruturas patognomônicas da doença de Alzheimer usamos o protocolo padronizado pelo CERAD, com as colorações de hematoxilina-eosina para uso geral; método de impregnação por prata “Bielschowsky”, para a detecção de placas e enovelados neurofibrilares, e vermelho Congo, para visualizar amilóide cerebral com microscopia de luz polarizada. Complementamos estas técnicas com reação histoquímica usando a lectina KM^+ que reconhece glicoconjugados.

No presente trabalho verificamos que os córtices de pacientes com CDR variáveis expressaram ligantes de KM^+ em todas as estruturas patológicas características da DA tais como placas amorfas e neuríticas, neuritos distróficos, emaranhados neurofibrilares e depósitos de amilóide perivasculares. Mann e colaboradores (1988) com uso de Con A em reação histoquímica detectou somente placas senis em pacientes com DA; Nishimura e colaboradores (2000) e Nishi e colaboradores (2003) mostraram a detecção de placas senis, emaranhados neurofibrilares e corpora amilácea pela lectinas

GSI (*Baneriacea simplicifolia*, específica para a galactose) e ConA (*Canavalina ensiformis*, específica para a manose), contudo a sensibilidade na marcação das placas senis e emaranhados neurofibrilares foi menor, comparando com os resultados aqui apresentados.

A contagem de placas senis foi feita por dois observadores que desconheciam a hipótese diagnóstica do quadro neurológico dos pacientes. As análises foram documentadas em formulário contendo os itens propostos pelo CERAD, sem que uma pessoa tenha acesso ao laudo da outra (duplo cego). A concordância entre as duas estimativas foi avaliada caso a caso, onde foi estatisticamente verificada correlação na contagem entre dos dois observadores e também houve correlação entre as duas colorações analisadas (Bielschowsky e biotinil KM⁺), validando assim o uso da lectina KM⁺ como complemento do método de Bielschowsky no diagnóstico neuropatológico da Doença de Alzheimer.

Os glicoconjugados expressos em pacientes com CDR 0, 0,5 1, 2 e 3 que são ligantes de KM⁺ foram detectados por *Western Blot*. Houve uma diferença na detectabilidade de glicoconjugados entre o córtex temporal e parietal, mostrando uma maior expressão de glicoconjugados com afinidade pela lectina KM⁺ no córtex temporal. Esses resultados indicam que há uma diferença marcante na expressão de glicoconjugados entre córtex, o que pode ser explicado por ser o córtex temporal uma das áreas corticais mais afetadas durante o desenvolvimento da Doença de Alzheimer (Mirra *et al.*, 1991).

Em pacientes que no diagnóstico neuropatológico mostraram ausência de placas senis foi observado à expressão de um e/ou mais glicoconjugados com massa molecular em torno de 116kDa no córtex temporal, que não foi visualizada em córtex temporal que continha placas senis. Estes resultados indicam que há uma diferença de expressão

de glicoconjugados, que continham resíduos manose, em cérebros de pacientes que possuem placas senis em relação com os que não possuem placas.

O conhecimento da composição de placas senil e enovelado neurofibrilar é importante para a elucidação da patogênese da AD. As placas senis são bastante insolúveis, dificultando a análise e o seqüenciamento das proteínas que as compõem (Roher and Khuo, 1999). A presença e natureza de glicoconjugados presentes em placas e enovelados neurofibrilares podem, em princípio, ser determinadas utilizando lectinas como ligantes de afinidade e como sondas. Tanto a estrutura quanto a concentração de glicoconjugados poderiam estar alteradas na doença, o que proporcionaria informação diagnóstica, evolutiva e, eventualmente, prognóstica. Os resultados obtidos neste estudo proporcionam a utilização da lectina KM^+ como sonda e como ligante de afinidade para captura de glicoconjugados permitindo assim analisar a participação de glicoconjugados na patogênese da DA e, eventualmente, desenvolver novos métodos moleculares para análise da evolução e prognóstico da DA.

Conclusões

1. A lectina KM⁺ reconheceu glicoconjugados neuronais, principalmente neurônios piramidais, e em todas as camadas corticais de pacientes que não possuíam história e características neuropatológicas da demência de DA.

2. Pacientes com CDR 0, 0,5, 1 e 3 mostraram marcação da lectina KM⁺ em todas as estruturas características da Doença de Alzheimer (placas senis, enovelados neurofibrilares, corpora amilácea, neuritos distróficos e depósitos de amilóide perivasculares).

3. Houve correlação na contagem entre dos dois observadores e também houve correlação entre as duas colorações analisadas (Bielschowisky e biotiniil KM⁺), o que valida o uso da lectina KM⁺ como método complementar para o diagnóstico neuropatológico da Doença de Alzheimer.

4. KM⁺ detectou diferença na expressão de glicoconjugados, que continham resíduos de manose, em cérebros de pacientes que exibiram placas senis em relação aos que não exibiram placas.

5. A intensidade de marcação de glicoconjugados detectados pela lectina KM⁺ em *Western Blot* foi diferente nos córtices temporal e parietal, indicando que há diferença na expressão de glicoconjugados entre os córtices temporal e parietal.

Apêndice

ENTREVISTA CLÍNICA
NSVO

NPROT

Data da necropsia: ___/___/___

Data Óbito: _____ **H. Óbito:** _____ **H. Necro:** _____ **ΔT Morte:** _____
H Início Entrev: _____

Nome: _____

Idade: ___ **DN:** ___/___/___

Sexo: ___ **Raça:** B N P A **Natural:** ___ **Proced:** ___

Estado Civil: S C V A D

Filhos: _____

Escolaridade: _____ anos (A <4a <8a <12a >15a) Dextro Canhoto

Profissão: do lar doméstica outros _____

Situação: Ainda trabalhava Aposentado _____ a Ap por invalidez _____ a

Outro _____

Informante

Parentesco:

Freq com o pcte: D S

M

Cuidador primário: sim não NA

Escolaridade do informante:

Com quem residia:

Causa do Óbito:

Causas básicas/ achados clínicos:

Como correu o óbito: em casa logradouro público no hospital/ transferência/ APH:

HPMA:

AP: Nega ou desconhece qualquer antecedente patológico

HAS DM DAC ICC (TF_____) Arritmia MP IVP/ OAC IRC

DLP TCE

AVCi // h prévio? Há ___ a – sem seqüela com seqüela: cognitiva

motora _____

AIDS Sífilis AO/ OP Dist Tireóide Bronquite/ Asma

DPOC _____

Down Depressão Esquizofrenia Mania D Parkinson

Neoplasia _____

TTOs anteriores:

Clínicos: _____ Cirúrgicos: _____

Não fazia tto ou acompanhamento médico atualmente Nunca foi ao médico: recusa/ sem acesso

Sd demencial diagnosticada em vida: não sim Há ___ a Etiologia:

História compatível com Síndrome demencial: não sim

Início dos sintomas: lento súbito memória comportamento

outro _____

Curso: lento e progressivo rápido evolução em degraus curso flutuante

Função anterior à morte

Acuidades visual e auditiva preservadas ↓acuidade visual óculos hipoacusia prótese

Dentição preservada falhas dent/ anodontia uso de prótese dentária disfagia

SNG/SNE/ GTS

Sedentário Atividade física: doméstica caminhada trabalho

outra _____ Freq _____/sem

Andava: s/ auxílio c/ auxílio: pessoas parede/ móveis equipamentos auxiliares

Acamado _____ Amputações _____ Lesões cutâneas (úlceras)

Independente Dependente Tomava decisões sozinho Não tomava decisões

Em que situações convivia com muitas pessoas _____

FR: Obesidade (P ___ A ___ IMC ___) _____ Reposição hormonal

Tabagismo: não sim _____ anos/maço parou Etilismo: social alcoolismo

parou _____

Medicações que usava: Não usa: não foi prescrito controle inadequado NREF

NMED _____

ESCORES DAS ESCALAS:

IQCODE: _____ CDR _____ NPI: _____ KATZ: _____ IADL: _____ PARK: _____ SCID
 D: _____ SCID M: _____ ABIPEME: _____

CONSENSO DIAGNÓSTICO

Data: _____ Presentes: _____

Diagnóstico Principal: sem comprometimento cognitivo CDR 0,5 M+ CDR 0,5 MD M+
 CDR 0,5 MD M-

DA _____ DV _____ DCL _____ Outras: _____

Outros Diagnósticos: AVE Depressão DP/ Parkinsonismo Outros: _____

RCV: sem RCV ↑↑↑RCV

Informant questionnaire on cognitive decline in the elderly**(IQCODE – Versão retrospectiva)**

Gostaríamos que você se lembrasse de como era seu amigo ou familiar há 10 anos atrás e compare com o estado em que ele estava há 3 meses antes de sua morte.

Comparada com há 10 anos atrás, como estava a pessoa antes de sua morte:

	Muito melhor (1)	Um pouco melhor (2)	Não muito alterado (3)	Um pouco pior (4)	Muito pior (5)
1. Reconhecer a face das pessoas amigas e da família					
2. Lembrar do nome de parentes e amigos					
3. Lembrar de coisas sobre a família e amigos (aniversários, ocupações, endereços...)					
4. Lembrar de coisas que aconteceram recentemente					
5. Lembrar de conversas que teve nos últimos dias					
6. Esquecia o que queria dizer no meio de uma conversa					
7. lembrar-se de seu próprio endereço e telefone					
8. lembrar (saber) que dia e mês era					
9. Lembrar onde as coisas são usualmente guardadas					

10. Lembrar-se de onde encontrar as coisas que foram colocadas em lugares fora do comum					
11. Adaptar-se a qualquer mudança na sua rotina diária					
12. Saber como funcionam os eletrodomésticos					
13. Aprender a usar novos eletrodomésticos/ utensílios domésticos					
14. Aprender coisas novas em geral					
15. Lembrar-se de coisas que aconteceram em sua vida quando era jovem					
16. Lembrar-se de coisas que aprendeu quando era jovem					
17. Entender o significado de palavras não comuns					
18. Entender o significado do que está escrito em jornais e revistas					
19. Acompanhar uma estória em um livro ou pela TV					
20. Escrever uma carta para um amigo ou com fins de trabalho					
21. Saber sobre eventos históricos importantes do passado					
22. Tomar decisões com problemas do dia a dia					
23. Manusear dinheiro para compras					
24. Lidar com problemas financeiros (ex: pensão, conta bancária)					
25. Lidar com outros problemas matemáticos, por exemplo: saber quanto comprar de comida, saber quanto tempo se passou entre as visitas dos familiares/ amigos.					
26. Usar sua inteligência para entender o que está acontecendo e o motivo pelo qual está acontecendo.					

Total: _____

ESCORE CLÍNICO DE DEMÊNCIA – FOLHA DE REGISTRO

Esta é uma entrevista semi-estruturada. Por favor, faça todas estas perguntas. Faça quaisquer questões adicionais que sejam necessárias para determinar o CDR do sujeito. Por favor, tome nota das informações das perguntas adicionais.

QUESTÕES SOBRE MEMÓRIA PARA O INFORMANTE

1. Ele/ela tem algum problema com sua memória ou seu pensamento (raciocínio)?

SIM NÃO

1a - Se sim, é um problema constante? (em oposição a eventual, raro)

SIM NÃO

2. Ele/ela pode se lembrar de eventos recentes?

Frequentemente Às vezes Raramente

3. Ele/ela pode se lembrar de uma lista curta de itens (compras)?

Frequentemente Às vezes Raramente

4. Houve algum declínio na memória durante o último ano?

SIM NÃO

5. Sua memória está comprometida a tal ponto que teria interferido em suas atividades de vida diária de alguns anos atrás?

(ou atividades pré-aposentadoria) (opinião de outros informantes)

SIM NÃO

6. Ele/ela se esquece completamente de um evento importante

(ex. viagem, festa, casamento em família)

algumas semanas depois do evento?

Frequentemente Às vezes Raramente

7. Ele/ela se esquece de detalhes pertinentes de um evento importante?

Frequentemente Às vezes Raramente

8. Ele/ela se esquece completamente de informações importantes do passado distante (ex. data de nascimento, data de casamento, local do emprego)?

Frequentemente Às vezes Raramente

9. OBS - Questão removida por não ser aplicável.

QUESTÕES SOBRE ORIENTAÇÃO PARA O INFORMANTE

Com que frequência ele/ela sabe o exato:

1. Dia do Mês?

Frequentemente Às vezes Raramente Não sabe

2. Mês?

Frequentemente Às vezes Raramente Não sabe

3. Ano?

Frequentemente Às vezes Raramente Não sabe

4. Dia da semana?

Frequentemente Às vezes Raramente Não sabe

5. Ele/ela tem dificuldades com relações temporais (quando os eventos ocorreram em relação uns com os outros)?

Frequentemente Às vezes Raramente Não sabe

6. Ele/ ela pode achar seu caminho em ruas conhecidas?

Frequentemente Às vezes Raramente Não sabe

7. Com que frequência ele/ela sabe como ir de um lugar para o outro fora de sua vizinhança?

Frequentemente Às vezes Raramente Não sabe

8. Com que frequência ele/ela pode encontrar seu caminho dentro de casa?

Frequentemente Às vezes Raramente Não sabe

QUESTÕES SOBRE JULGAMENTO E RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS PARA O INFORMANTE

1. Em geral, se você tivesse que avaliar as habilidades dele/dela para resolver problemas atualmente, você consideraria que elas são:

- Tão boas quanto sempre foram. Boas, mas não tão boas quanto antes.
 Regulares. Ruins. Não há nenhuma habilidade.

2. Avalie sua habilidade em lidar com pequenas quantias de dinheiro (ex.: trocar dinheiro, dar gorjeta):

- Não há perda. Alguma perda. Perda grave

3. Avalie sua habilidade em lidar com transações financeiras complicadas (ex.: pagar contas, controle de conta bancária):

- Não há perda. Alguma perda. Perda grave.

4. Ele/ela pode lidar com uma emergência doméstica (ex. vazamento nos encanamentos, pequenos incêndios):

- Tão bem quanto antes.
 Pior do que antes por causa da dificuldade de pensamento (raciocínio).
 Pior do que antes, por outra razão.

(qual) _____

5. Ele/ela pode entender situações ou explicações?

- Frequentemente Às vezes Raramente Não sabe

1. Ele/ela se comporta de modo apropriado* [isto é, em sua maneira usual (pré-doença)]em situações sociais e em interação com outras pessoas?

Frequentemente Às vezes Raramente Não sabe

* Este item avalia comportamento, não aparência.

QUESTÕES SOBRE ASSUNTOS COMUNITÁRIOS PARA O INFORMANTE

Ocupacional

1. O sujeito ainda está trabalhando?

SIM NÃO N/A

Se não aplicável - vá para o item número 4

Se sim - vá para o item número 3

Se não - vá para o item número 2

2. Os problemas de memória ou de pensamento (raciocínio) contribuíram para a decisão do sujeito de se aposentar? (A questão 4 é a próxima)

SIM NÃO N/A

3. O sujeito tem dificuldade significante em seu trabalho por causa de problemas com memória ou pensamento (raciocínio)?

Raramente ou nunca Às vezes Frequentemente Não sabe

Social

4. Ele/ela alguma vez dirigiu carro?

SIM NÃO

5. Ele/ela dirige carros atualmente?

SIM NÃO

6. Se não, é devido a problemas de memória ou pensamento (raciocínio)?

SIM NÃO

7. Se ele/ela ainda está dirigindo, há problemas ou riscos devido ao pensamento (raciocínio) pobre?

SIM NÃO

1. Ele/ela é capaz de fazer compras para suas próprias necessidades independentemente?

Raramente ou nunca Às vezes Frequentemente

Não Sabe

(precisa ser acompanhado em qualquer compra)

(Pode comprar um número limitado de itens, compra itens duplicados ou esquece itens necessários)

2. Ele/ela é capaz de fazer atividades independentemente fora de sua casa?

Raramente ou nunca Às vezes

Frequentemente

Não sabe

3. Ele/ela é levado a eventos sociais fora da casa de familiares?

SIM NÃO

Se não? _____ não, _____ por _____ que

4. Um observador casual do comportamento do sujeito pensaria que ele está doente?

SIM NÃO

5. Se institucionalizado, ele/ela participa bem de atividades sociais?

SIM NÃO

IMPORTANTE:

As informações coletadas são suficientes para classificar o nível de comprometimento do sujeito em assuntos comunitários?

Se não, por favor, investigue mais.

Atividades na comunidade: tais como ir à igreja, visitar amigos ou família, atividades políticas, organizações profissionais tais como associações, outros grupos profissionais, clubes sociais, organização de serviços, programas educacionais).

* Por favor, adicione notas se necessário para esclarecer o nível de funcionamento do sujeito nesta área.

QUESTÕES SOBRE O LAR E ATIVIDADES DE LAZER PARA O INFORMANTE

1a) Que mudanças ocorreram em suas habilidades de realizar tarefas domésticas?

1b) O que ele/ela ainda pode fazer bem?

2a) Que mudanças ocorreram em suas habilidades para realizar seus passatempos (hobbies)?

2b) O que ele/ela ainda pode fazer bem?

3) Se institucionalizado, o que ele/ela não pode mais fazer bem (Casa e Hobbies)

Atividades da vida diária (Blessed):

	Nenhuma perda		Perda grave
4. Habilidade para realizar tarefas domésticas	0	0,5	1

Por favor, descreva _____

5. Ele/ela é capaz de realizar tarefas domésticas até o nível de: (Escolha uma, o informante não precisa ser perguntado diretamente)

Sem função significativa

(Realiza atividades simples, tais como fazer a cama, somente com muita supervisão)

Funciona somente em atividades limitadas

(Com alguma supervisão, lava a louça com limpeza aceitável, coloca a mesa)

Funciona independentemente em algumas atividades

(Opera equipamentos, tal como aspirador de pó, prepara refeições simples)

Funciona em atividades usuais mas não no nível usual

Funciona normalmente em atividades usuais

IMPORTANTE:

As informações coletadas são suficientes para classificar o nível de comprometimento do sujeito em CASA & HOBBIES?

Se não, por favor investigue mais.

Tarefas Domésticas: Tais como cozinhar, lavar, limpar, fazer compras, levar o lixo para fora, limpar o quintal, manutenção de cuidados básicos e reparos básicos na casa

Hobbies: Costurar, pintar, artesanato, leitura, entretenimento, fotografia, jardinagem, ir ao teatro ou concerto, trabalho em madeira, participação em esportes.

QUESTÕES SOBRE O AUTOCUIDADO PARA O INFORMANTE

“Qual sua estimativa da habilidade mental dele (a) nas seguintes áreas:”

Vestir-se (Blessed)	Sem ajuda (0)	Às vezes não abotoa os botões corretamente, ... (1)	Seqüência errada - esquece itens comumente. (2)	Incapaz de se vestir (3)
Lavar-se (Arrumar-se)	Sem ajuda (0)	Necessita de estímulo (1)	Algumas vezes precisa de ajuda (2)	Sempre – ou quase sempre – precisa de ajuda (3)
Hábitos À mesa	De modo limpo; utiliza os talheres adequados. (0)	De modo desorganizado; utiliza apenas colher. (1)	Apenas sólidos simples (2)	Tem que ser alimentado (3)
Controle de esfíncter	Controle completo normal (0)	Ocasionalmente molha a cama (1)	Freqüentemente molha a cama (2)	Duplamente incontinente (3)

*Escore 1 pode ser considerado se o auto-cuidado estiver comprometido quando comparado a um estado anterior, mesmo que não receba estímulo.

ESCORE CLÍNICO DE DEMÊNCIA (CDR)

Escore Clínico de Demência (CDR)	0	0,5	1	2	3
---	---	-----	---	---	---

	Comprometimento				
	Normal 0	Questionável 0,5	Leve 1	Moderada 2	Grave 3
Memória	Sem perda de memória ou esquecimento leve e inconstante.	Esquecimento leve e constante (em oposição a eventual); recordação parcial de eventos; esquecimento “benigno”.	Moderada perda de memória; mais marcada para eventos recentes; déficit interfere nas atividades cotidianas.	Perda de memória grave; somente retém material intensamente aprendido; material novo rapidamente perdido.	Perda de memória grave; restam apenas fragmentos.
Orientação	Plenamente orientado.	Plenamente orientado, exceto por leve dificuldade nas relações temporais.	Dificuldade moderada com relações temporais; orientado para lugar do exame; pode ter desorientação geográfica em outros lugares.	Dificuldade grave com relações temporais; usualmente desorientado para o tempo, freqüentemente para o espaço.	Orientado apenas para pessoa.
Julgamento e resolução de problemas	Resolve bem problemas diários e administra bem negócios e finanças; bom julgamento em relação ao desempenho prévio.	Leve dificuldade em resolver problemas, similaridades e diferenças.	Dificuldade moderada para administrar problemas, similaridades e diferenças; julgamento social usualmente mantido.	Grave dificuldade em administrar problemas, similaridades e diferenças; julgamento social usualmente comprometido.	Incapaz de fazer julgamentos ou de resolver problemas.
Assuntos Comunitários	Função independente no nível usual no trabalho, em compras, grupos sociais ou de voluntários.	Leve dificuldade nessas atividades	Incapaz de funcionar independentemente nessas atividades, embora ainda possa engajar-se em algumas; parece normal à inspeção casual.	Nenhuma referência a funcionamento independente fora de casa. Parece estar bem para ser levado a atividades fora de ambiente familiar.	Nenhuma referência a funcionamento independente fora de casa. Parece estar muito doente para ser levado a atividades fora de ambiente familiar
Tarefas do Lar e Atividades de Lazer	Vida no lar, passatempos e interesses intelectuais bem mantidos.	Vida no lar, passatempos e atividades intelectuais levemente comprometidos.	Dificuldade leve mas evidente nas funções do lar; tarefas mais difíceis abandonadas; passatempos e interesses mais	Somente tarefas simples preservadas, interesses muito restritos e mal sustentados.	Sem função significativa em casa.

Autocuidado	Plenamente capaz para o autocuidado.	Necessita estímulo.	Requer ajuda para vestir-se, higiene e cuidado com objetos pessoais.	Requer muita ajuda para o cuidado pessoal, incontinência freqüente.
--------------------	--------------------------------------	---------------------	--	---

Inventário Neuropsiquiátrico
(Cummings et al – 1994)

- Responder baseando-se nas mudanças que ocorreram desde que o paciente começou a ter problemas de memória
- Marcar sim apenas quando o sintoma estiver presente. Do contrário, marcar não.
- Responda honestamente e meticulosamente às questões

Total: /144 pontos

Delírios		O paciente acredita que alguém está tentando rouba-lo ou prejudica-lo?								
Sim	Não									
NA		Freqüência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3
		Estresse	0	1	2	3	4	5		
Alucinações		O paciente age como se escutasse vozes? Fala com pessoas que não existem?								
Sim	Não									
NA		Freqüência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3
		Estresse	0	1	2	3	4	5		
Agitação/ Agressividade		O paciente é teimoso e rejeita ajuda dos outros? Tem períodos que se recusa a cooperar?								
Sim	Não									
NA		Freqüência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3
		Estresse	0	1	2	3	4	5		
Depressão/ Disforia		O paciente age como se estivesse triste ou de “baixo astral” Refere sentir-se triste ou deprimido?								
Sim	Não									
NA		Freqüência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3
		Estresse	0	1	2	3	4	5		
Ansiedade		O paciente fica agitado quando se separa de você? Ele apresenta sinais de nervosismo, preocupado, assusta-se por razões não aparentes? Parece muito tenso ou irrequieto?								
Sim	Não									
NA		Freqüência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3
		Estresse	0	1	2	3	4	5		
Elação/ Euforia		O paciente parece animado demais ou excessivamente feliz – sem razão? Acha graça onde outros não acham?								
Sim	Não									
NA		Freqüência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3
		Estresse	0	1	2	3	4	5		
Apatia/ Indiferença		O paciente parece menos interessado em suas atividades habituais ou nas atividades e planos dos outros?								
Sim	Não									
NA		Freqüência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3
		Estresse	0	1	2	3	4	5		

Desinibição	O paciente parece agir impulsivamente? Ex, diz coisas que podem magoar as pessoas sem qualquer constrangimento ou fala abertamente coisas íntimas que em geral não se diz em público? Tira a roupa em frente de outras pessoas/ público – momentos não apropriados?
Sim	Não
NA	
	<p>Frequência 1 2 3 4 Severidade 1 2 3</p> <p>Estresse 0 1 2 3 4 5</p>
Irritabilidade/ Labilidade	O paciente é impaciente e mau-humorado? Ele tem dificuldades para lidar com atrasos ou para ficar esperando algo que esteja programado? Seu humor é instável?
Sim	Não
NA	
	<p>Frequência 1 2 3 4 Severidade 1 2 3</p> <p>Estresse 0 1 2 3 4</p>
Distúrbios Motores	O paciente fica fazendo coisas repetitivas, como lidar andando ao redor da casa, mexendo nos botões da roupa, enrolando um cordão ou fazendo outras coisas repetitivamente? Anda sem motivo aparente?
Sim	Não
NA	
	<p>Frequência 1 2 3 4 Severidade 1 2 3</p> <p>Estresse 0 1 2 3 4 5</p>
Comportamentos Noturnos	O paciente acorda você a noite, acorda muito cedo, cochila muito durante o dia? Tem dificuldade para dormir? Ele levanta à noite (não contar vezes que levanta p/ urinar e volta a dormir imediatamente)? Anda ao acaso à noite, veste-se ou perturba seu sono?
Sim	Não
NA	
	<p>Frequência 1 2 3 4 Severidade 1 2 3</p> <p>Estresse 0 1 2 3 4 5</p>
Apetite e alimentação	O paciente perdeu ou ganhou peso? Mudou o gosto pelos alimentos?
Sim	Não
NA	
	<p>Frequência 1 2 3 4 Severidade 1 2 3</p> <p>Estresse 0 1 2 3 4 5</p>

FREQUENCIA

- 1 – ocasionalmente – menos que 1X/sem
 2 – Algumas vezes – cerca de 1X/sem
 3 – Frequentemente – várias vezes, menos que todos os dias
 4 – Muito frequentemente – 1 ou + vezes/ dia

SEVERIDADE

- 1 – Leve – presente, mas produzindo pouca aflição no paciente
 2 – Moderada – aflitiva e perturbadora
 3 – Marcada – muito perturbadora

ESTRESSE DO CUIDADOR

- 0 = Nenhum
 1 = Mínimo (levemente estressante, lidar com a situação não chega a ser um problema)
 2 = Leve (não muito estressante, geralmente fácil de lidar com a situação)
 3 = Moderado (razoavelmente estressante, nem sempre fácil de lidar com a situação)
 4 = Importante (muito stressante, difícil de lidar com a situação)
 5 = Muito importante (extremamente estressante, incapaz de lidar com a situação)

Índice de Katz para Atividades de Vida Diária

(Katz, S; Down, TD; Cash, HR et al – 1970)

Banho	<p>I - Independente – não necessita de auxílio</p> <p>A - Auxílio – recebe assistência para banhar uma parte do corpo (dorso/pernas)</p> <p>D - Dependente - necessita que alguém o banhe</p>
Vestuário	<p>I - Alcança as roupas e se veste sem auxílio</p> <p>A - Necessita de auxílio apenas para amarrar sapatos</p> <p>D - Necessita de auxílio para alcançar as roupas, para se vestir – do</p>

Uso de sanitário	I - Consegue chegar ao banheiro, usa o sanitário, e recoloca o vestuário sem auxílio (pode usar equipamento auxiliar como bengala, cadeira de roda, usar comadre e esvaziar pela manhã) A - Necessita de auxílio para ir até o banheiro, ou para sua higienização/recomposição do vestuário após uso do sanitário/ ou no uso de comadre D - Não usa o banheiro para eliminações
Transferência	I - Independente (cama/ cadeira)– pode necessitar de bengala, andador. A - Necessita de ajuda para sentar-se/ deitar-se/ levantar-se D - Não sai da cama
Continência	I - Tem controle de esfíncter vésico – intestinal A - Apresenta “acidentes ocasionais” – perder urina/ conteúdo fecal ocasionalmente D - Necessita de auxílio para o controle urinário/intestinal; uso de SVD; incontinência
Alimentação	I - Se alimenta sem auxílio A - Se alimenta sozinho, mas necessita de assistência para cortar os alimentos ou passar manteiga no pão. D - Necessita de auxílio para alimentar-se; usa SNG/SNE; Soroterapia/ Nutrição parenteral.

I = 1 ponto e D = 0 ponto

TOTAL: _____/6

Avaliação de Parkinsonismo (Adaptado de Tanner et al, 1990)

	SIM	NÃO
1. Tinha dificuldade para se levantar de uma cadeira?		
2. Notou se a letra (escrita) ficou pequena, se reduziu de tamanho?		
3. Notou ou alguém comentou se a sua voz estava mais baixa ou mais fraca que era antes?		
4. Tinha alterações do equilíbrio ao caminhar?		
5. Os pés ficavam presos ou agarrados no chão ao atravessar portas?		
6. Acha o seu rosto ficou mais “parado”, menos expressivo do que era antes?		
7. Tinha tremores nos braços ou nas pernas?		
8. Tinha dificuldades de abotoar as roupas?		
9. Arrastava os pés ou dava passos curtos ao caminhar?		

 Não Aplicável Park: _____

ESCALA DE ATIVIDADES INSTRUMENTAIS DA VIDA DIÁRIA (IADL)

<p>A – Habilidade para usa o telefone</p> <p>1. Utiliza o telefone por iniciativa própria 1 2. Discos alguns números conhecidos 1 3. Atende mas não faz ligações 0 4. Não usa o telefone de modo algum 0</p>	<p>E – Lavanderia</p> <p>1. Lava completamente as roupas 1 2. Lava pequenas peças: meias, etc 1 3. Toda a roupa deve ser lavada por terceiros 0</p>
<p>B – Compras</p> <p>1. Faz compras independente/e 1 2. Faz pequenas compras independente/e 0 3. Precisa ser acompanhado nas compras 0 4. Incapaz de fazer compras 0</p>	<p>F – Transporte</p> <p>1. Usa independentemente transportes públicos ou dirige seu próprio carro 1 2. Chama de táxi, mas não usa transporte público 1 3. Usa transporte público se acompanhado 0 4. Locomove-se limitadamente de táxi ou carro com auxílio de outros 0 5. Não sai de casa/ Não usa nenhum transporte 0</p>
<p>C – Preparo de alimentos</p> <p>1. Planeja, prepara e serve adequadamente as refeições independentemente 1 2. Prepara adequadamente as refeições se alguém lhe fornecer os ingredientes 0 3. Aquece, serve e prepara refeições, mas não garante uma dieta adequada 0 4. Necessita que alguém prepare e sirva a refeição 0</p>	<p>G – Medicação</p> <p>1. É responsável por tomar sua medicação em dose e horários corretos 1 2. Assume responsabilidade por tomar sua medicação se separada anteriormente por outros 0 3. Não é capaz de tomar sua medicação 0</p>
<p>D – Tarefas domésticas</p> <p>1. Mantem a casa sozinho ou com auxílio ocasional (p.ex: auxílio para tarefas pesadas) 1 2. Realiza tarefas diárias leves, como lavar louça, fazer a cama 1 3. Realiza tarefas diárias leves, mas não consegue fazê-las dentro dos padrões de limpeza 1 4. Necessita de auxílio com todas as tarefas domésticas 0 5. Não faz/ participa de nenhuma tarefa doméstica 0</p>	<p>H – Finanças</p> <p>1. Controla suas finanças independentemente (conta de banco, talão de cheque, preenche cheques, paga contas) 1 2. Controla contas no dia a dia, mas necessita de auxílio com banco, compras maiores,... 1 3. Incapaz de controlar finanças 0</p>
<p>Lawton,MP; Brody, EM - The instrumental activities of Daily Living Scale. Gerontologist, 1969, 9: 179 - 186</p>	

(Lawton & Brody)

Total: _____ / 8 pontos

Perguntas adicionais:

Ele(a) esquece panela no fogo, torneira aberta ou ferro ligado?

Ele(a) pode ser deixado(a) em casa sozinho(a) de forma segura?

Episódio Maior Depressivo no Passado – SCID

Critérios para classificar como depressão maior: Cinco (ou mais) dos seguintes critérios presentes durante período maior ou igual a duas semanas, sendo que um dos cinco deve ser ou (1) humor deprimido, ou (2) perda do interesse ou prazer.

1) Já houve, pelo menos uma vez na vida dele(a), algum momento em que se sentiu deprimido(a), ou na pior na maior parte do dia, quase todos os dias? (Como é que foi isso?)

SE SIM: Durou mais que duas semanas? SIM () NÃO ()

Critério: 1 2 3

2) Naquele tempo ou em outro momento, ele(a) perdeu o interesse ou o prazer pelas coisas que costumava gostar? (Como é que foi isso?) Isso acontecia quase todos os dias?

SE SIM: Durou mais que duas semanas? SIM () NÃO ()

Critério: 1 2 3 ? Quando foi isso? _____

3) Naquele período ele(a) perdeu ou ganhou peso? Ele(a) estava tentando perder peso?

SE NÃO: Como estava o apetite dele(a)? (Tinha que forçar para comer? Comia menos/mais que o habitual? Isso acontecia quase todos os dias?)

Critério 1 2 3 ? Assinalar: Perda de peso ou redução do apetite _____ Ganho de peso ou aumento do apetite _____

4) Como estava o sono dele(a)? (Dificuldade para dormir, acordando frequentemente, dificuldades em ficar acordado, acordando muito cedo, ou, dormindo demais? Quantas horas por noite comparado com o habitual? Isso acontecia quase todas as noites?)

Critério: 1 2 3 ? Assinalar: Insônia _____ Hipersônia _____

5) Ele(a) estava tão inquieto(a) ou agitado(a) que não era capaz de ficar parado(a)? (Isso acontecia todos os dias?)

SE NÃO: É o contrário: falando e se movendo mais devagar do que o normal dele(a)? (Isso acontecia todos os dias?)

Critério: 1 2 3 ? Assinalar: agitação psicomotora _____ retardo psicomotor _____

6) Como estava a energia dele(a)? (Cansado(a) o tempo inteiro? Quase todos os dias?)

Critério: 1 2 3 ?

7) Como ele se sentia em relação a si mesmo? (Inútil, sem valor?) Quase todos os dias?

SE NÃO: Ele se sentia culpado por coisas que fazia ou deixava de fazer? Quase todos os dias?

Critério: 1 2 3 ? Assinalar: Sentimento de inutilidade _____ Culpa inadequada _____

8) Ele(a) tinha dificuldade para se concentrar ou pensar? (Com que tipo de coisas isso interferia?) Quase todos os dias?

SE NÃO: Era difícil para ele(a) tomar decisões sobre coisas do dia a dia? Quase todos os dias?

Critério: 1 2 3 ? Assinalar: Capacidade de pensar diminuída _____ Indecisão _____

9) As coisas estavam tão ruins que ele(a) pensava muito em morte ou que estaria em melhor situação se estivesse morto(a)? E quanto a se ferir?

Critério: 1 2 3 ? Assinalar: Pensamentos de morte recorrentes _____ Ideação suicida _____ Tentativa de suicídio _____

10) Durante aquele tempo ficou difícil para ele(a) trabalhar, cuidar das coisas em casa, ou se relacionar com as pessoas?

SIM () NÃO ()

11) Pouco antes de tudo isso começar ele estava bebendo em excesso ou usando drogas?

SIM () NÃO ()

12) Pouco antes disso começar ele estava fisicamente doente?

SIM () NÃO ()

13) Isso começou logo depois de alguém próximo a ele(a) morrer? SIM () NÃO ()

Durou mais que 2 meses? SIM () NÃO ()

OBS: Houve algum outro episódio de depressão na vida do paciente? () SIM () NÃO
Quando ocorreu (eram)? _____

CONSIDERAR:

1 – ausente ou falso 2 – subliminar (duvidoso) 3 – limiar ou verdadeiro

? – informação inadequada

Episódio Maníaco no Passado - SCID

Critérios para classificar como mania no passado : Humor elevado e mais três dos outros sintomas, ou humor irritável e mais quatro dos outros sintomas.

HUMOR ELEVADO: Já houve algum período de tempo em ele(a) estava se sentindo tão bem, agitado(a) ou excitado(a) que vocês perceberam que ele(a) não estava no seu normal? Ou ficava tão excitado(a) que se envolvia em problemas?

Critério 1 2 3 ?

Durou pelo menos 1 semana? Ou ele(a) teve que procurar um hospital? Sim () Não ()

Quando foi isso? _____

HUMOR IRRITÁVEL: Houve algum período em que ele(a) estava tão irritado(a), que era pego(a) gritando com as pessoas ou começando brigas ou discussões?

Durou mais que 1 semana? Ou ele(a) teve que procurar um hospital? Sim () Não ()

Critério: 1 2 3 ? Quando foi isso? _____

3) Naquele período como ele(a) se sentia em relação a si mesmo? (Mais confiante do que o habitual? Com algum poder ou habilidade especial?)

Critério 1 2 3 ?

4) Naquele tempo ele(a) tinha que dormir menos que o habitual? (Mesmo assim se sentia descansado?)

Critério: 1 2 3 ?

5) Naquele tempo ele(a) estava muito mais falante que o habitual? (Vocês tinham dificuldade para interromper ou entender o que ele(a) estava falando?)

Critério: 1 2 3 ?

6) Naquele tempo os pensamentos passavam rapidamente pela cabeça dele(a)?

Critério: 1 2 3 ?

7) Naquele tempo ele(a) era tão facilmente distraído(a) por coisas a sua volta que tinha dificuldades para se concentrar ou continuar o que estava fazendo?

Critério: 1 2 3 ?

8) Naquele período, como ele(a) passava o tempo? (Ele(a) se envolvia em tantas atividades a ponto de vocês ficarem preocupados?)

SE NÃO: Ele(a) estava fisicamente inquieto(a)? (Qual a intensidade disso?)

Critério: 1 2 3 ? Assinalar: aumento na atividade _____ agitação psicomotora _____

9) Naquele tempo, ele(a) fez alguma coisa que pudesse trazer problemas para ele(a) mesmo(a) ou para vocês (Comprando coisas que não precisava?) (Tendo comportamento sexual inadequado?)

Critério: 1 2 3 ?

10) Durante aquele tempo ficou difícil para ele(a) trabalhar, cuidar das coisas em casa, ou se relacionar com as pessoas?

SIM () NÃO ()

11) Pouco antes de tudo isso começar ele(a) estava bebendo em excesso ou usando drogas?

SIM () NÃO ()

12) Pouco antes disso começar, ele(a) estava fisicamente doente?

SIM () NÃO ()

CONSIDERAR:
 1 – ausente ou falso
 2 – subliminar (duvidoso)
 3 – limiar ou verdadeiro
 ? – informação inadequada

CLASSIFICAÇÃO SÓCIO ECONÔMICA

Associação Brasileira dos Institutos de Pesquisa de Mercado
 (ABIPEME)

A- Em sua casa tem?

	NÃO	SIM	QUANTIDADE					
			1	2	3	4	5	6 ou +
Televisão			2	4	6	8	10	12
Empregada mensalista			6	12	18	24	24	24
Rádio			1	2	3	4	5	6
Banheiro			2	4	6	8	10	12
Aspirador de pó			5	5	5	5	5	5
Máquina de lavar			2	2	2	2	2	2
Automóvel de passeio			4	8	16	16	16	16

TOTAL: _____

A- Qual a instrução do chefe de família? (Quem é o chefe da família: _____)

Sem Instrução/ primário incompleto	0
Primário completo/ ginásio incompleto	1
Ginásio completo/ colegial incompleto	3
Colegial completo/superior incompleto	5
Superior completo	10

TOTAL: _____

CLASSE ABIPEME	
CLASSE	PONTOS
A	35 OU +
B	21 a 34
C	10 a 20
D	05 a 09
E	00 a 04

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, C.R.; Selkoe, D.J.; Potter, H. Immunochemical identification of the serine protease inhibitor alpha 1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell*, v: 52(4), p: 487-501, 1988.
- Behrouz, N.; Defossez, A.; Delacourte, A.; Hublau, P.; Mazzuca, M. Alzheimer's disease: immunohistochemical characterization of cerebral amyloid deposits. *Prog. Clin. Biol. Res.*, v: 317, p: 383-391, 1989.
- Blennow, K.; de Leon, M.J.; Zetterberg, H. Alzheimer's disease. *Lancet.*, v. 368, p. 387-403, 2006.
- Blum, H.; Beier, H.; Gross, H.J. Improved silver staining of plant proteins RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, v.8, p.93-99, 1987.
- Braak, H. and Braak, E. Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol.*, v 1, p.213-216, 1991.
- Brito-Marques, P.R. Doença de Alzheimer: Diagnóstico e Tratamento. In: Pereira CU, Andrade ASF eds. *Neurogeriatria*, Rio de Janeiro: Revinter, p.281-302, 2001.
- Bunn-Moreno, M.M.; Campos-Neto, A. Lectin(s) extracted from seeds of *Artocarpus integrifolia* (jackfruit): potent and selective stimulator(s) of distinct human T and B cell functions. *J. Immunol.*, v.127, n.2, p.427-429, 1981.
- Castegna, A.; Aksenov, M.; Thongboonkerd, V.; Klein, J.B.; Pierce, W.M.; Booze, R.; Markesbery, W.R.; Butterfield, D.A. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic. Biol. Med.*, v: 33(4), p: 562-571, 2002.
- Cataldo, A.M. and Nixon, R.A. Enzymatically active lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v: 87(10), p: 3861-3965, 1990.

- Cole, R.N.; Hart, G.W. Cytosolic O-glycosylation is abundant in nerve terminals. *J. Neurochem.*, v: 79(5), p:1080-1089, 2001.
- Coleman, P.D. and Flood, D.G. Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, v. 8 (6), p. 521-545, 1987.
- Cotman, C.W.; Nils, Hailer, N.P.; Pfister, K.K.; Soltesz, I.; Schachaner, M. Cell adhesion molecules in neural plasticity and pathology: similar mechanisms, distinct organization? *Progress in Neurobiol.*, v.55, p.659-669, 1998.
- Dahm, R. Alzheimer's discovery. *Curr. Biol.*, v.16 (21), p.906-910, 2006.
- De Rossi, A.; Rocha, L.B.; Rossi, M. A. Application of fluorescence microscopy on hematoxylin and eosin-stained sections of healthy and diseased teeth and supporting structures. *J. Oral. Pathol. Med.*, v: 36(6), p: 377-81, 2007.
- Deshpande, S.S., Damodaran, S. Food legumes: chemistry and technology. *Advances in Cereal Science and Technology*, v.10, p.147-241, 1990.
- Etzler, M.E. Plant lectins: molecular and biological aspects. *Annual Review Plant Physiology*, v.36, p.209-234, 1985.
- Evans, D.A.; Funkenstein, H.H.; Albert, M.S.; Scherr, P.A.; Cook, N.R.; Chown, M.J.; Hebert, L.E.; Hennekens, C.H.; Taylor, J.O. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. *JAMA*, v.33, p.2551-2556, 1989.
- Ferri, C.P.; Prince, M.; Brayne, C. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet.*, v. 366, p. 2112–2117, 2005.
- Frohman, E.M.; Frohman, T.C.; Gupta, S.; de Fougères, A.; van den Noort, S. Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.*, v: 106(1), p:105-111, 1991.

- Ganiko, L.; Martins, A.R.; Espreafico, E.M.; Roque-Barreira, M.C. Neutrophil haptotaxis induced by the lectin KM⁺. *Glycoconjugate J.*, v.15 (5), p. 527-530, 1998.
- Ganiko, L., Martins, A.R., Freymüller, E., Mortara, R.A., and Roque-Barreira, M.C. Lectin KM⁺-induced neutrophil haptotaxis involves binding to laminin. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1721(1-3), p.152-163, 2005.
- Gollin, P.A.; Kalaria, R.N.; Eikelenboom, P.; Rozemuller, A.; Perry, G. Alpha 1-antitrypsin and alpha 1-antichymotrypsin are in the lesions of Alzheimer's disease. *Neuroreport.*, v: 3(2), p: 201-203, 1992.
- Hellström-lindahl, E. Modulation of β -amilóide precursor protein processing and tau phosphorylation by acetylcholine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 2000, v.393, p.255-263.
- Hewicker-Trutwein, M.; Schultheis, G.; Trautwein, G. Effects of trypsinization and microwave treatment on lectin labelling of microglial cells in paraffin-embedded sections from pre- and postnatal bovine brains. *Acta Histochem.*, v.97, p.455-461, 1995.
- Hofman, A.; Rocca, W.A.; Brayne, C.; Breteler, M.M.; Clarke, M.; Cooper, B.; Copeland, J.R.; Dartigues, J.F.; da Silva Droux, A.; Hagnell, O. The prevalence of dementia in Europe: a collaborative study of 1980-1990 findings. Eurodem Prevalence Research Group. *Int. J. Epidemiol.*, v.20, p.736-748, 1991.
- Kanninen, K.; Goldsteins, G.; Auriola, S.; Alafuzoff, I.; Koistinaho, J. Glycosylation changes in Alzheimer's disease as revealed by a proteomic approach. *Neurosci Lett.*, v: 367(2), p: 235-240, 2004.
- Katzman, R.; Kawas, C.H. The epidemiology of dementia and Alzheimer's disease. In: Terry, R.D., Katzman, R., Bick, K.L. (Eds.), *Alz. Dis.* Raven Press, New York, p.105-122, 1994.

- Kennedy, J.F., Palva, P.M.G., Corella, M.T.S., Cavalcanti, M.S.M., Coelho, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, v.26, n.3, p.219-230, 1995.
- Khachaturian, Z. S. Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Arch. Neurol.*, v.42, p.1097-1105, 1985.
- Kiatipattanasakul, W.; Nakayama, H.; Nakamura, S.; Doi, K. Lectin histochemistry in the aged dog brain. *Acta Neuropathol.*, v. 95 (3), p. 261-268.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.295-340, 1970.
- Laemmli, U.K., Favre, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.*, v.80, p.575-599, 1973.
- Liener, I.E. The nutritional significance of the plant lectins. In: ORY, R.L. Antinutrients and natural toxicants in foods. Westport: Food & Nutrition Press, p.143-157, 1981.
- Lis, H., Sharon, N. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). *Annu. Rev. Biochem.*, v.42, p.541-574, 1973.
- Liu, F.; Zaidi, T.; Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I.; Gong, C.X. Aberrant glycosylation modulates phosphorylation of tau by protein kinase A and dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 5. *Neuroscience*, v:115(3), p:829-837, 2002.
- Lowry, D.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265-275, 1951.
- Mann, D.M.A.; Bonshok, R.E.; Marcyniuk, B.; Stoddart, R.W.; Torgerson, E. Saccharides of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, v.85, p. 277-282, 1988.

- Martins, A.R.; Dias, M.N.; Vasconcelos, T.M.; Caldo, H.; Costa, M.C.R.; Chimelli, L.; Larson, R.L. Microwave-stimulated recovery of myosin-V immunoreactivity from formalin-fixed, paraffin-embedded human CNS. *J. Neurosci. Meth.*, v.92, p.25-29, 1999.
- McComb, R.D.; Miller, K.A.; Carson, S.D. Tissue factor antigen in senile plaques of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.*, v: 139(3), p: 491-494, 1991.
- Mesulam, M.M. Neuroplasticity failure in Alzheimer's disease: bridging the gap between plaques and tangles. *Neuron.*, v. 24(3), p. 521-529, 1999.
- Miranda-Santos, I.K.F.; Delgado, M.; Bonini, P.V.; Bunn-Moreno, M.M.; Campos-Neto, A. A crude extract of *Artocarpus integrifolia* contains two lectins with distinct biological activities. *Immunol. Lett.*, v.31, p.65-72, 1991.
- Mirra, S.S.; Heyman, A.; Mckeel, D.; Sumi, S.M.; Crain, B.J.; Brownlee, L.M.; Vogel, F.S.; Hughes, J.P.; Van Belle, G.; Berg, L.; and participating CERAD neuropathologists. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurol.*, v. 41, p. 479-486, 1991.
- Misquith, S.; Rani, P.G.; Surolia, A. Carbohydrate binding specificity of the B-cell maturation mitogen from *Artocarpus integrifolia* seeds. *J. Biol. Chem.*, v.269, n.48, p.30393-30401, 1994.
- Morris, J.C.; Heyman, A.; Mohs, R.C.; Hughes, M.S.; Van Belle, G.; Fillenbaum, G.; Mellits, E.D.; Clark, C.; and the CERAD investigators. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part I. Clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. *Neurol.*, v. 39, p. 1159-1165, 1989.
- Nicolson, G.L. The interactions of lectins with animal cell surfaces. *Int. Rev. Cytol.*, v.39, p.89-190, 1979.

- Nishi, K.; Tanegashima, A.; Yamamoto, Y.; Ushiyama, I.; Ikemoto, K.; Yamasaki, S.; Nishimura, A.; Rand, S.; Brinkmann, B. Utilization of lectin-histochemistry in forensic neuropathology: lectin staining provides useful information for postmortem diagnosis in forensic neuropathology. *Leg Med.*, v: 5(3), p: 117-131, 2003.
- Nishimura, A.; Sawada, S.; Ushiyama, I.; Yamamoto, Y.; Nakagawa, T.; Tanegashima, A. A.; Nishi, K. Lectin-histochemical detection of degenerative glycoconjugate deposits in human brain. *Forensic. Sci. Int.*, v. 113, p. 265-269, 2000.
- Oliveira, A.O. Lectina KM⁺ uma ferramenta para o diagnóstico neuropatológico da doença de Alzheimer. Tese de mestrado apresentada à FFCLRP-USP para obtenção do título de mestrado, 2000.
- Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. *Trends Food Science Technology*, v.7, n.4, p.132-138, 1996.
- Rani, P.G.; Bachhawat, K.; Misquith, S.; Surolia, A. Thermodynamic Studies of Sacharide to Artocarpin, a B-cell Mitogen, Reveals the extended Nature of Its Interaction with Mannotriose [3,6-Di-O-(α -D-mannopyranosyl)-D-manose]. *J. Biol. Chem.*, v.274, p. 29694-29698, 1999.
- Roher, A.E.; Kuo, Y.M. Isolation of amyloid deposits from brain. *Methods Enzymol.*, v: 309, p: 58-67, 1999.
- Rosa, J.C., De Oliveira, P.S., Garratt, R., Beltramini, L., Resing, K., Roque-Barreira, M.C, Greene, L.J. KM⁺, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the beta-prism fold. *Protein Sci.*, v. 8(1), p. 13-24, 1999.
- Sáez-Valero, J.; Fodero, L.R.; Sjögren, M.; Andreasen, N.; Amici, S.; Gallai, V.; Vanderstichele, H.; Vanmechelen, E.; Parnetti, L.; Blennow, K.; Small, D.H. Glycosylation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase changes as a

- function of the duration of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.*, v:72(4), p:520-526, 2003.
- Santos-de-Oliveira, R.; Dias-Baruffi, M.; Thomaz, S.M.O.; Beltramini, L.M.; Roque-Barreira, M.C. A Neutrophil Migration-Inducing Lectin from *Artocarpus integrifolia*. *J. Immunol.*, p. 1798-1807, 1994.
- Sharon, N., Lis, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science*, v.177 (53), p.949-959, 1972.
- Sheetz, M.P.; Pfister, K.K.; Bulinski, J.C.; Cotman, C.W. Mechanisms of trafficking in axons and dendrites: Implications for development and neurodegeneration. *Progress in Neurobiol.*, v.55, p.577-594, 1998.
- Shi, S-R.; Key, M.E. Kalra, K.L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissues sections. *J. Histochem. Cytochem.*, v.39, p.741-748, 1991.
- Snow, A.D.; Mar, H.; Nochlin, D.; Kimata, K.; Kato, M.; Suzuki, S.; Hassell, J.; Wight, T.N. The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.*, v. 133(3), p. 456-463, 1988.
- Snow, A.D.; Mar, H.; Nochlin, D.; Sekiguchi, R.T.; Kimata, K.; Koike, Y.; Wight, T.N. Early accumulation of heparan sulfate in neurons and in the beta-amyloid protein-containing lesions of Alzheimer's disease and Down's syndrome. *C. R. Acad. Sci. III.*, v: 308(16), p: 437-444, 1989.
- Snow, A.D.; Mar, H.; Nochlin, D.; Wight, T.N. Congo red staining on 1 micron deplasticized sections for detection of lesions in Alzheimer's disease and related disorders. *Am. J. Pathol.*, v: 137(5), p: 1253-1270, 1990.

- Spillantini, M.G.; Goedert, M. Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.*, v.21, p.428-433, 1998.
- Szumanska, G.; Vorbrodt, A.W.; Mandybur, T.I.; Wisniewski, H.M. Lectin histochemistry of plaques and tangles in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, v: 73(1), p:1-11, 1987.
- Teixeira, S.A., Viapiano, M.S., Ganiko, L., Roque-Barreira, M.C., Martins, A.R. The novel lectin KM+ detects a specific subset of mannosyl-glycoconjugates in the rat cerebellum. *Glycoconj. J.*, v.20(7-8), p.501-508, 2004.
- The National Institute on Aging and Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease. Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, v. 18, p. S1-S2, 1991.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 76, p.4350-4354, 1979.
- Trojanowsky, J.Q.; Schmidt, M.L.; Shin, R.W.; Bramblett, G.T.; Goedert, M.; Lee, V.M.Y. From pathological marker to potential mediator of neuronal dysfunction and degeneration in Alzheimer's disease. *Clin. Neurosc.*, v.1, p.184-191, 1993.
- Ulrich, J.; Meier-Ruge, W.; Probst, A.; Meier, E.; Ipsen, S. Senile plaques: staining for acetylcholinesterase and A4 protein: a comparative study in the hippocampus and entorhinal cortex. *Acta Neuropathol*, v: 80(6), p: 624-628, 1990.
- van Rensburg, S.J.; Berman, P.A.; Potocnik, F.C.; Taljaard, J.J Glycosylation of transferrin in Alzheimer's disease and alcohol-induced dementia, *Metab. Brain Dis.*, v: 15, p: 243-247, 2002.
- Vyas, N.K. Atomic features of protein carbohydrate interactions. *Curr. Opin. Struct.*

Biol., v.1, p.732-740, 1991.

Weis, W.I., Drickamer, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.*, v.65, p.441-473, 1996.

Zilka, N., Novak, M. The tangled story of Alois Alzheimer. *Bratisl. Lek. Listy.*, v.107, p.343-345, 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)