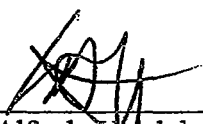


UM MODELO NEUROCOMPUTACIONAL DO PAPEL DO COLESTEROL NO
DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Gizelle Kupac Vianna

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS
PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA
DE SISTEMAS E COMPUTAÇÃO.

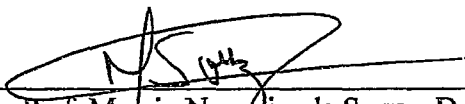
Aprovada por:



Prof. Luis Alfredo Vidal de Carvalho, D.Sc.



Prof. Carlos Eduardo Pedreira, Ph.D.



Prof. Marcio Nogueira de Souza, D.Sc.



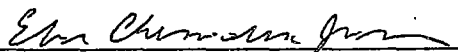
Prof.^a Roseli Suzi Wedemann, D.Sc.



Prof.^a Célia Martins Cortez, D.Sc.



Prof. Valmir Carneiro Barbosa, Ph.D.



Prof. Elie Cheniaux Júnior, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

JULHO DE 2005

VIANNA, GIZELLE KUPAC

Um Modelo Neurocomputacional do
Papel do Colesterol no Desenvolvimento da
Doença de Alzheimer. [Rio de Janeiro],
2005.

XVI, 174 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ,
D.Sc., Engenharia de Sistemas e
Computação, 2005).

Tese – Universidade Federal do Rio de
Janeiro, COPPE.

1. Neurociência Computacional
2. Modelagem Matemática
3. Doença de Alzheimer
4. Sistemas Dinâmicos

I. COPPE/UFRJ II. Título (série).

Ao Henrique, pelo apoio e carinho que me ajudaram a vencer essa batalha e por saber me compreender nos momentos mais difíceis.

Ao meu avô, que partiu antes que eu pudesse entender o que estava acontecendo com ele.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Luis Alfredo, que foi mais do que um orientador. Foi um amigo e conselheiro, que me ajudou a trilhar um caminho rumo a um novo futuro, me guiando não só por esta tese, mas pelas escolhas profissionais que eu precisei fazer. Tenho certeza que perco um orientador, mas ganho um amigo.

Ao Henrique, que soube me apoiar em todas as decisões difíceis que eu precisei tomar e que fez de tudo para que eu pudesse tornar esse sonho uma realidade. Sem ele eu não teria chegado até aqui.

Aos meus pais, que sempre me ajudaram em tudo o que eu precisei e me ensinaram desde cedo sobre o valor do trabalho.

Aos meus colegas de projeto, Artur e Fábio, por seu companheirismo e ânimo na reta final. E, especialmente, ao “auxílio luxuoso” que foi poder contar com o Artur, que sabia traduzir em código todas as minhas mais incríveis solicitações (como se ele não tivesse mais nada para fazer...).

Finalmente, agradeço à CAPES, pelo auxílio financeiro e às funcionárias da secretaria da COPPE Sistemas, por toda a ajuda prestada e pela simpatia com que sempre me atenderam.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

UM MODELO NEUROCOMPUTACIONAL DO PAPEL DO COLESTEROL NO PROCESSO DE DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Gizelle Kupac Vianna

Julho / 2005

Orientador: Luis Alfredo Vidal de Carvalho

Programa: Engenharia de Sistemas e Computação

Este trabalho apresenta um modelo matemático-computacional do processo de desenvolvimento da Doença de Alzheimer, considerando-se que o colesterol possui um papel fundamental na formação das alterações histopatológicas características da doença: as Placas Neuríticas Senis e os Emaranhados Neurofibrilares. O modelo foi construído através de uma abordagem hierárquica dos principais processos da doença, partindo-se dos processos mais gerais até chegar-se a um nível de detalhe suficiente para a modelagem direta dos fenômenos através de equações diferenciais ordinárias, ou equações algébricas. O modelo final, constituído de um sistema de equações, foi implementado em um programa de computador e, em seguida, foram realizados vários experimentos, divididos em dois grupos distintos: os testes de validação do modelo e os testes de hipóteses sobre a doença. No primeiro caso, os resultados obtidos com a simulação foram comparados a resultados de experimentos *in vivo* ou *in vitro*, encontrados na literatura consultada e os mesmos se mostraram qualitativamente coerentes. No segundo tipo de experimentos, as simulações tiveram o objetivo de testar hipóteses sobre o processo de formação da doença, levantadas na literatura consultada e ainda sem confirmação experimental. Dos resultados dessas simulações, foi possível validar as hipóteses e obter conclusões finais sobre o processo de desenvolvimento da doença.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

A NEUROCOMPUTATIONAL MODEL OF THE ROLE OF CHOLESTEROL IN THE
DEVELOPMENT PROCESS OF ALZHEIMER'S DISEASE

Gizelle Kupac Vianna

July / 2005

Advisor: Luis Alfredo Vidal de Carvalho

Department: Systems Engineering and Computer Science

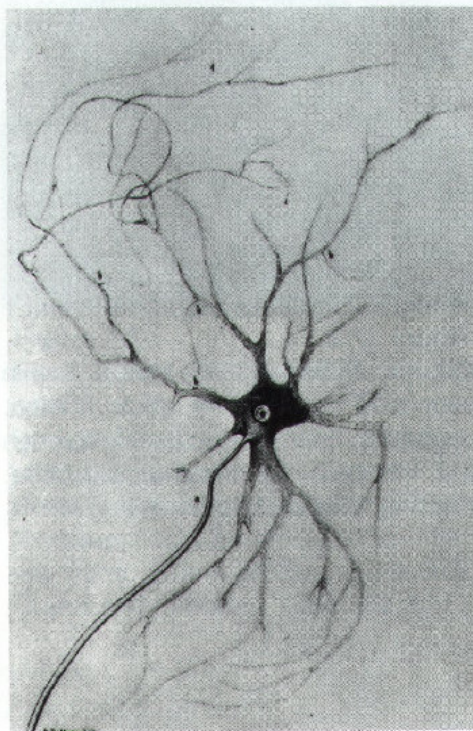
This work presents a mathematical-computational model of the development process of Alzheimer's disease, based on the assumption that cholesterol plays a key role in the formation of hallmark neuropathological lesions that characterize the disease: the senile amyloid plaques and neurofibrillary tangles. The model was built upon a hierarchal approach of the disease's main processes, starting from the higher level processes towards the lower level processes, that are simple enough to allow the direct modeling of phenomena by ordinary differential equations. The final model, conceived as a system of equations, was implemented as a computer program and, thereafter, two sets of tests were carried out. In the first set of tests, aimed at validating the model, the results obtained from the simulations carried out were qualitatively coherent with *in vivo* or *in vitro* experiments found in the consulted literature. In the second set, we performed simulations in order to test a number of hypotheses about the development process of the disease, collected from the literature but yet without experimental confirmation. From the results of these simulations, it was possible to validate those hypotheses and to draw some conclusions about the development process of the disease.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
SUMÁRIO	VII
LISTA DAS FIGURAS	X
LISTA DAS TABELAS	XV
LISTA DE SÍMBOLOS	XVI
I. INTRODUÇÃO	1
I.1 - OBJETIVO DO TRABALHO DE PESQUISA	5
I.2 - PRINCIPAIS MOTIVAÇÕES	6
I.3 - ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	6
II. A DOENÇA DE ALZHEIMER	8
II.1 - HISTÓRICO	8
II.2 - VARIEDADE DE DEMÊNCIAS SENIS.....	9
II.3 - DOENÇA DE ALZHEIMER	11
II.4 - DESCRIÇÃO	12
II.4.1 - SUBTIPOS E ESPECIFICADORES	12
II.4.2 - ETIOPATOGENIA.....	13
II.4.3 - CURSO	13
II.5 - EPIDEMIOLOGIA	14
II.6 - FATORES DE RISCO	16
II.6.1 - O FATOR IDADE	16
II.6.2 - MUTAÇÕES GENÉTICAS	19
II.7 - SEMIOLOGIA	20
II.7.1 - SINTOMAS E SINAIS.....	20
II.8 - DIAGNÓSTICO	23
II.9 - TRATAMENTO	24
II.9.1 - TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS.....	25
II.10 - PATOLOGIA	27
II.10.1 - ÁREAS AFETADAS PELA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	27
II.10.2 - ESTRUTURAS E SUBSTÂNCIAS ENVOLVIDAS NA PATOLOGIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER	31
II.10.3 - ALELOS DA APOE.....	31
II.10.4 - DEPÓSITOS A β	35
II.10.5 - RAFTS LIPÍDICOS	38
II.10.6 - PROTEÍNA TAU.....	38
II.10.7 - O PAPEL DO CÁLCIO NA DA	40
II.10.8 - CÁLCIO INTRACELULAR E BUFFERS DE CÁLCIO	44
II.10.9 - O CÁLCIO E AS MITOCÔNDRIAS	45
II.10.10 - O METABOLISMO DO COLESTEROL NA DA	46

II.10.11 - O COLESTEROL NAS MEMBRANAS PLASMÁTICAS SINÁPTICAS	47
II.10.12 - O COLESTEROL E O PROCESSAMENTO DA PPA	49
II.10.13 - A BARREIRA HEMATO-ENCEFÁLICA (BHE)	52
II.11 - ETIOLOGIA	53
II.11.1 - HIPÓTESE GENÉTICA.....	53
II.11.2 - HIPÓTESE DA CASCATA AMILÓIDE	54
II.11.3 - HIPÓTESE DA NEUROPLASTICIDADE.....	55
II.11.4 - HIPÓTESE DO ESTRESSE OXIDATIVO	56
II.11.5 - HIPÓTESE DO COLESTEROL	58
III. MODELO DO COLESTEROL	61
III.1 - DETALHAMENTO DO MODELO DO COLESTEROL	63
III.2 - DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	69
III.3 - FORMAÇÃO DE ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS	72
III.4 - O METABOLISMO DO COLESTEROL.....	76
III.4.1 - PROCESSO: ENTRADA DE COLESTEROL NO SNC.....	78
III.4.2 - PROCESSO: CONTROLE DO NÍVEL DE COLESTEROL NO SNC.....	80
III.4.3 - PROCESSO: SÍNTESE DA APOE	82
III.4.4 - PROCESSO: CONFIGURAÇÃO DAS MPS'S.....	84
III.5 - FORMAÇÃO DE PLACAS NEURÍTICAS SENIS	87
III.5.1 - PROCESSO: PROCESSAMENTO DO PPA	89
III.5.2 - PROCESSO: EXPORTAÇÃO DO A β	92
III.5.3 - PROCESSO: DEGRADAÇÃO DO A β	95
III.5.4 - PROCESSO: AGREGAÇÃO E FIBRILAÇÃO DO A β	98
III.5.5 - PROCESSO: FORMAÇÃO DE PNS'S.....	100
III.6 - FORMAÇÃO DE EMARANHADOS NEUROFIBRILARES	102
III.6.1 - PROCESSO: CASPASE-CLIVAGEM DA TAU.....	104
III.6.2 - PROCESSO: DIVISÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR	105
III.6.3 - PROCESSO: FORMAÇÃO DE FILAMENTOS	106
III.6.4 - PROCESSO: FOSFORIZAÇÃO DA TAU	107
III.6.5 - PROCESSO: DESCONEXÃO DOS MICROTÚBULOS.....	108
III.6.6 - PROCESSO: FORMAÇÃO DE EN'S.....	109
III.6.7 - PROCESSO: MORTE NEURONAL	111
IV. RESULTADOS ENCONTRADOS	112
IV.1 - EXPERIMENTOS DE VALIDAÇÃO	112
IV.1.1 - O FUNCIONAMENTO DA BHE.....	112
IV.1.2 - A INFLUÊNCIA DO COLESTEROL DA DIETA NOS NÍVEIS DE APOE NO CÉREBRO.....	117
IV.1.3 - A INFLUÊNCIA DO COLESTEROL DA DIETA NO METABOLISMO DO A β	118
IV.1.4 - NÍVEIS DE β -AMILÓIDE	118
IV.1.5 - AGREGAÇÃO DO A β	122
IV.1.6 - FORMAÇÃO DOS CANAIS DE CÁLCIO	125
IV.1.7 - A INFLUÊNCIA DO COLESTEROL DA DIETA NA FORMAÇÃO DE PNS'S.....	126
IV.1.8 - CONFIGURAÇÃO DAS MPS'S.....	129
IV.1.9 - FORMAÇÃO DE EN'S.....	133
IV.2 - TAXAS DE APOPTOSE.....	135

IV.3 - EXPERIMENTOS DE TESTE DE HIPÓTESES.....	139
IV.3.1 - A INFLUÊNCIA DA CONFIGURAÇÃO DAS MPS NO DESENVOLVIMENTO DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DA DA	139
IV.3.2 - INFLAMAÇÃO	142
IV.3.3 - A INFLUÊNCIA DE ALTERAÇÕES DA DIETA NO DESENVOLVIMENTO DA DA.....	144
IV.4 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	152
IV.5 - CONCLUSÕES.....	152
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155
VI. ANEXO I.....	163
VII. ANEXO II	164



O neurônio (BEAR, 2000).

LISTA DAS FIGURAS

O neurônio (BEAR, 2000).....	ix
Figura I.1: Expectativa de vida ao nascer (IBGE, 2002).....	2
Figura I.2: Distribuição da população idosa no mundo (IBGE, 2002).....	2
Figura I.3: Percentual da população idosa no estado do Rio de Janeiro e no Brasil (IBGE, 2002).	3
Figura II.1: Alois Alzheimer.....	12
Figura II.2: Taxas estimadas de incidências de casos de demência e de DA nos EUA (GAO, 1998).	15
Figura II.3: Distribuição das doenças mentais em idosos (HERRERA, 1998).	16
Figura II.4: Comparação entre um cérebro normal e o de um paciente de Alzheimer (KANDEL, 2000).	18
Figura II.5: Principais alterações de comportamento em pacientes com demência.	22
Figura II.6: Esquema gráfico dos EN's e PNS's.	27
Figura II.7: Formação das PNS's e dos EN's (KANDEL, 2000).	28
Figura II.8: Localização das PNS's e dos EN's (KANDEL, 2000).	30
Figura II.9: Evolução das áreas atingidas pela Doença de Alzheimer (KANDEL, 2000). .	31
Figura II.10: Distribuição do alelo $\epsilon 4$ na população em geral.....	33
Figura II.11: Distribuição do alelo $\epsilon 4$ na população com Alzheimer.....	33
Figura II.12: Maiores ocorrências encontradas para cada um dos alelos da apoE.	34
Figura II.13: Menores ocorrências encontradas para cada um dos alelos da apoE.	34
Figura II.14: Vias α e β da clivagem da PPA (KANDEL, 2000).	37
Figura II.15: Modelo de sinapse química (adaptado de BEAR).	41
Figura II.16: Liberação de neurotransmissores por exocitose. (1) A vesícula sináptica carregada com neurotransmissores, em resposta a (2) um influxo de Ca^{2+} através dos canais de cálcio, (3) liberam seu conteúdo na fenda sináptica, através da fusão da membrana da vesícula com a membrana pré-sináptica (adaptado de BEAR, 2000).	42
Figura II.17: Mensageiros secundários gerados pela quebra do PIP_2 . (1) Proteínas-G ativadas estimulam a fosfolipase C (PLC). (2) A PLC quebra o PIP_2 em DAG e IP_3 . (3) A DAG estimula a enzima proteína quinase C (PKC). (4) IP_3	

estimula a liberação de Ca^{2+} dos depósitos intracelulares (adaptado de BEAR, 2000).	44
Figura II.18: Representação da membrana plasmática sináptica.	48
Figura II.19: Comparação entre FC's e FE's de pessoas jovens e idosas. Os pontos menores representam a $\text{A}\beta$ e os maiores o colesterol.	48
Figura II.20: Seqüência de eventos da hipótese da cascata amilóide.	55
Figura III.1: Representação da doença de Alzheimer em forma de fluxograma.	62
Figura III.2: Representação gráfica do método de aproximação de Euler.	68
Figura III.3: Causas da Doença de Alzheimer.	72
Figura III.4: Explosão do processo de Formação de Alterações Histopatológicas.	73
Figura III.5: Diagrama geral do processo de desenvolvimento da Doença de Alzheimer	74
Figura III.6: Diagrama geral do Metabolismo do Colesterol.	76
Figura III.7: Explosão do processo de Metabolismo do Colesterol.	77
Figura III.8: Entrada de Colesterol no SNC.	79
Figura III.9: Controle do Nível de Colesterol no SNC.	81
Figura III.10: Síntese da apoE.	84
Figura III.11: Configuração das MPS's.	87
Figura III.12: Formação de Placas Neuríticas Senis.	88
Figura III.13: Explosão do processo de Formação de Placas Neuríticas Senis.	89
Figura III.14: Processamento da PPA.	92
Figura III.15: Exportação do $\text{A}\beta$.	94
Figura III.16: Interação do $\text{A}\beta$ com a membrana plasmática (ARISPE, 2002)	96
Figura III.17: Degradação do $\text{A}\beta$.	97
Figura III.18: Modelo da formação fibrilar amilóide mediada por gangliosídeos. (KAKIO, 2002)	98
Figura III.19: Agregação e Fibrilação do $\text{A}\beta$.	100
Figura III.20: Evolução das lesões características da DA (KANDEL, 2000).	101
Figura III.21: Formação de PNS's.	102
Figura III.22: Formação de Emaranhados Neurofibrilares.	102
Figura III.23: Formação de Emaranhados Neurofibrilares.	103
Figura III.24: Caspase-clivagem da Tau.	105
Figura III.25: Divisão e Proliferação Celular.	106
Figura III.26: Formação de Filamentos.	107

Figura III.27: Fosforização da Tau.....	108
Figura III.28: Desconexão dos Microtúbulos.	109
Figura III.29: Formação de EN's.	110
Figura III.30: Processo de formação de EN's. (I) O A β estimula a ação da caspase-clivagem da Tau. (II) Após a caspase-clivagem, a Tau adota a conformação MCI. (III) A alteração da conformação aumenta a formação filamentososa e a agregação da Tau. (IV) A Tau é hiperfosforizada e dissociada do microtúbulo. (IV) Ocorre a formação do EN (adaptado de RISSMAN, 1993).....	110
Figura III.31: Morte Neuronal.	111
Figura IV.1: Evolução do percentual de colesterol total que penetra no SNC.....	114
Figura IV.2: Comparação entre o colesterol esperado e o colesterol no SNC, com dieta de 300mg de colesterol.....	116
Figura IV.3: Comparação entre o colesterol esperado e o colesterol no SNC, com dieta de 600mg de colesterol.....	116
Figura IV.4: Níveis de A β com dieta de 300mg de colesterol.	119
Figura IV.5: Níveis de A β com dieta de 600mg de colesterol.	119
Figura IV.6: Comparação entre os níveis de A β para as dietas de 300mg e de 600mg de colesterol diários.....	121
Figura IV.7: Formação de PNS's e EN's, para o ϵ 4, com 600mg de colesterol e agregação do A β	122
Figura IV.8: Formação de PNS's e EN's, para o ϵ 4, com 600mg de colesterol e inibição da agregação do A β	123
Figura IV.9: Alterações na MPS, para o ϵ 4, com 600mg de colesterol e inibição da agregação do A β	124
Figura IV.10: Níveis de A β , para o ϵ 4, com 600mg de colesterol e inibição da agregação do A β	124
Figura IV.11: Formação de canais de cálcio em função do colesterol da MPS.	125
Figura IV.12: Taxa de inserção do A β na MPS, segundo JI (2002).....	126
Figura IV.13: Formação de PNS's, para cada alelo da apoE, com dieta de 300mg de colesterol.....	127
Figura IV.14: Formação de PNS's, para cada alelo da apoE, com dieta de 600mg de colesterol.....	127
Figura IV.15: Formação de EN's, para cada alelo da apoE, com dieta de 300mg de colesterol.....	128
Figura IV.16: Formação de EN's, para cada alelo da apoE, com dieta de 600mg de colesterol.....	128

Figura IV.17: Alterações no colesterol da MPS, para o alelo $\epsilon 2$, com dieta de 300mg de colesterol diários.....	130
Figura IV.18: Alterações no colesterol da MPS, para o alelo $\epsilon 2$, com dieta de 600mg de colesterol diários.....	130
Figura IV.19: Alterações no colesterol da MPS, para o alelo $\epsilon 3$, com dieta de 300mg de colesterol diários.....	131
Figura IV.20: Alterações no colesterol da MPS, para o alelo $\epsilon 3$, com dieta de 600mg de colesterol diários.....	131
Figura IV.21: Alterações no colesterol da MPS, para o alelo $\epsilon 4$, com dieta de 300mg de colesterol diários.....	132
Figura IV.22: Alterações no colesterol da MPS, para o alelo $\epsilon 4$, com dieta de 600mg de colesterol diários.....	132
Figura IV.23: Formação de PNS's e EN's, para o $\epsilon 2$, com 600mg de colesterol diários..	134
Figura IV.24: Formação de PNS's e EN's, para o $\epsilon 3$, com 600mg de colesterol diários..	134
Figura IV.25: Formação de PNS's e EN's, para o $\epsilon 4$, com 600mg de colesterol diários..	135
Figura IV.26: Taxas médias de prevalência de demência por região e faixa etária (LOPES, 2002).....	136
Figura IV.27: Apoptose, para cada alelo da apoE, com colesterol da dieta igual a 300mg diários.....	137
Figura IV.28: Apoptose, para cada alelo da apoE, com colesterol da dieta igual a 300mg diários.....	137
Figura IV.29: Média das taxas de apoptose dos diferentes alelos do apoE.....	138
Figura IV.30: Média entre as taxas de incidência de demência e a taxa de apoptose para o alelo $\epsilon 4$	139
Figura IV.31: Alterações histopatológicas, para o $\epsilon 4$, com 600mg de colesterol e sem alterações na MPS.....	140
Figura IV.32: Alterações para o $\epsilon 4$, com 600mg de colesterol e alterações na MPS.....	141
Figura IV.33: Alterações histopatológicas, para o $\epsilon 4$, com 600mg de colesterol e sem geração de $A\beta$	142
Figura IV.34: Alterações no colesterol da MPS, para o $\epsilon 4$, com 600mg de colesterol, sem inflamação.....	143
Figura IV.35: Alterações histopatológicas, para o $\epsilon 4$, com 600mg de colesterol e sem inflamação.....	144
Figura IV.36: Alterações histopatológicas para o alelo $\epsilon 2$, na dieta de 300mg diários por toda a vida.....	145
Figura IV.37: Alterações histopatológicas, com o $\epsilon 2$ e 300mg de colesterol diários, acrescidos de 300mg dos 30 aos 50 anos.....	146

Figura IV.38: Alterações histopatológicas para o alelo $\epsilon 3$, na dieta de 300mg diários por toda a vida.....	146
Figura IV.39: Alterações histopatológicas, com o $\epsilon 3$ e 300mg de colesterol diários, acrescidos de 300mg dos 30 aos 50 anos.	147
Figura IV.40: Alterações histopatológicas para o alelo $\epsilon 4$, na dieta de 300mg diários por toda a vida.....	147
Figura IV.41: Alterações histopatológicas, com o $\epsilon 4$ e 300mg de colesterol diários, acrescidos de 300mg dos 30 aos 50 anos.	148
Figura IV.42: Alterações histopatológicas para o alelo $\epsilon 2$, na dieta de 600mg diários, durante toda a vida.....	149
Figura IV.43: Alterações histopatológicas com o alelo $\epsilon 2$ e 600mg diários de colesterol, com redução de 300mg a partir dos 50 anos.	149
Figura IV.44: Alterações histopatológicas para o alelo $\epsilon 3$, na dieta de 600mg diários, durante toda a vida.....	150
Figura IV.45: Alterações histopatológicas com o alelo $\epsilon 3$ e 600mg diários de colesterol, com redução de 300mg a partir dos 50 anos.	150
Figura IV.46: Alterações histopatológicas para o alelo $\epsilon 4$, na dieta de 600mg diários, durante toda a vida.....	151
Figura IV.47: Alterações histopatológicas com o alelo $\epsilon 4$ e 600mg diários de colesterol, com redução de 300mg a partir dos 50 anos.	151

LISTA DAS TABELAS

Tabela II.1:	Distribuição da ocorrência dos alelos da apoE entre dois grupos populacionais. O Grupo 1 contém portadores de DA tardia, enquanto o Grupo 2 possui indivíduos que não possuem nenhum tipo de doença neurodegenerativa.....	35
Tabela II.2:	Efeito da dieta de hipercolesterolemia nos níveis de colesterol no plasma e no SNC, no total de depósitos A β e nos níveis relativos de vários tipos de A β no SNC (REFOLO, 2000).....	50
Tabela II.3:	Efeito da dieta de hipocolesterolemia nos níveis de A β no SNC (REFOLO, 2001).....	51
Tabela IV.1:	Comparação entre o colesterol total no sangue e no SNC, em diferentes dietas (REFOLO, 2000).....	113
Tabela IV.2:	Comparações entre dietas normais e de hipercolesterolemia (HOWLAND, 1998).....	117
Tabela IV.3:	Comparações entre dietas normais e de hipercolesterolemia, encontradas na simulação.....	118
Tabela IV.4:	Comparações entre os níveis de A β encontrados na simulação, nas dietas normais e de hipercolesterolemia.....	120
Tabela IV.5:	Comparação entre os níveis de A β , na dieta normal e de hipercolesterolemia (REFOLO, 2000).....	121
Tabela IV.6:	Comparações entre as taxas de apoptose entre as dietas normal e de hipercolesterolemia.....	138

LISTA DE SÍMBOLOS

$\epsilon 2$	Alelo $\epsilon 2$ da apoE
$\epsilon 3$	Alelo $\epsilon 3$ da apoE
$\epsilon 4$	Alelo $\epsilon 4$ da apoE
α PPA	Proteína precursora amilóide clivada no ponto α
A β	Peptídeo β -amilóide
apoE	Apolipoproteína E
BHE	Barreira hemato-encefálica
Ca ²⁺	Íon de cálcio
DA	Doença de Alzheimer
EN's	Emaranhados neurofibrilares
FC	Folha citofacial (da membrana plasmática)
FE	Folha exofacial (da membrana plasmática)
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
HDL	Lipoproteína de alta densidade
MPS	Membrana Plasmática Sináptica
PNS's	Placas neuríticas senis
PPA	Proteína precursora amilóide
PS1	Proteína presenilina 1
PS2	Proteína presenilina 2
SNC	Sistema nervoso central
TPm	Transição de poro mitocondrial

I. INTRODUÇÃO

“Hoje em dia, o estágio do conhecimento sobre a DA talvez possa ser resumido da seguinte forma: conhecemos muito bem a história natural da doença, temos uma semiologia clínica e neuropsicológica razoável para identificá-la e classificar seus estágios, conhecemos a sua neurohistopatologia bastante bem e há evidências muito fortes de que uma proteína β -amilóide e seu precursor APP estejam envolvidos no processo degenerativo. Alguns fatores genéticos já são também conhecidos. No entanto, esse corpo de conhecimentos ainda não se traduziu em técnicas de manejo que evitem o aparecimento da doença ou que combatam etiologicamente a sua fisiopatologia de modo a curar os pacientes já acometidos pela demência.” (J. LAKS, 1998)

Durante o último século, a humanidade evoluiu em um ritmo inédito em toda a sua história, tanto na área tecnológica, quanto nas áreas médica, sanitária e de produção de alimentos. Agregado a esse processo de desenvolvimento, observou-se um aumento na expectativa de vida, que subiu acentuadamente em alguns países. Em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, houve um salto de cerca de 25 anos nessa expectativa, que passou de aproximadamente 50 anos em 1900 para cerca de 75 anos em 2000 (KANDEL, 2000). No Brasil, da década de 80 até agora, o salto foi de 6 anos na expectativa de vida geral, passando de 62,7 anos para 68,9 anos (IBGE, 2002). Outras projeções podem ser vistas na *figura I.1* (IBGE, 2002)

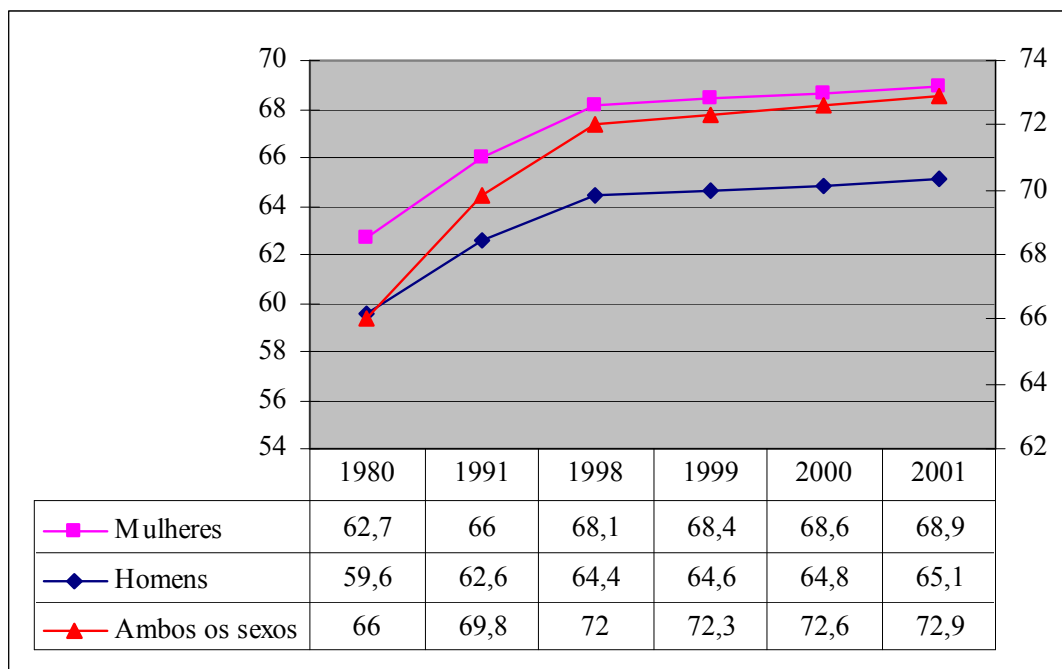


Figura I.1: Expectativa de vida ao nascer (IBGE, 2002).

Em 1950, existiam cerca de 204 milhões de idosos no mundo e, cinco décadas depois, este contingente alcançava 579 milhões de pessoas, através de uma taxa de crescimento de cerca de 8 milhões de idosos por ano. Da população idosa mundial, atualmente, 58% pertencem aos países do terceiro mundo. Segundo o IBGE, as projeções indicam que em 2050 a população idosa será de 2,1 bilhão de pessoas, ou um quinto da população mundial, e a grande maioria (65%) continuará a pertencer aos países em desenvolvimento (*figura I.2*) (IBGE, 2002).

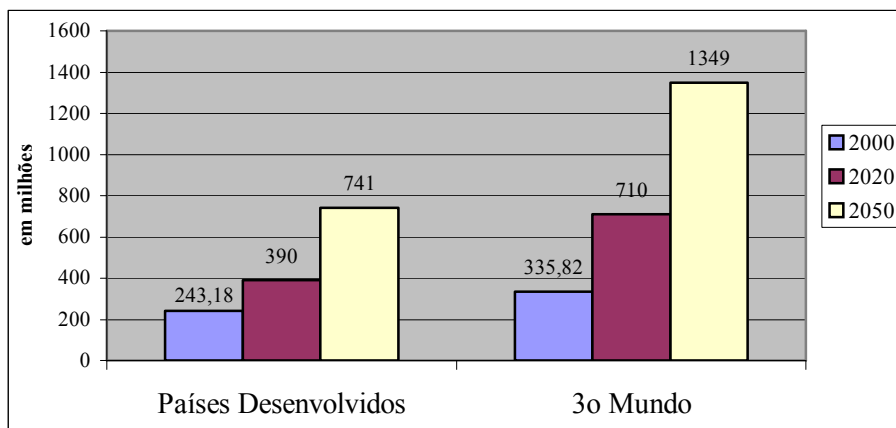


Figura I.2: Distribuição da população idosa no mundo (IBGE, 2002).

Limitando a análise ao Brasil, podemos estimar que, nos próximos 20 anos, a população idosa poderá ultrapassar os 30 milhões de pessoas, representando quase 13% da população (HERRERA, 1998). Em 2000, a população com 60 anos ou mais era de 14,5 milhões de pessoas, ou 8,6% do total, contra 10,7 milhões, ou 7,3% do total, em 1991 (IBGE, 2002).

Dentre as capitais do país, o Rio de Janeiro se destaca como a que possui a maior proporção de idosos. Enquanto no Brasil a proporção é de 8,6 idosos para cada 100 habitantes, no nosso município eles representam, atualmente, 10,7% da população total¹. A evolução das taxas de crescimento no estado do Rio de Janeiro e no Brasil, nas três últimas décadas, encontram-se na *figura I.3* (IBGE, 2002). No município do Rio de Janeiro, esse percentual sobe para 12,83, em 2000.

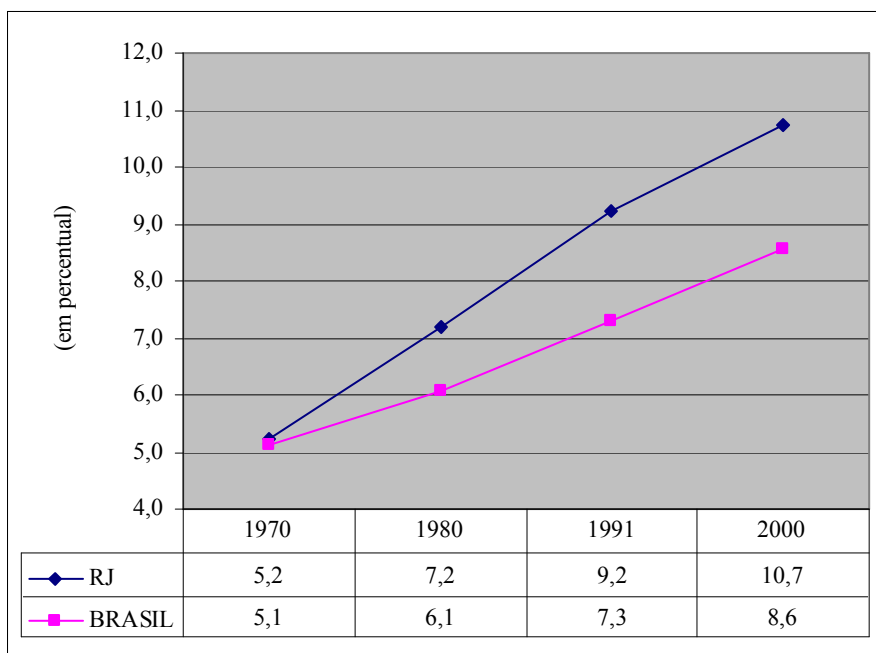


Figura I.3: Percentual da população idosa no estado do Rio de Janeiro e no Brasil (IBGE, 2002).

Se, por um lado, o aumento da longevidade da população mundial pode ser visto como uma grande conquista, por outro surge uma nova e inesperada epidemia: a demência senil. Dentre as demências que ocorrem na velhice, a mais comum é aquela conhecida como *Doença de Alzheimer* (DA), que atinge 7% das pessoas com mais de 65 anos e até 40% das

¹ Considerando-se como idoso aquele com 60 anos ou mais.

pessoas acima de 80 anos². Calcula-se também que ela seja responsável por algo entre 60 a 70% de todas as demências senis, sendo, depois da depressão, o distúrbio psicogeriatrico mais freqüente (KANDEL, 2000).

Em 1998, a DA foi a nona causa de morte nos EUA³, sendo a quarta causa de mortes de adultos naquele país, onde cerca de 5 milhões de pessoas sofrem deste mal⁴. No mundo, são cerca de 15 milhões de pessoas com DA e no Brasil, onde atualmente existem cerca de 15 milhões de idosos, 1,5 milhões de pessoas sofrem dessa doença. E a previsão é de que mais de 22 milhões de pessoas estejam afetadas em 2025, o que corresponderá a 10% de todas as pessoas com mais de 65 anos e quase 50% das pessoas acima de 80 anos, acompanhando o aumento da expectativa de vida da população⁵ (GUTERMAN, 1998, EDELSTEIN-KESHET, 2002).

Além da enorme carga para as famílias, já que, cedo ou tarde, a maioria dos pacientes torna-se incapaz de cuidar de si mesmo, a doença sobrecarrega os sistemas de saúde. Por essa razão, ela pode ser considerada um dos maiores problemas de saúde pública atual. Para o governo americano, por exemplo, o custo com o tratamento de pessoas acometidas desse mal foi estimado em cerca de 40 bilhões de dólares ao ano⁶. Não por coincidência, em 1978, foram alocados 5,1 milhões de dólares para pesquisas nessa área, montante que subiu para 123,4 milhões de dólares em 1989 (KANDEL, 2000).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) prevê que, em cerca de 25 anos, pela primeira vez na história, teremos mais idosos do que crianças no planeta. Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), a quantidade de idosos no mundo inteiro é cada vez maior e essa tendência vai se acelerar ainda mais neste século.

² Dados para os EUA.

³ Segundo o National Vital Statistics Reports, vol 48, número 11 (in GUTERMAN, 1998).

⁴ Estimativa de 1998 (GUTERMAN, 1998)

⁵ Segundo o *National Institute on Aging* e a *Alzheimer Association*, dos EUA (in GUTERMAN, 1998).

⁶ Estimativa de 2000 (KANDEL)

I.1 - OBJETIVO DO TRABALHO DE PESQUISA

Experimentos biológicos são tradicionalmente conduzidos *in vivo* ou *in vitro*. Porém, recentemente, notou-se um aumento no interesse por experimentos *in silico*. Esses sistemas consistem de simulações computacionais detalhadas, que proporcionam uma plataforma inicial ideal para o teste de hipóteses ou mesmo a triagem de drogas, identificando de forma rápida as vias terapêuticas mais promissoras e rejeitando as demais. Sistemas *in silico* não pretendem substituir os experimentos biológicos tradicionais, mas sim complementá-los, ajudando a identificar relacionamentos chave difíceis de se verificar em sistemas biológicos complexos (EDELSTEIN-KESHET, 2002).

Este trabalho propõe a construção de um modelo matemático-computacional de simulação, que represente as alterações fisiológicas decorrentes da DA. A patologia da DA é gerada por uma combinação de processos, altamente conectados, que dificultam a sua compreensão. O modelo construído tem, por objetivo, facilitar o entendimento dessa doença, que pode ser considerada, por suas características, como um sistema complexo adaptativo. Além de tentar traduzir seus mecanismos principais, pretendemos ainda testar algumas hipóteses sobre seu processo de formação, encontradas na literatura consultada.

Modelar é traduzir os aspectos mais importantes dos sistemas físicos para a matemática; não é fazer um retrato completo da realidade. O grau de detalhe requerido para modelagens dinâmicas depende do problema a ser resolvido e da quantidade de dados disponíveis. Muitas vezes não é possível, ou mesmo necessário, criar-se um modelo demasiadamente preciso (FRANKS, 1972).

Na condução desse trabalho, mais do que fazer um levantamento extenso de todas as variáveis envolvidas na patologia da DA, tínhamos por objetivo explicitar, de forma clara, os sistemas principais envolvidos no desenvolvimento da doença e as principais interações entre estes. Como a proposta da simulação apresentada é a de auxiliar o entendimento de como um grande número de variáveis e sistemas se encaixam para gerar a DA, optamos por manter um nível de simplicidade que permita essa análise.

Neste trabalho, o objetivo foi a busca por resultados qualitativos que representassem o mecanismo do desenvolvimento da DA. As hipóteses para a doença são várias e nem sempre unânimes, porém a vantagem da simulação é poder testar uma grande variedade dessas hipóteses, em vários níveis de detalhes. Após ter-se realizado um levantamento do estado da arte da pesquisa atual sobre a DA, decidiu-se definir como premissa para este trabalho a hipótese de que o colesterol possui um importante papel mecanicista na patologia dessa doença. Outras hipóteses adotadas no trabalho, e não menos importantes do que essa, serão discutidas mais adiante.

I.2 - PRINCIPAIS MOTIVAÇÕES

O estudo de uma doença tão importante e a possibilidade de tentar compreendê-la melhor com o auxílio da matemática e de técnicas computacionais, por mais inusitado que isto possa parecer, foram as principais motivações da escolha do tema desta pesquisa.

Por ser uma área desafiadora e praticamente inesgotável, que desperta a curiosidade e instiga os cientistas, a pesquisa em neurociência computacional é muito atraente para um trabalho de doutorado. Seus diferentes paradigmas possibilitam o estudo e a concepção de uma gama enorme de modelos para as mais variadas aplicações.

Finalmente, a possibilidade de contribuir, ainda que de forma modesta, para a compreensão de alguns dos mecanismos que atuam nessa doença tão complexa foi motivação mais do que suficiente para propor o desenvolvimento desta pesquisa.

I.3 - ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

O capítulo 2 contém uma descrição detalhada da doença de Alzheimer, no qual está apresentada a sua semiologia, com tópicos que a descrevem mais detalhadamente, incluindo os fatores de risco mais comuns, sintomas e sinais de seu início, formas de diagnóstico e tratamentos recomendados. No mesmo capítulo, traça-se o perfil epidemiológico da DA e uma descrição minuciosa da patologia da doença, relacionando as

áreas mais afetadas pela mesma e as estruturas e substâncias envolvidas no seu desenvolvimento. Na seção Etiologia, são descritas as hipóteses mais aceitas atualmente sobre os mecanismos de desenvolvimento da DA. Detalhamos, ainda, a hipótese escolhida para o modelo construído neste trabalho: a Hipótese do Colesterol.

No capítulo 3, é feita a exposição do modelo proposto, construído a partir de todos os dados dos capítulos anteriores. Esse modelo serviu de base para a elaboração do nosso modelo matemático, desenvolvido posteriormente.

Finalmente, no capítulo 4, serão apresentados os resultados obtidos pelas simulações realizadas, juntamente com as discussões sobre esses resultados. No fechamento desta tese, apresentamos as conclusões finais e algumas sugestões para trabalhos futuros.

II. A DOENÇA DE ALZHEIMER

II.1 - HISTÓRICO

A palavra *demência* já era utilizada em contexto médico desde o século I. Anteriormente, outros termos como *estupidez* ou *letargia* também haviam sido utilizados. No século XVIII, a demência era vista como uma doença reversível, passível de ser encontrada em pessoas de qualquer idade. Pinel, em 1798, foi o primeiro a empregar o termo *deménce senile*, que iniciava a noção atual, com sintomas cognitivos predominantes e ligados à velhice. No século XIX, a demência estava ligada à senilidade e era considerada normal ao processo de envelhecimento. Foi Alzheimer quem mostrou que a demência podia atingir também os indivíduos de meia-idade e que era de fato uma doença específica (LEIBING, 1998).

No final do século XIX a doença pré-senil era considerada uma doença da mente, visão que muda com a descoberta dos marcadores de senilidade, em especial as PNS's. Para Alzheimer, as placas não eram a causa da demência senil, mas um fenômeno concomitante à involução do SNC. Além disso, ele considerava a patologia do cérebro como um processo secundário a outros fatores desconhecidos (LEIBING, 1998).

Klaepelin, o mesmo que cunhou o termo “Doença de Alzheimer”, escreveu em 1916 que a imbecilidade senil estava ligada à arteriosclerose, resultante de abuso de álcool e tabaco e de emoções fortes e persistentes, cansaço físico e opulência na vida. Para Bleuler, em 1924, a demência era resultante da preguiça. Nota-se então que, no início do século XX, a etiologia da doença estava ligada à vida da pessoa, embora a forma precoce fosse provavelmente um resultado de processos patológicos no cérebro, devido à predisposição genética. (LEIBING, 1998).

David Rothschild, em 1937, chama atenção para a incongruência entre a gravidade da patologia no cérebro e o grau dos sintomas nos processos mentais. Ele supôs que as diferenças se deviam às habilidades diferentes que cada indivíduo possui, as quais atuam

como mecanismos de compensação. A inabilidade em lidar com problemas pessoais, especialmente em relação à velhice, poderia diminuir a capacidade de compensar. Outros fatores apontados por ele como facilitadoras do processo de demência senil seriam a personalidade pré-mórbida e o estresse psicológico. Mais tarde, outros pesquisadores passaram também a considerar a personalidade como fator decisivo na etiologia da demência. Na teoria psicanalítica atual, a DA não possui etiologia social, apenas orgânica. (LEIBING, 1998)

II.2 - VARIEDADE DE DEMÊNCIAS SENIS

A demência é uma síndrome, caracterizada pelo declínio progressivo das funções intelectuais, em consequência de causas orgânicas, atingindo principalmente a memória e as capacidades cognitivas. Ela é caracterizada por um conjunto de distúrbios mentais, que evoluem progressivamente em direção a uma alteração definitiva das funções intelectuais, com prejuízo nas condutas sociais e alterações da inteligência e da personalidade (GUTERMAN, 1998).

Segundo o DSM-IV⁷, 2000, para se caracterizar a demência é necessário que o paciente exiba pelo menos duas anormalidades: perda de memória e declínio em pelo menos uma área da cognição, como linguagem, percepção, solução de problemas, julgamento, etc. Para a CID-10⁸, 1993, a demência é uma síndrome decorrente de uma doença cerebral, de natureza crônica e progressiva, na qual há perturbação de múltiplas funções corticais superiores⁹ produzindo declínio no funcionamento intelectual e interferindo na vida diária.

A demência senil, por sua vez, é a demência que ocorre a partir dos 60 anos de idade e envolve perda de memória e o desenvolvimento de deficiências cognitivas de gravidade suficiente para interferir no funcionamento social e ocupacional do doente. Dentre as demências senis mais comuns, podemos citar alguns tipos, além da doença de Alzheimer:

⁷ Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (ver referência).

⁸ Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento da CID-10 (ver referência).

⁹ Como linguagem, inteligência, juízo e memória.

- Demência vascular: O início da demência vascular é tipicamente mais precoce do que o da DA e muito menos comum do que esta, sendo mais comum em homens do que em mulheres. Resulta da ocorrência de múltiplos acidentes vasculares encefálicos, geralmente em diferentes momentos. Apresenta quadro clínico de demência mais agudo, surgindo repentinamente após o evento causador. O diagnóstico é feito por exame clínico, tomografia computadorizada e ressonância magnética de crânio, que geralmente evidenciam múltiplas lesões vasculares no córtex cerebral e estruturas subcorticais. As lesões detectadas normalmente excedem a extensão das alterações detectadas no cérebro de pessoas idosas saudáveis (DSM-IV, 2000).
- Demência da doença de Parkinson: desenvolve-se em um indivíduo com a doença de Parkinson avançada. Pode ser diferente tanto da DA quanto da demência vascular, podendo também ser a manifestação de uma co-ocorrência de uma destas e a doença de Parkinson (CID-10, 1993).
- Demência Fronto-Temporal: Consiste em um quadro degenerativo cerebral, que afeta particularmente os lobos frontal e temporal, manifestando-se normalmente na meia-idade, embora possa ocorrer em indivíduos mais velhos. Caracteriza-se clinicamente por alterações da personalidade no início da doença, deteriorização das habilidades sociais, prejuízo das funções intelectuais, da memória e da linguagem, acompanhadas de apatia e euforia, embotamento emocional, desinibição comportamental e anormalidades da linguagem, que podem se tornar tão graves que dificultam a avaliação de seu grau de prejuízo cognitivo. A imagem estrutural do cérebro revela alterações típicas de atrofia frontal e/ou temporal proeminente, e a imagem funcional pode localizar hipometabolismo fronto-temporal. O diagnóstico específico é geralmente estabelecido na autópsia com a identificação dos característicos corpos de Pick. Clinicamente, se confunde com os casos atípicos de doença de Alzheimer ou de outras demências que afetam os lobos frontais (CID-10, 1993, DSM-IV, 2000).
- Demência de Corpos de Lewy: corresponde à terceira causa mais freqüente de demência, sendo uma afecção neurodegenerativa caracterizada por declínio intelectual, alucinações visuais, flutuações do nível de atenção e parkinsonismo.

Caracteriza-se clinicamente por um quadro de demência em que ocorrem flutuação dos déficits cognitivos, em questão de minutos ou horas, alucinações visuais bem detalhadas, vívidas e recorrentes e sintomas parkinsonianos. O declínio cognitivo é progressivo e interfere na capacidade funcional do indivíduo (funções executivas, capacidade de resolução de problemas e atividades de vida diária). Na fase inicial de desenvolvimento, a atenção, as funções executivas e as habilidades visuoespaciais são as mais comprometidas, com relativa preservação da memória, um fator relevante para o diagnóstico diferencial com a DA. Com a progressão da doença, entretanto, essas diferenças podem se perder, dificultando a diferenciação com outras demências. Sua evolução costuma ser mais rápida do que na doença de Parkinson (CARAMELLI, 2002).

II.3 - DOENÇA DE ALZHEIMER

Descrita pela primeira vez em 1907, por Alois Alzheimer (*figura II.1*) (1864-1915) da Universidade de Tübingen, foi redescoberta por estudo realizado na Universidade de Newcastle, na década de 1960. No seu artigo “Sobre um adoecimento estranho no córtex cerebral”, Alzheimer relata o caso clínico de uma paciente de 51 anos de idade, Sra. August D., que apresentava sintomas de perda de memória, problemas de comportamento e perda progressiva de habilidades cognitivas e motoras. A paciente faleceu cinco anos após o aparecimento da doença e, ao longo desse período, apresentou sintomas de alucinação, amnésia, apraxia¹⁰, afasia¹¹ e agnosia¹² (LEIBING, 1998). A necrópsia de seu cérebro revelou a existência de placas neuríticas senis e emaranhados neurofibrilares no neocórtex e no hipocampo, sendo essas alterações características da Doença de Alzheimer.

¹⁰ Prejuízo na capacidade de executar atividades motoras.

¹¹ Perda da capacidade de linguagem. Pode ser de dois tipos: motora, onde ocorre perda da capacidade de expressar a linguagem; ou sensorial, quando ocorre perda da compreensão da fala.

¹² Alteração intermediária entre as sensações e a percepção, podendo ocorrer no tato, olfato e visão, incapacitando o reconhecimento de objetos.

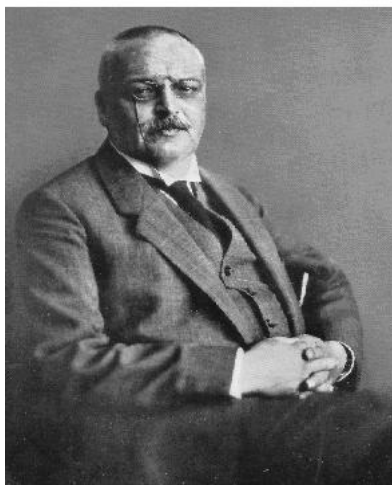


Figura II.1: Alois Alzheimer

II.4 - DESCRIÇÃO

A Doença de Alzheimer é definida como uma demência degenerativa, caracterizada por um declínio lento de funções como memória, linguagem, capacidades viso-espaciais, personalidade e cognição (LEIBING, 1998). Ela pode ser herdada, ou familiar, correspondendo à faixa de 10 a 30% dos casos, mas será sempre idiopática (DSM-IV, 2000).

A DA surge geralmente após os 65 anos, podendo, em alguns casos, iniciar-se logo aos 40. A sobrevida esperada é de 2 a 20 anos, sendo a duração média de 8 anos, dependendo da idade em que ocorre o surgimento da doença (DSM-IV, 2000).

II.4.1 - Subtipos e Especificadores

A DA pode ser classificada pela idade de seu início, o que a colocaria em um dos seguintes subtipos (DSM-IV, 2000):

- Com Início Precoce. Este subtipo é usado se o início da demência ocorre aos 65 anos, ou antes.
- Com Início Tardio. Este subtipo é usado se o início da demência ocorre após os 65 anos de idade.

II.4.2 - Etiopatogenia

Na maioria dos casos de DA, ocorre atrofia cerebral, com sulcos corticais mais largos e ventrículos cerebrais maiores do que os apresentados pelo processo normal de envelhecimento. Isto pode ser demonstrado por tomografia computadorizada ou imagem captada por ressonância magnética. O exame microscópico revela, em geral, alterações histopatológicas, incluindo placas senis, emaranhados neurofibrilares, degeneração granulovascular, perda neural e angiopatia amilóide. Corpos de Lewy são vistos ocasionalmente nos neurônios corticais (DSM-IV, 2000).

Nos primeiros anos da doença, notam-se poucos sinais motores e sensoriais. Posteriormente, no curso da doença, podem aparecer espasmos e perturbações da marcha. Em aproximadamente 10% dos indivíduos com o transtorno, ocorrem convulsões.

II.4.3 - Curso

O curso da DA tende a ser insidioso, com variação na apresentação das deficiências, sendo a confusão de idéias a principal característica do doente (ROZENTHAL, 1998). O mais comum é a ocorrência de início traiçoeiro, com déficits precoces na memória recente, seguidos pelo desenvolvimento de afasia, apraxia e agnosia, após vários anos. Alguns indivíduos podem apresentar alterações da personalidade ou maior irritabilidade nos primeiros estágios. Nos estágios posteriores da doença, os indivíduos podem desenvolver perturbações motoras e da marcha, chegando mesmo a ficarem mudos e confinados ao leito (DSM-IV, 2000).

A evolução da doença ocorre em três fases distintas (ROZENTHAL, 1998):

- Fase Amnésica: predomínio de déficit de memória, englobando as formas episódica (autobiográfica) e semântica (aprendida, não vivenciada). Nesta fase aparecem ainda alguns déficits de linguagem.

- Fase Demencial: presença de alterações cognitivas mais globais, interferindo sobre o desempenho no dia-a-dia, tornando o doente cada vez mais dependente.
- Estágio Vegetativo: inabilidade de manter cuidados básicos como alimentação, higiene e comunicação.

Clinicamente, observa-se que, no início da doença, ocorrem pequenos esquecimentos, normalmente aceitos pelos familiares como parte normal do processo de envelhecimento, mas que vão se agravando gradualmente. Os idosos tornam-se confusos, ficam agressivos, passam a apresentar distúrbios de comportamento, terminando por não reconhecer os próprios familiares. Na medida em que a doença evolui, os pacientes tornam-se cada vez mais dependentes dos familiares, passando a necessitar de supervisão integral para suas atividades diárias mais comuns. A DA costuma evoluir para um fim comum, porém com formas clínicas variáveis, de acordo com o local da lesão, as conexões afetadas e o curso da doença. (ROZENTHAL, 1998)

II.5 - EPIDEMIOLOGIA

Na virada do século XX, a expectativa de vida era menor do que 50 anos. O aumento da população idosa levou ao aumento na ocorrência de casos de doenças crônicas e degenerativas, aumentando o custo-paciente na área de saúde. Além desses, praticamente todos os adultos com Down acima de 40 anos possuem uma neuropatologia consistente com o diagnóstico da DA (ZIGMAN, 1995).

A incidência de uma doença é definida como o número de casos novos em uma população, em um período de tempo definido. Ela reflete a probabilidade de uma pessoa sadia desenvolver a doença. Para a DA, pouquíssimos estudos desse tipo foram realizados até hoje. O gráfico da *figura II.4* contém uma média da incidência de demência e DA, para diversas faixas etárias, calculada sobre dados de doze diferentes estudos (GAO, 1998).

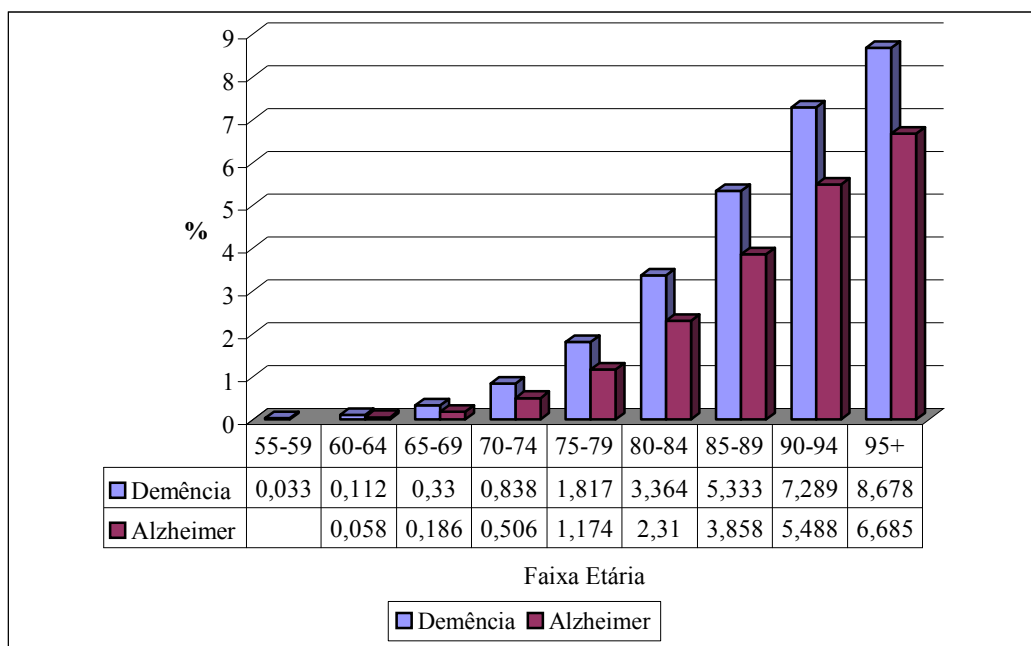


Figura II.2: Taxas estimadas de incidências de casos de demência e de DA nos EUA (GAO, 1998).

A prevalência é definida como o número de casos existentes de uma doença em uma população, em um dado instante. Depende do número de pessoas que desenvolveram a doença e da duração da mesma. Reflete a carga da doença na população e pode ser útil na estimativa de investimento na área de saúde. Para a DA, nota-se que suas taxas variam muito entre os diversos levantamentos já realizados, provavelmente devido a diferenças de técnicas de amostragem e de critérios de diagnóstico empregados em cada um deles (ZIGMAN, 1995).

JORM (1987), realizou uma meta-análise de 27 estudos sobre a prevalência da DA e constatou que a mesma dobra a cada 5,1 anos, a partir dos 60 anos de idade. Esses dados, porém, são quase todos de países desenvolvidos.

Outro trabalho, conduzido por HERRERA (1998) na cidade de Catanduva, SP, baseou-se no censo de 1996, que contabilizou 100.942 habitantes nessa cidade, em que 8% possuíam mais de 65 anos. Com os resultados obtidos por esse estudo foi possível traçar um perfil da distribuição de casos de demência dentro da realidade do Brasil. Entre outras conclusões, identificou-se um predomínio de 2:1 nos casos de demência no sexo feminino, ao mesmo

tempo em que se verificou que mais da metade dos casos de demência na população idosa correspondem a casos de DA. Também foi notada uma maior incidência de casos entre a população analfabeta e de classe social mais baixa (*figura II.5*).

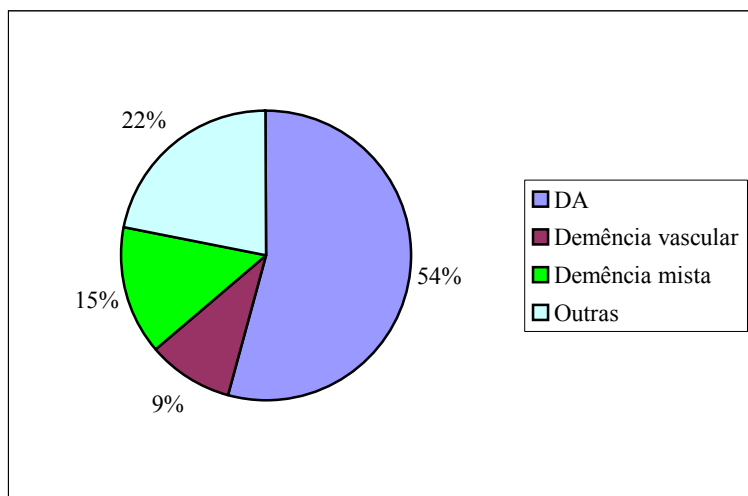


Figura II.3: Distribuição das doenças mentais em idosos (HERRERA, 1998).

II.6 - FATORES DE RISCO

II.6.1 - O fator idade

A idade é o fator de risco único mais importante para a doença de Alzheimer. Muitas alterações físicas ocorrem no cérebro com o avanço da idade: o seu peso diminui, certas populações de neurônios se reduzem por morte celular e a síntese de neurotransmissores (como a dopamina, norepinefrina e acetilcolina) também diminui. Nota-se que a prevalência da doença duplica a cada cinco anos, dos 60 aos 90 anos, tornando-se particularmente alta após os 75 anos.

O processo de envelhecimento é ainda pouco compreendido. Sabe-se que ele afeta células, tecidos e sistemas e que células normais param de se dividir e morrem, talvez seguindo algum controle genético. Uma teoria corrente supõe que os tecidos envelhecem como resultado do acúmulo de anormalidades que ocorrem devido a mutações aleatórias no DNA

de células somáticas. Outra teoria encara o envelhecimento como o resultado acumulativo de danos nos tecidos, causados pelos radicais livres (GANONG, 1993).

Leonard Hayflick (in KANDEL, 2000) sugere que uma célula pode se dividir um número limitado de vezes. Os fibroblastos humanos, por exemplo, podem se duplicar cerca de 50 vezes. Já nas tartarugas, seres que possuem alta longevidade, os mesmos podem se duplicar por cerca de 90 vezes. Em experiências de laboratório, verificou-se que a capacidade de duplicação de uma célula depende da idade do doador: células de pessoas idosas podem se duplicar muitas vezes menos do que as células de um embrião. Esse relógio biológico das células estaria, aparentemente, localizado no seu núcleo (KANDEL, 2000). Outros pesquisadores especulam que, nos mamíferos, o relógio biológico estaria localizado possivelmente no hipotálamo, que seria responsável pelo envelhecimento via algum mecanismo hormonal. Porém, nenhuma dessas teorias foi realmente comprovada ou é aceita de forma unânime (GANONG, 1993).

Uma grande variedade de alterações comportamentais ocorre com a idade, como alterações nas habilidades motoras, nos padrões de sono, na postura, na velocidade dos movimentos, entre outros. O cérebro também sofre uma série de alterações anatômicas e químicas no encéfalo e na medula. Entre as alterações morfológicas que ocorrem no cérebro durante o processo normal de envelhecimento, as mais comuns são (KANDEL, 2000):

- Atrofia: alteração na relação entre o volume das substâncias branca e cinzenta, com diminuição da última, diminuição do volume do cérebro, diminuição do número de células, diminuição do tamanho dos neurônios;
- Aumento dos sulcos e redução das circunvoluções, que se tornam mais delgadas;
- Aumento do tamanho dos ventrículos cerebrais;
- Alterações dendríticas, surgimento de placas senis, degeneração neurofibrilar;
- Redução progressiva do consumo de oxigênio e glicose, diminuindo as funções cognitivas;
- Perda neuronal, principalmente a partir dos 50 anos, em especial perda neuronal de até 25% dos neurônios motores, a partir dos 60 anos;

- Diminuição acentuada na concentração de proteínas cerebrais, ao redor dos 80 anos, com redução nos níveis de catecolaminas, dopamina e noradrenalina;

A *figura II.2*, a seguir, ilustra algumas das alterações acima citadas.

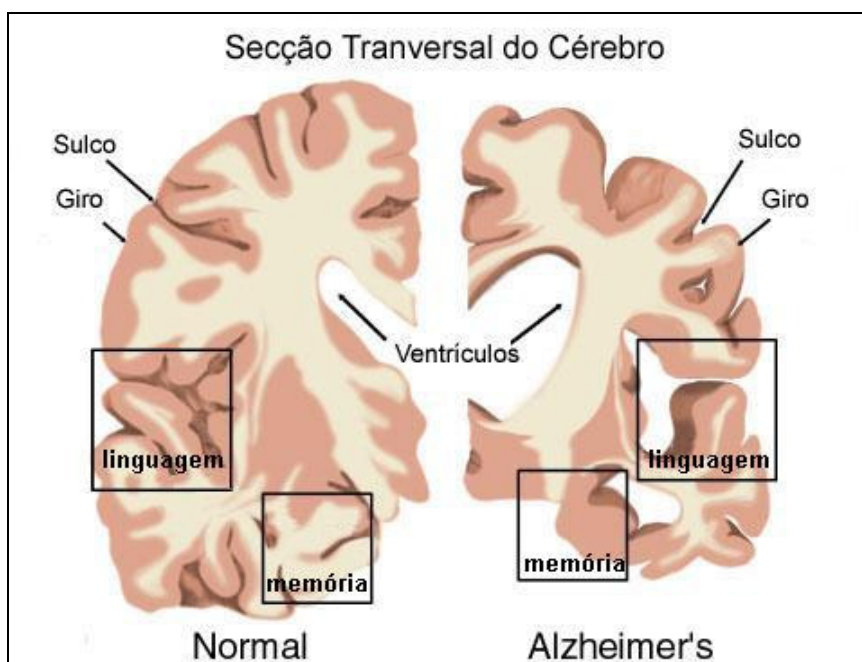


Figura II.4: Comparação entre um cérebro normal e o de um paciente de Alzheimer (KANDEL, 2000).

O envelhecimento em si, porém, não leva necessariamente ao desenvolvimento de doenças neurológicas. Muitas pessoas idosas permanecem intelectualmente intactas, outras apresentam suave declínio na memória e nas habilidades cognitivas e apenas o restante irá desenvolver algum tipo de demência. Uma pesquisa conduzida pelo Baltimore Longitudinal Study of Aging¹³ acompanhou mais de 200 pessoas por quase 40 anos. Os resultados encontrados sugerem que alterações associadas à idade, que ocorrem nos processos cognitivos como fala e aprendizado, são muito suaves e ocorrem relativamente tarde. Além disso, pequenas alterações na cognição e memória não prejudicam significativamente a qualidade de vida de muitas pessoas (KANDEL, 2000).

¹³ Do National Institute of Aging, EUA.

O motivo de tal diversidade ainda é desconhecido, sendo difícil prever, após a simples análise de um conjunto de exames clínicos, quando um quadro de diminuição da memória se manterá estável por muitos anos ou irá evoluir para uma demência mais grave.

Na DA, exames microscópicos revelam uma quantidade abundante de duas alterações físicas que caracterizam a doença e que a distingue de outras enfermidades: são as placas neuríticas senis (PNS's) e os emaranhados neurofibrilares (EN's). Infelizmente, a detecção de ambas apenas é possível na necropsia cerebral. As PNS's estão relacionadas aos sintomas de demência da doença, enquanto os EN's interferem com a integridade citoesquelética, induzindo à morte neuronal e sináptica. Essas anomalias ocorrem, mesmo que em pequena quantidade, em praticamente todos os indivíduos com mais de 60 anos, ficando confinadas às estruturas límbicas, que atuam na memória. Porém, quando ocorrem em circuitos neuronais específicos, resultam em sinais clínicos associados à velhice, como alterações na memória, na atividade motora, no humor, no padrão de sono, no apetite e nas funções neuroendócrinas, entre outras (MESULAM, 2000).

II.6.2 - Mutações genéticas

As mutações genéticas são responsáveis por um grande número de casos familiares da DA. Entretanto, a maioria dos casos da doença ocorre depois dos 65 anos e não tem nenhuma relação com a herança genética do paciente.

Comparados com a população em geral, os parentes biológicos em primeiro grau de indivíduos acometidos de DA, com início precoce, estão mais propensos a desenvolver o transtorno. A DA é herdada, em algumas famílias, como um traço dominante ligado a vários cromossomos, incluindo os cromossomos 14, 19 e 21.

A DA pré-senil tem início ainda mais prematuro, podendo ocorrer até mesmo entre os 30 e 40 anos, quando está associada aos genes que codificam as proteínas presenilina 1 (PS1), presenilina 2 (PS2) e precursora amilóide (PPA). Esses genes se encontram nos cromossomos 14, para a PS1 e a PS2, e no gene 21, onde se codifica a PPA.

A prevalência da DA também é maior em indivíduos com síndrome de Down. Alterações patológicas características da doença de Alzheimer estão presentes no cérebro de indivíduos com síndrome de Down quando estes ingressam na casa dos 40 anos, embora os sintomas clínicos de demência em geral se manifestem apenas mais tarde (DSM-IV, 2000).

Mesmo os casos de início tardio também podem ter um componente genético. Os alelos da apolipoproteína E (apoE), codificados pelo cromossomo 19, podem estar relacionados aos casos tardios familiares (DSM-IV, 2000, SOUZA, 1998).

Algumas correntes relacionam a DA a outros fatores de risco, porém esses possuem menor aceitação científica, como:

- Deficiência de estrogênio (em mulheres);
- Histórico de traumas na cabeça;
- Doenças cardiovasculares; e
- Exposição ao alumínio.

II.7 - SEMIOLOGIA

II.7.1 - Sintomas e Sinais

A sintomatologia clínica da DA consiste em disfunção cognitiva com declínio funcional e distúrbios não cognitivos, tais como: alterações de comportamento, do humor e eclosão de fenômenos psicóticos (SADAVOY, 1996).

As demências podem ser distinguidas, do ponto de vista anatômico, entre corticais e subcorticais. No caso da DA, as regiões cerebrais corticais são os locais de envolvimento primário. Disfunções nessas áreas levam a déficits no instrumental intelectual, como linguagem, funções visuo-espaciais, raciocínio matemático e memória. Com a evolução do processo, as áreas subcorticais podem ser atingidas, comprometendo o comportamento, a

atenção e o funcionamento motor. As principais funções comprometidas são (ROZENTHAL, 1998):

- Percepção e reconhecimento: alteração da acuidade olfativa;
- Atenção: comprometimento da capacidade de alternar o foco de atenção, algumas vezes em decorrência da depressão que pode surgir nas fases iniciais;
- Linguagem: dificuldades relacionadas à semântica e à formação de conceitos, dificultando o estabelecimento de conexões entre palavras e idéias. São também comuns erros perseverativos¹⁴ e semânticos, tornando o discurso irrelevante ou redundante. Nas fases mais avançadas, ocorre mutismo, parafasias¹⁵ e disartrias¹⁶. Na escrita e leitura, há dificuldade de compreensão;
- Memória: são os déficits mais precoces, uma vez que as primeiras alterações neuropatológicas ocorrem no hipocampo e no córtex entorrinal, regiões responsáveis pela memória. Dentre os vários tipos de memória, cada uma é afetada de maneira diversa, dependendo do local onde a função se localiza no córtex:
 - imediate: não é afetada;
 - de curto prazo: costuma ser a mais afetada;
 - de longo prazo: já é comprometida desde o início da doença;
 - implícita: relativamente preservada;
- Processamento visuo-espacial: dificuldade no reconhecimento de ambientes, rostos, gestos, objetos etc, que ocorre logo no início do processo;
- Processamento executivo: como depende da integração de várias funções, há comprometimento da produção executiva, que transforma a percepção em ação.

Do surgimento da doença às fases finais, podemos citar os seguintes sintomas mais comuns

¹⁴ Consiste da repetição continuada e anormalmente persistente na exposição de uma idéia.

¹⁵ São alterações da linguagem espontânea, onde esta é rica e volúvel, porém as palavras ou os fonemas não são apropriados quando, por exemplo, ocorre a troca de uma palavra por outra.

¹⁶ Consiste na dificuldade de articular as palavras.

(GUTERMAN, 1998):

- Dificuldade de memorização.
- Depressão e ansiedade, que ocorrem com mais frequência nos estágios iniciais, relacionados com a consciência e negação do paciente sobre sua condição¹⁷.
- Distúrbios do sono.
- Perda do manejo financeiro.
- Mudanças no comportamento, inclusive sexual.
- Incontinência, dificuldade de deglutição, o doente perde o comportamento de busca por água e comida.
- Delírios, alucinações e fobias.
- Distúrbios afetivos.

Alguns estudos (HOPE, 1997a, HOPE, 1997b) mostram que as principais alterações de comportamento seguem a distribuição mostrada pela *figura II.3*.

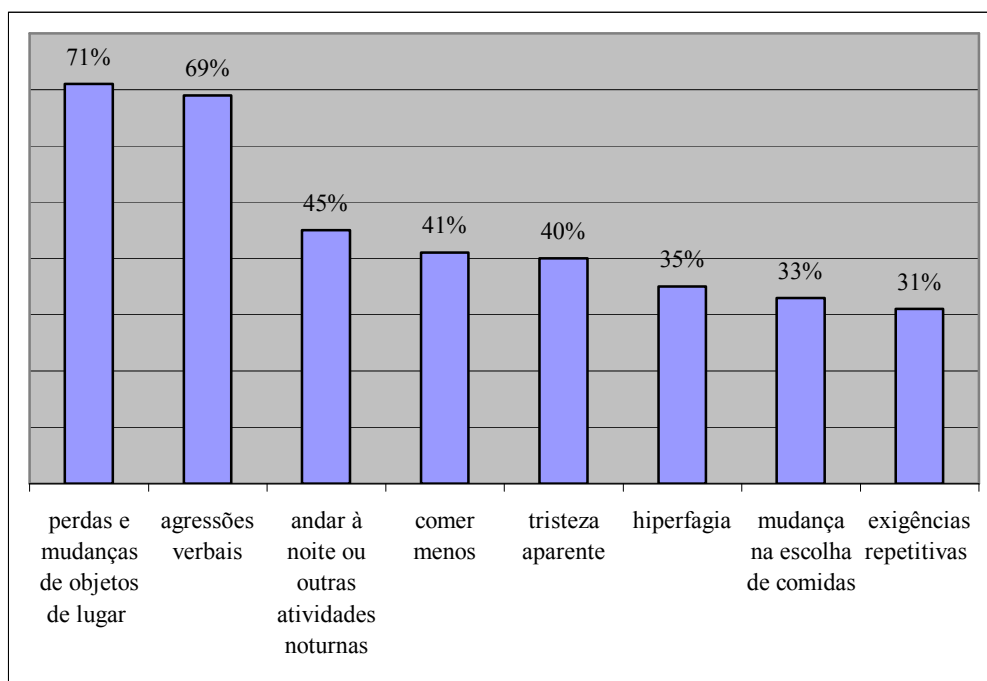


Figura II.5: Principais alterações de comportamento em pacientes com demência.

¹⁷ Esses sintomas costumam desaparecer com o avanço da enfermidade, uma vez que dependem da integridade do Sistema Nervoso Central (MARINHO, 1998).

II.8 - DIAGNÓSTICO

O diagnóstico precoce da DA é de extrema importância, sendo que normalmente as alterações clínicas se manifestam antes que algum outro indicio possa ser visualizado através de técnicas de neuroimagem. Para que o diagnóstico da demência seja realizado, alguns critérios são tomados. A maioria deles requer que o paciente esteja alerta e atento, que haja comprometimento de domínios múltiplos de função cognitiva e que tal disfunção seja clinicamente significativa, para que se possa distingui-la de alterações cognitivas relativamente menores que ocorrem com o envelhecimento normal (LEIBING, 1998).

A demência, em seu estágio inicial ou brando, é de diagnóstico difícil e com frequência não é reconhecida, ou é subestimada, principalmente quando ocorre em idosos (ENGELHARDT, 1998). Mesmo após o reconhecimento da demência, faz-se ainda necessário estabelecer o diagnóstico correto da doença que a causou, uma vez que várias doenças têm na demência a sua manifestação clínica mais proeminente.

A determinação da causa de demência desdobra-se em diversas etapas, exigindo testes específicos, exames clínicos, neurológicos e psiquiátricos minuciosos, bem como exames de laboratório, eletrofisiológicos, de neuroimagem e neuro-histopatológico, que incluem a biópsia de tecidos cerebrais (ENGELHARDT, 1998). O objetivo é excluir todas as outras doenças possíveis para identificar finalmente uma demência degenerativa. Infelizmente, o diagnóstico é probabilístico, por exclusão, apesar de possuir um razoável grau de precisão.

Alguns dos testes realizados visam medir alterações nos níveis de proteínas específicas no plasma ou no fluido cerebrospinal e a herança do alelo E4. Exames como a tomografia computadorizada e imagens de ressonância magnética podem indicar anormalidades, em especial no lobo médio-temporal. A tomografia de emissão de pósitrons é também útil, ao evidenciar a diminuição no fluxo sanguíneo nos lobos parietal e temporal e em outras áreas corticais, que ocorrem em estágios mais avançados da doença.

Um diagnóstico falso positivo pode ser mais danoso para uma pessoa e seus parentes do que um falso negativo. Isso ocorre porque muitas condições, quando não tratadas, podem

causar os sintomas que simulam uma demência como, por exemplo, o hipotireoidismo, algumas infecções e a hipercalcemia¹⁸. O diagnóstico da DA deve se basear em um processo que sistematicamente exclua outras possíveis causas dos sintomas existentes (ZIGMAN, 1995).

O tratamento dos sintomas não-cognitivos oferece a oportunidade de melhorar tanto a função, quanto alguns aspectos do prejuízo cognitivo, relacionados à falta de interesse e motivação. O seu reconhecimento e diagnóstico precoce são importantes para o controle das complicações na evolução da doença e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas adequadas (MARINHO, 1998).

II.9 - TRATAMENTO

Algumas doenças são tratáveis. Porém, no caso da doença de Alzheimer, apenas os sintomas o são. Como não existe cura para a DA, as terapias existentes focalizam os sintomas associados, como depressão, agitação, distúrbios de sono, alucinações e delírios. O objetivo básico dos tratamentos médicos é a melhora da qualidade de vida dos pacientes, para que os mesmos possam ter a maior independência possível. Por esta razão, as estratégias utilizadas tentam sempre compensar as deficiências observadas (LAKS, 1998).

Existem evidências bioquímicas, patológicas e genéticas de que o acúmulo e a agregação da proteína β -amilóide ($A\beta$) possui papel causal no desenvolvimento da DA. Especula-se que a prevenção da formação dos depósitos de $A\beta$ poderia cessar o processo da doença. Porém, dependendo do tipo de tratamento escolhido para a prevenção da formação dos depósitos, pode haver até mesmo um agravamento na progressão da doença (DAVIES, 2000). Podemos pensar na DA como uma doença análoga à arteriosclerose, uma vez que ambas dependem da idade e acumulam, de forma anormal, metabólitos normais, levando à doença. Na arteriosclerose, os depósitos de colesterol precedem os sintomas clínicos por muitos anos e, na DA, o mesmo pode ocorrer com o $A\beta$.

¹⁸ Elevação anormal na concentração sanguínea de cálcio.

Logo, o melhor tratamento para a DA não deve ser a intervenção terapêutica no momento em que os sintomas surgem, mas sua prevenção. Existe, porém, uma grande dificuldade para se formalizar algum tratamento preventivo. Dentre elas, podemos citar a falta de habilidade para previsão de quem irá desenvolver a doença, o pouco entendimento sobre qual o momento ideal para o início da terapia preventiva e a falta de substâncias seguras para a realização de estudos sobre prevenção (GOLDE, 2001).

Técnicas de reabilitação cognitiva, quando empregadas no início do processo demencial, podem contribuir para retardar o avanço da demência. Exercícios físicos, como pequenas caminhadas, ginástica em piscina e exercícios aeróbicos leves contribuem para manter a elasticidade e flexibilidade muscular, evitando a rápida rigidez dos músculos. Exercícios de memorização, como jogos de cartas, palavras cruzadas, jogos para a memória, dominó, jogos de dama, ludo, etc., contribuem para manter um funcionamento cognitivo mínimo adequado à execução das tarefas rotineiras.

II.9.1 - Tratamentos Farmacológicos

Do ponto de vista farmacológico, o desenvolvimento e utilização de novas substâncias pode ser pensado em termos de abordagens de curto, médio e longo prazo. Em longo prazo, espera-se que as pesquisas em neurogenética e neurociência encontrem a cura e as formas de prevenção da DA. Enquanto isso, os objetivos de curto e médio prazo procuram amenizar seus sintomas. Em curto prazo, busca-se o controle dos sintomas cognitivos, comportamentais e de transtornos de humor. Em médio prazo, os objetivos lidam com a neurodegeneração e o acúmulo do A β (LAKS, 1998).

Os sintomas e síndromes presentes na DA têm relação com o grau de evolução do estado cognitivo na mesma. Uma vez identificado um distúrbio tratável, é preciso ainda avaliar se os efeitos colaterais de seu tratamento podem acarretar outros estados patológicos. Esses sintomas são a principal causa de internações e asilamentos de idosos e consistem, principalmente, em depressão, agitação e psicose (LAKS, 1998).

A deficiência do sistema colinérgico é a primeira alteração a ocorrer nos neurotransmissores, sendo a mesma responsável pelo surgimento dos primeiros sinais da doença: os distúrbios de memória. Para compensar o déficit colinérgico, utilizam-se atualmente inibidores da colinesterase, mais eficazes nos estágios leve e moderado da DA. A Tacrina foi a primeira droga deste tipo a ser utilizada e apresentou um efeito muito modesto na melhora das funções cognitivas e tarefas diárias. Além disso, a mesma possui muitos e intensos efeitos colaterais. Da segunda geração de inibidores da colinesterase, destaca-se o donepezil, que ainda produz alguns efeitos colaterais, porém leves e de curta duração. Em longo prazo, esses medicamentos podem ter papel importante para reduzir a velocidade de avanço da doença (LAKS, 1998).

Alguns estudos epidemiológicos sugerem ainda que o colesterol pode influenciar o desenvolvimento da DA e que níveis altos de colesterol no plasma aumentam o risco da doença. Com a diminuição do colesterol, diminuiria a produção de β -amilóide, retardando a deposição e reduzindo o risco da DA. Dois estudos recentes (WOLOZIN, 2000, JICK, 2001) indicam a utilização da estatina na redução do risco de desenvolvimento de demência e DA. As estatinas são extremamente seguras e bem toleradas em uso crônico, sendo, por isso, mais promissoras para a prevenção primária do que outras drogas novas, que não possuem perfis seguros de longo prazo conhecidos. Estudos recentes indicam bons resultados no tratamento com estatina, utilizada para redução de colesterol em pacientes cardíacos, na prevenção da DA (PAPPOLLA, 2002).

Outras estratégias compensatórias incluem o ginkgo biloba, a vitamina E, bloqueadores de canais de cálcio, antiinflamatórios não esteróides e estrogênio, embora a eficácia dessas substâncias ainda não tenha sido totalmente confirmada por pesquisas existentes até o momento.

II.10 - PATOLOGIA

II.10.1 - Áreas afetadas pela Doença de Alzheimer

A DA consiste em um processo degenerativo, caracterizado por uma série de anormalidades que ocorrem no cérebro, afetando seletivamente neurônios de regiões específicas e causando a perda de células em certas regiões cerebrais como, por exemplo, no córtex e no hipocampo.

Em nível microscópico, a doença se caracteriza pela ocorrência das placas neuríticas senis (PNS's) no exterior dos neurônios e dos emaranhados neurofibrilares (EN's) em seu interior (*figura II.6*).

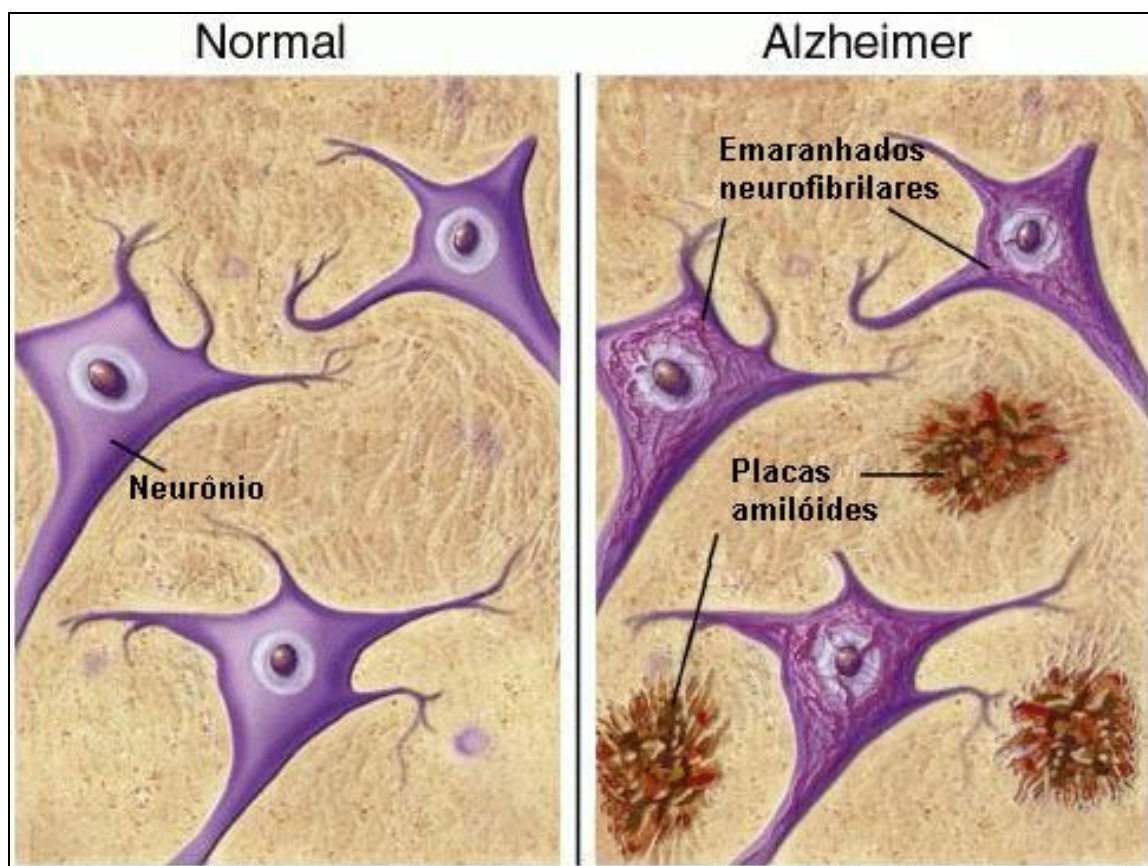


Figura II.6: Esquema gráfico dos EN's e PNS's.

As placas neuríticas senis (PNS's)¹⁹, características da doença, foram descritas por Redlich em 1898, o primeiro a relacioná-las com a demência senil (LEIBING, 1998). As PNS's são constituídas por depósitos amilóides extracelulares, formados principalmente pelo peptídeo β -amilóide ($A\beta$), circundados por axônios distróficos (*figura II.7*).

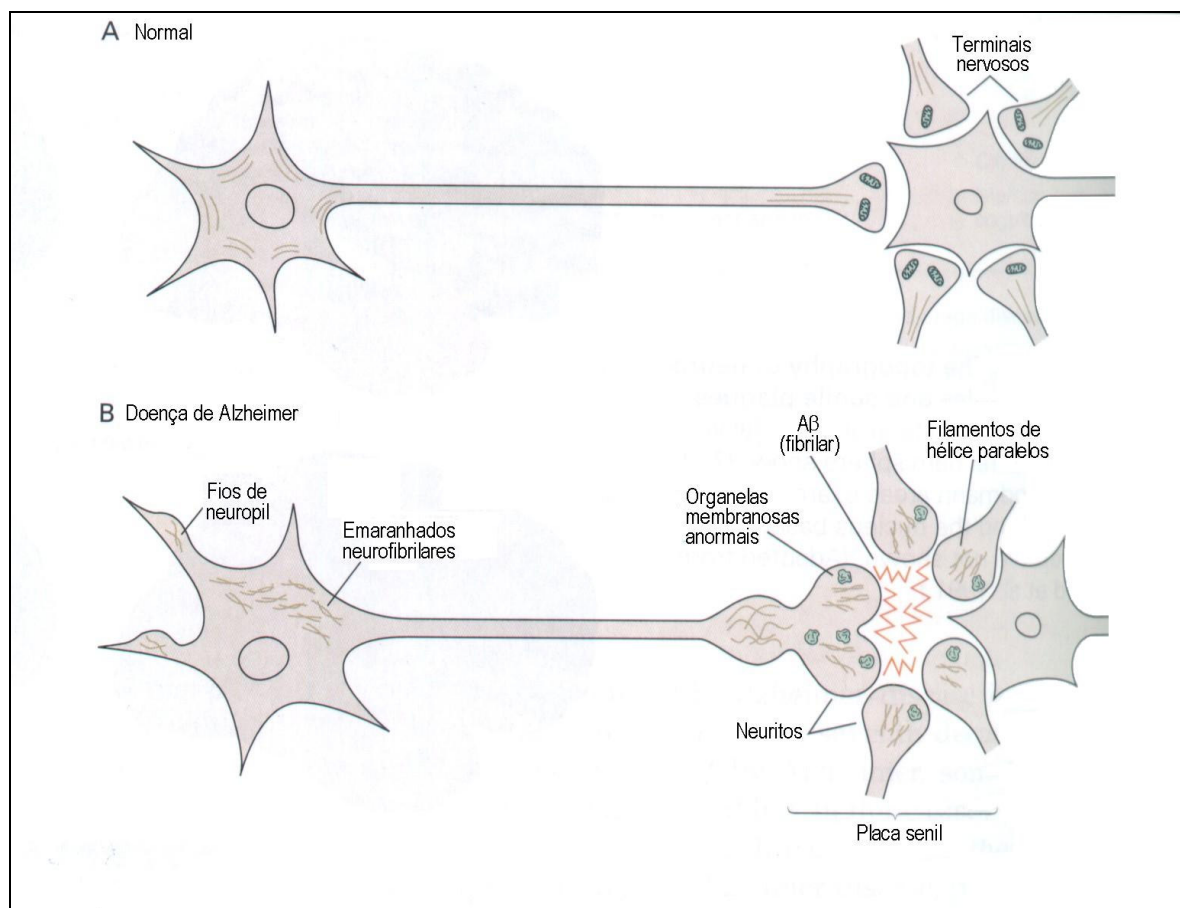


Figura II.7: Formação das PNS's e dos EN's (KANDEL, 2000).

Os EN's foram identificados por Bianchi e Fuller e podem ser encontrados tanto em pacientes da DA, quanto em pessoas saudias. Ocorrem no interior dos corpos celulares neuronais e dendritos proximais e contêm filamentos emparelhados, em formato de hélice, constituídos de isoformas hiperfosforizadas da proteína Tau. Apesar da Tau ser

¹⁹ Também chamadas de *placas amilóides*.

normalmente solúvel, a sua forma hiperfosforizada não o é. Aparecem inicialmente no córtex entorrinal e, em seguida, se estendem para o neocórtex (MESULAM, 2000)

Os EN's surgem inicialmente nas estruturas límbicas e, à medida que se tornam mais numerosos, começam a formar grupos e a aparecer em áreas paralímbicas adjacentes. Nesta fase, os emaranhados estão associados a estágios brandos de prejuízo cognitivo, esquecimento senil e Alzheimer pré-clínico. A seguir, os EN's emergem e se acumulam nas áreas envolvidas na linguagem, atenção e percepção. Os estágios baixo e alto neocortical da concentração dos EN's estão associados às demências moderadas e severas do Alzheimer, quando as funções cognitivas se tornam comprometidas (MESULAM, 2000).

Na DA, a disfunção ou morte dos neurônios está associada à ocorrência dessas anormalidades citoesqueléticas, cuja distribuição e alcance seguem padrões característicos, segundo a área e o tipo de células afetadas. Essas alterações citoesqueléticas prejudicam o funcionamento das sinapses e a viabilidade dos neurônios, levando à sua apoptose²⁰. Outra consequência é a redução dos níveis de proteínas sinápticas, que pode ser observada nas camadas onde se encontram as terminações desses neurônios (*figura II.8*).

²⁰ É uma morte celular programada, que requer energia e síntese protéica para a sua execução. Diferencia-se da morte por necrose celular, onde a célula é uma vítima passiva, já que na apoptose a célula age ativamente para levar à sua própria morte.

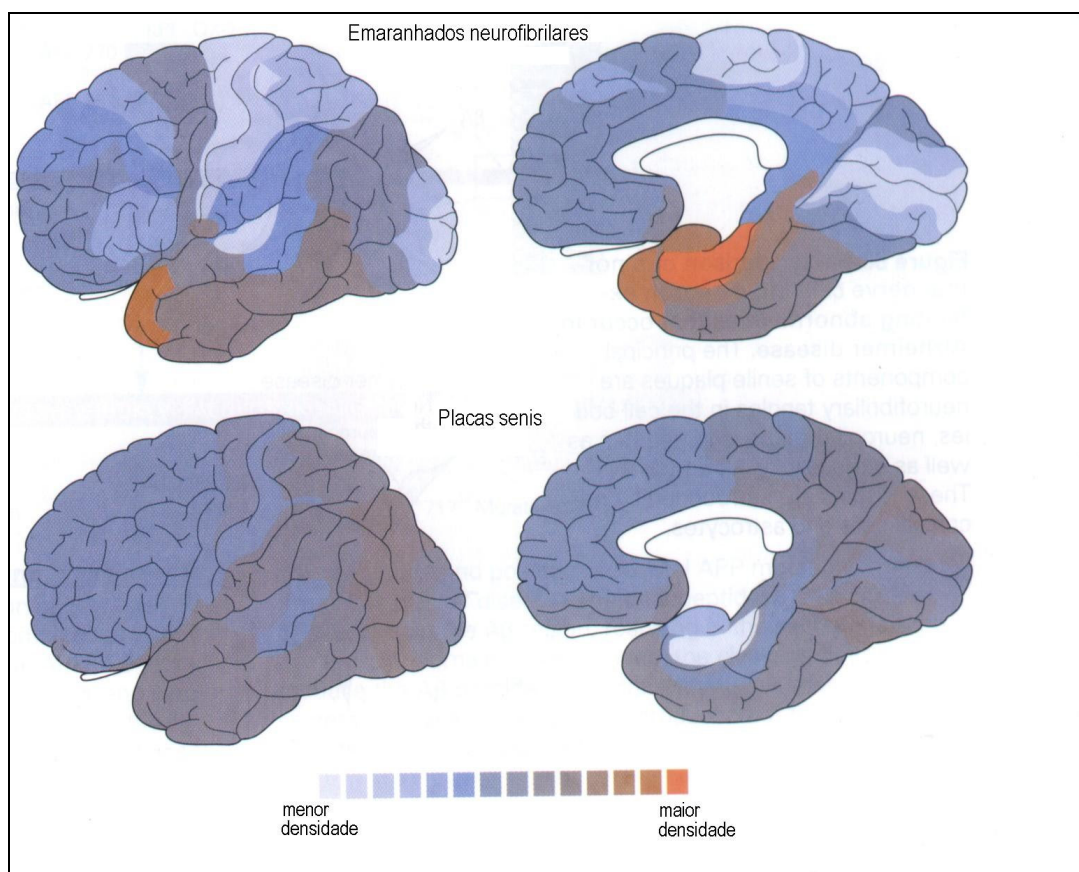


Figura II.8: Localização das PNS's e dos EN's (KANDEL, 2000).

Na área entorrinal, são atingidos os grandes neurônios piramidais glutamérgicos, ao passo que, no neocórtex, também são afetados os interneurônios. No hipocampo, principalmente nas regiões CA1 e CA2, as células piramidais são as atingidas. Nas demais áreas, são afetados principalmente os neurônios colinérgicos, resultando na diminuição dos níveis de acetilcolina e de marcadores colinérgicos (*figura II.9*).

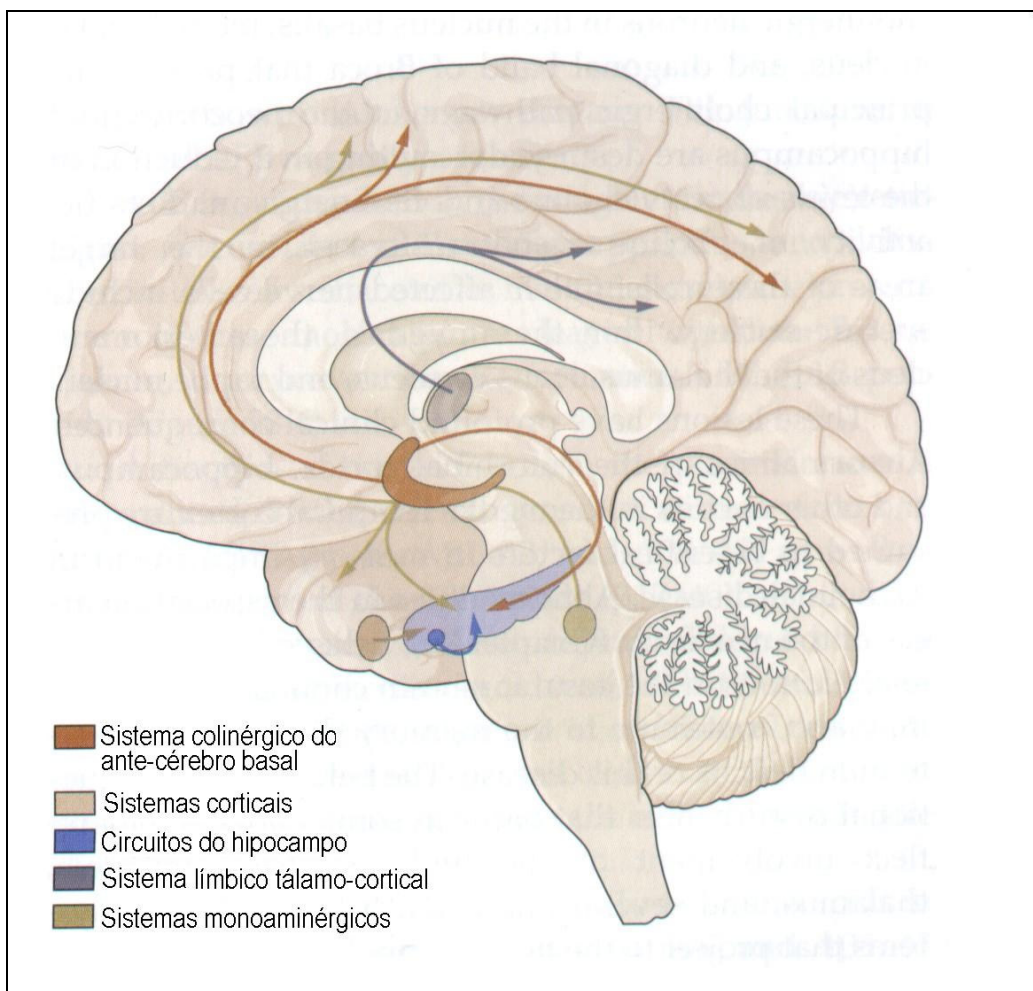


Figura II.9: Evolução das áreas atingidas pela Doença de Alzheimer (KANDEL, 2000).

II.10.2 - Estruturas e substâncias envolvidas na patologia da Doença de Alzheimer

II.10.3 - Alelos da apoE

A apoE, uma lipoproteína do plasma e também a mais comum do cérebro, vem sendo associada à DA desde 1993. Muitos polimorfismos genéticos foram apontados como fator de risco para a DA, incluindo os genes que codificam a apoE, proteínas diretamente envolvidas na regulação do metabolismo lipídico.

A expressão da apoE ocorre em vários tecidos, principalmente no fígado e cérebro. Neste último, ela é sintetizada pelas células gliais e secretada pelo fluido cérebro-espinhal. As

apolipoproteínas são moléculas transportadoras de lipídeos, que transportam o colesterol e os ácidos graxos pelo sistema circulatório e pelo cérebro. A apoE age removendo o colesterol das células, conforme o teor do mesmo aumenta. Porém, ela não é totalmente eficiente nesse processo, o que pode resultar no aumento do teor de colesterol celular.

Na periferia, a apoE atua na degradação de partículas ricas em colesterol e triglicerídeos, podendo ligar-se aos receptores de LDL (lipoproteína de baixa densidade²¹). A apoE é a principal apolipoproteína do sistema nervoso central (SNC), onde coordena a mobilização e redistribuição do colesterol durante o remodelamento da membrana, associado à plasticidade das sinapses (YANAGISAWA, 2002a, BURNS, 2002, HOWLAND, 1998).

O gene para a apoE, codificado no cromossomo 19, possui três alelos principais $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$, que codificam, respectivamente, as isoformas E2, E3 e E4 da apoE, distintas entre si. A E4 está associada a níveis altos de LDL, sendo responsabilizada pelo pequeno aumento do risco de eventos cardíacos (GOLDE, 2001). Ao mesmo tempo, vários estudos demonstram a presença da E4 em placas amilóides e degenerações neurofibrilares, relacionando-a com a ocorrência de formas tardias da DA. Especula-se que o alelo $\epsilon 4$ influencie a biologia do A β , acelerando o curso da DA em casos familiares relacionados à mutação no gene da PPA (SOUZA, 1998).

De fato, o $\epsilon 4$ é considerado um fator de risco para a DA: quanto maior a frequência de $\epsilon 4$, maior o risco de Alzheimer; porém o mecanismo que leva ao aumento desse risco ainda não é conhecido. Quando o número de alelos $\epsilon 4$ passa de zero para dois, há uma aparente alteração na gravidade, na progressão clínica da doença e na idade de manifestação. Nesses casos, a idade de início da doença apresenta uma redução média de 7 anos, na forma idiopática, e de 16 anos, na forma familiar (BURNS, 2002). Observa-se que o isoformo $\epsilon 4$ é encontrado com muito mais frequência em pacientes de DA do que em grupos de controle (YANAGISAWA, 2002a). Esse alelo ocorre em apenas 14% da população geral, embora ele apareça em 50% dos casos tardios de Alzheimer (*Figuras II.10 e II.11*) (SOUZA,

²¹ O “mau colesterol”.

1998)²². Por outro lado, o $\epsilon 2$ parece reduzir o risco e retardar o aparecimento da DA, retardando também o processo degenerativo e prolongando a sobrevivência das células nervosas afetadas (SOUZA, 1998).

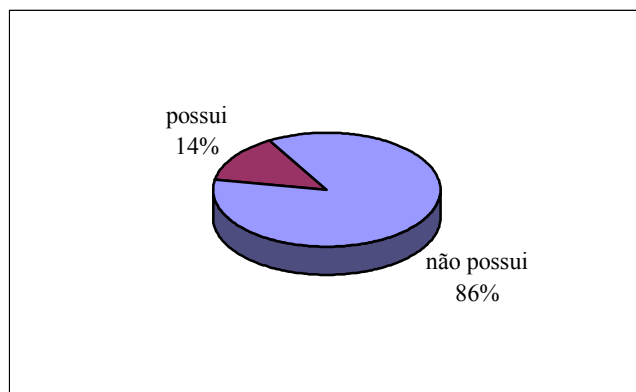


Figura II.10: Distribuição do alelo $\epsilon 4$ na população em geral.

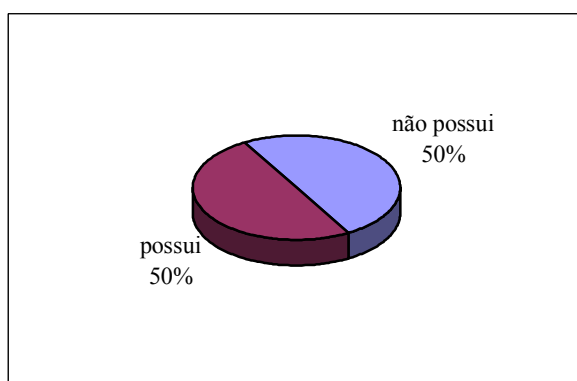


Figura II.11: Distribuição do alelo $\epsilon 4$ na população com Alzheimer.

A relação entre o alelo $\epsilon 4$ e a DA já foi comprovada em vários grupos étnicos. Em estudo realizado com homens acometidos da DA, com alto nível de colesterol total e menos de 80 anos, foram encontradas as maiores frequências do $\epsilon 4$ (JARVIK, 1995). Note-se ainda que a frequência dos alelos dessas proteínas é diferente para cada grupo racial. Podemos observar nas *figuras II.12 e II.13* que, nos asiáticos, a grande maioria da população possui o

²² A maioria dos trabalhos na literatura consultada pelos autores do artigo citado, mostra resultados obtidos em amostras reduzidas, de 12 a 186 pacientes.

alelo $\epsilon 3$, o que corrobora os baixos índices de DA em sua população. Enquanto isso, entre os afro-americanos, encontramos as maiores taxas de ocorrência do alelo $\epsilon 4$. Muito provavelmente, o genótipo do apoE será importante no futuro, constituindo um exame promissor para a identificação de indivíduos com alto risco de desenvolvimento da DA e outras formas de demência (SOUZA, 1998).

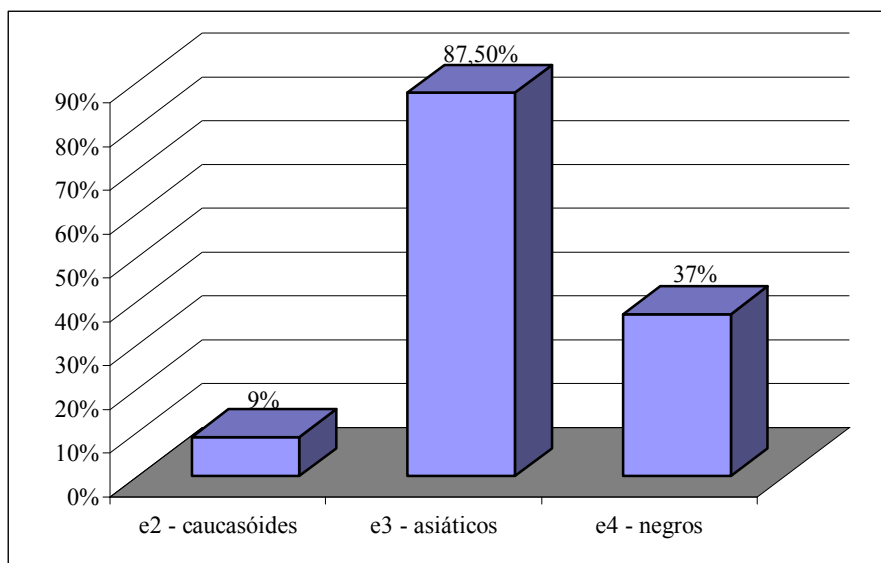


Figura II.12: Maiores ocorrências encontradas para cada um dos alelos da apoE.

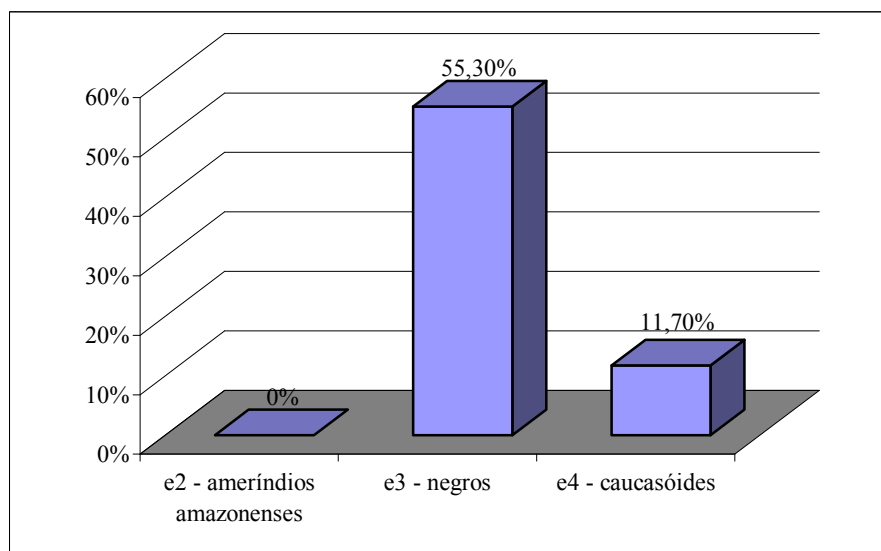


Figura II.13: Menores ocorrências encontradas para cada um dos alelos da apoE.

Na *Tabela II.1* são mostrados os dados sobre distribuição dos alelos da apoE, encontrados em trabalho realizado com uma população de 32 caucasóides em São José do Rio Preto. Verifica-se que em populações caucasóides o $\epsilon 3$ é o mais comum, ocorrendo em cerca de 77% da população em geral (SOUZA, 1998).

Tabela II.1: Distribuição da ocorrência dos alelos da apoE entre dois grupos populacionais. O Grupo 1 contém portadores de DA tardia, enquanto o Grupo 2 possui indivíduos que não possuem nenhum tipo de doença neurodegenerativa.

	Grupo 1	Grupo 2
$\epsilon 2$	0%	14%
$\epsilon 3$	75%	79%
$\epsilon 4$	25%	7%

II.10.4 - Depósitos A β

O A β é um peptídeo de 39-42 aminoácidos, derivado da clivagem do terminal C da proteína precursora amilóide PPA²³, que forma um depósito extracelular insolúvel. Na DA, a proteína A β se deposita nas placas senis e também nas paredes das veias sanguíneas cerebrais. A maior parte do A β acumulada no cérebro é altamente insolúvel e possui conformação de folha β -prega (GOLDE, 2001).

A PPA é uma glicoproteína transmembrânica, formada por cerca de 770 aminoácidos, presente nos dendritos, corpos celulares e axônios. Suas funções não são bem conhecidas, mas suspeita-se que a mesma possua uma função protetora neuronal. Ela é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso, glicolisada no complexo de Golgi e entregue à superfície celular como uma proteína de membrana integral. A PPA é codificada em um gene do cromossomo 21, perto da área afetada pela síndrome de Down. Não por coincidência,

²³ As proteínas são formadas por cadeias de aminoácidos, onde uma das pontas termina em um grupo amina (terminal N) e a outra em uma carboxila (terminal C).

portadores dessa síndrome, que sobrevivem até os 50 anos, em sua maioria sofrem de Alzheimer.

A protease lisossomal²⁴ gera fragmentos inteiros de A β que se precipitam para o meio extracelular. Podemos observar, na *figura II.14*, que a PPA se posiciona transversalmente à membrana neuronal, onde ela sofre duas clivagens proteolíticas sequenciais. Pode-se ainda observar que as duas clivagens ocorrem na face exofacial da membrana (FE). As clivagens podem ocorrer em duas vias distintas, conforme a ação seja realizada pela β -secretase ou pela α -secretase (GOLDE, 2001):

- Via β :

1ª etapa) A PPA é clivada pela β -secretase, gerando a sPPA β , um composto secretado em grande quantidade, e o CTF β , um fragmento da terminação carboxila da PPA.

2ª etapa) O CTF β é clivado pela γ -secretase, produzindo peptídeos A β de vários tamanhos, em especial o peptídeo composto por 40 aminoácidos, o A β ₄₀ e o de 42 aminoácidos, o A β ₄₂. O que resta forma o CTF γ .

- Via α :

1ª etapa) A PPA é clivada pela α -secretase, gerando a sPPA α e o CTF α .

2ª etapa) O CTF α é clivado pela γ -secretase, gerando o CTF γ e um peptídeo pequeno, chamado P3.

Atualmente, as atividades das β e γ -secretases estão sendo estudadas, uma vez que a inibição dessas diminuiria a produção de A β . Por outro lado, as vias das α e β -secretases são competitivas, então a estimulação de uma reduziria a PPA processada pela outra, podendo ser esta uma forma alternativa de ação (GOLDE, 2001).

²⁴ Enzima encontrada nos lisossomas.

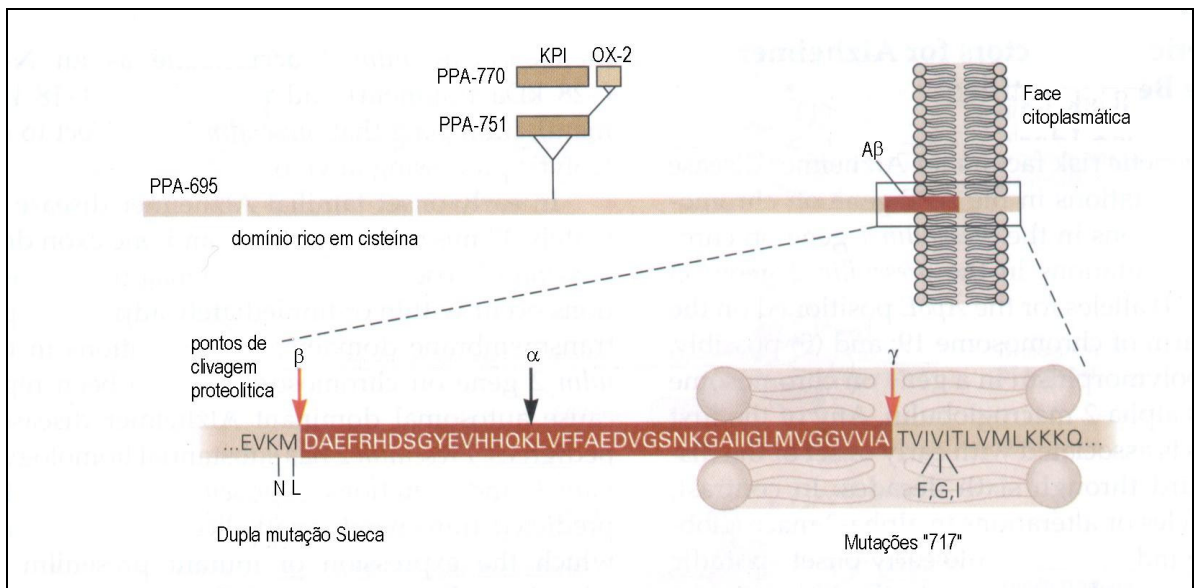


Figura II.14: Vias α e β da clivagem da PPA (KANDEL, 2000).

Observa-se que pacientes com mutações nos genes das proteínas PS1 e PS2 possuem níveis de A β mais altos do que os demais. Algumas seqüências mutantes dessas proteínas farão com que a produção de A β seja de seis a oito vezes mais alta do que as normais, sendo que a ausência de PS1 reduz dramaticamente os níveis de A β . Pode-se então especular que mutações na PPA ou em PS1 e PS2 promovam a formação das formas tóxicas do A β , centrais para a patogênese do Alzheimer, conectando o Alzheimer à alteração no processamento da PPA.

O A β é gerado normalmente pelas células e circula nos fluidos extracelulares por toda a vida, porém qualquer fator que altere o equilíbrio entre a liberação e a remoção do A β irá gradualmente aumentar seus níveis. Mesmo assim, o simples acúmulo da proteína A β não deve ser visto como a causa da DA, uma vez que outros fatores o precedem, como a ocorrência das mutações genéticas. Além disso, depósitos de A β podem ocorrer em idosos normais, na forma de uma lesão imatura, e não necessariamente induzem a uma citotoxicidade local (SELKOE, 2000).

II.10.5 - Rafts Lipídicos

Os *rafts* lipídicos consistem de microdomínios das membranas, ricos em colesterol, que contêm as proteínas PS1 e PPA e as γ -secretases.

A integridade dos *rafts* e sua composição lipídica fornecem um ambiente ótimo para o processamento da PPA. Por possuir um ambiente propício para tal, a maior parte das atividades das γ -secretases se dá aí, um indício de que estes são os locais principais da produção e acúmulo do A β nas células. Assim, a modificação dos componentes dos *rafts* poderia inibir a clivagem da PPA.

Infelizmente, ainda não foi possível determinar a composição lipídica exata dos *rafts* e apenas alguns elementos foram inferidos até agora (KAKIO, 2002). Sabe-se, porém, que o colesterol é seu componente principal, o que abre a possibilidade para que a clivagem da PPA pela γ -secretase seja dependente do mesmo. Infelizmente, ainda não existem estudos *in vivo* sobre o efeito da modulação dos níveis de colesterol na função e composição dos *rafts* (GOLDE, 2001).

II.10.6 - Proteína Tau

A proteína Tau pertence a uma classe de proteínas do cérebro de mamíferos e é encontrada predominantemente nos axônios, onde participam da estabilização dos microtúbulos, sendo um de seus componentes principais (ILLENBERGER, 1998).

Os microtúbulos formam o citoesqueleto e são essenciais para a manutenção da estrutura neuronal e o transporte axonal de várias substâncias, como os neurotransmissores. O papel da proteína Tau nessas estruturas é o de estabilizar os microtúbulos e o seu grau de fosforização irá determinar a sua capacidade de estabilização: quanto maior a fosforização, menor a estabilidade. Quando o cérebro encontra-se em fase de desenvolvimento, essa perda de estabilidade lhe confere maior plasticidade, sendo essencial para o desenvolvimento e diferenciação dos neurônios. No cérebro maduro, entretanto, a

instabilidade pode determinar alterações estruturais e funcionais, levando à morte neuronal e à formação dos EN's (RISSMAN, 2004).

Os níveis de cálcio regulam a fosforização da Tau e o aumento de seu teor intracelular pode levar a hiperfosforização desta proteína, uma vez que quinases envolvidas na fosforização da Tau são reguladas pelos níveis do íon Ca^{2+} . A fosforização da Tau favorece a formação dos filamentos helicoidais pareados (SELKOE, 2000, MURRAY, 1993). Esses filamentos são o componente principal dos EN's e concentram a proteína Tau em estado hiperfosforizado. (FORLENZA, 1998).

A fosforização da Tau também pode ocorrer como um mecanismo de proteção para dissociá-la dos microtúbulos, quando a mesma se encontra na forma filamentosa, o que acaba causando uma desestabilização da rede de microtúbulos (RISSMAN, 2004).

A Tau se torna extremamente fosforizada durante a mitose (sete vezes mais), o que parece se correlacionar com a desconexão da Tau dos microtúbulos e a reorganização da rede de microtúbulos (ILLENBERGER, 1998). Sabe-se que a ação de antagonistas muscarínicos modula o metabolismo da PPA. A estimulação de receptores muscarínicos resultou em diminuição do grau de fosforização da proteína Tau, embora tal efeito não tenha sido descrito em células neuronais (FORLENZA, 1998).

Vários artigos afirmam que o acúmulo de $\text{A}\beta$ precede a formação de EN's. De fato, fragmentos de Tau (ΔTau), gerados a partir da clivagem realizada por caspases específicas, são encontrados junto aos depósitos de $\text{A}\beta$, sugerindo que o $\text{A}\beta$ intra e extra-celular induzam essa clivagem, enquanto em algumas experiências in vitro, o $\text{A}\beta_{1-42}$ disparou a produção de ΔTau (GAMBLIN, 2003, RISSMAN, 2004). Além do $\text{A}\beta$, qualquer estímulo capaz de ativar as caspases, como por exemplo, o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial, pode iniciar a patologia dos EN's (RISSMAN, 2004).

Mais do que isso, a caspase-clivagem da Tau não só aumenta a formação dos filamentos, como os fragmentos de Tau agem como semente para a formação dos filamentos da Tau

integral. Isso ocorre porque a Tau fragmentada pela caspase se agrega mais rapidamente do que a Tau integral, além de acelerar a formação filamentosa da mesma (RISSMAN, 2004).

A ocorrência de uma alteração conformacional na Tau é, aparentemente, um dos primeiros eventos patológicos da DA. Tais alterações reduzem sua atividade de ligação com os microtúbulos, levando à despolimerização desses e contribuindo para a perda neuronal observada na DA. (RISSMAN, 2004)

Como a produção de Δ Tau está correlacionada positivamente com a progressão da DA, podemos dizer que a caspase-clivagem da Tau contribui para a disfunção neuronal. In vitro, a caspase-clivagem da Tau leva à retração do neurito, contribuindo para os déficits sinápticos e morte celular (RISSMAN, 2004).

II.10.7 - O Papel do Cálcio na DA

O fenômeno da excitação neuronal depende do comportamento de certas espécies iônicas dentro e fora da célula, como o sódio, o potássio e o cálcio. Os canais de cálcio, por exemplo, são os únicos mecanismos existentes para realizar a tradução da despolarização elétrica em atividades não elétricas (HILLE, 1989).

A membrana sináptica do terminal do axônio possui várias vesículas e um grande número de mitocôndrias. O impulso elétrico, ao chegar ao terminal pré-sináptico, é transformado em um sinal químico. Esse sinal químico é produzido pelos neurotransmissores que, liberados pelas vesículas sinápticas, atravessam a membrana pré-sináptica e chegam ao interior da outra célula, atravessando a membrana pós-sináptica. Lá eles são absorvidos e transformados novamente em impulso elétrico pelas proteínas receptoras (*Figura II.15*).

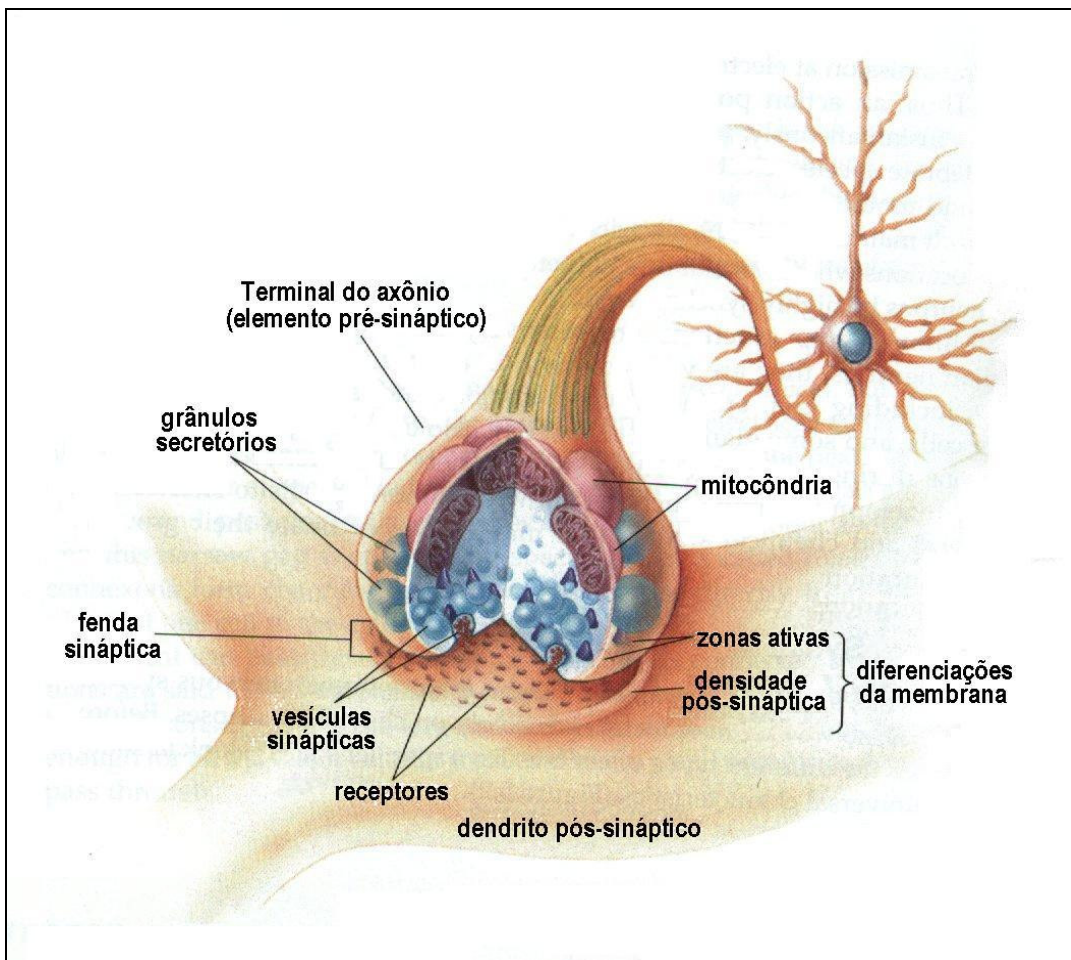


Figura II.15: Modelo de sinapse química (adaptado de BEAR).

Embora a transmissão química perca em velocidade para as sinapses elétricas, ela possui a propriedade de amplificação. Em uma única vesícula estão contidos vários milhares de moléculas de neurotransmissores mas, na maior parte dos casos, apenas duas dessas são capazes de abrir um canal iônico pós-sináptico (KANDEL, 2000).

O cálcio possui um importante papel no processo químico da transmissão sináptica. A despolarização pré-sináptica abre os canais de cálcio da membrana pré-sináptica, causando a entrada de íons Ca^{2+} . O aumento do teor interno de cálcio promove a fusão das vesículas transmissoras com a superfície da membrana neuronal, liberando os neurotransmissores na fenda sináptica, transformando, dessa forma, um sinal elétrico em um sinal químico e propagando um estímulo (Figura II.16) (HILLE, 1989).

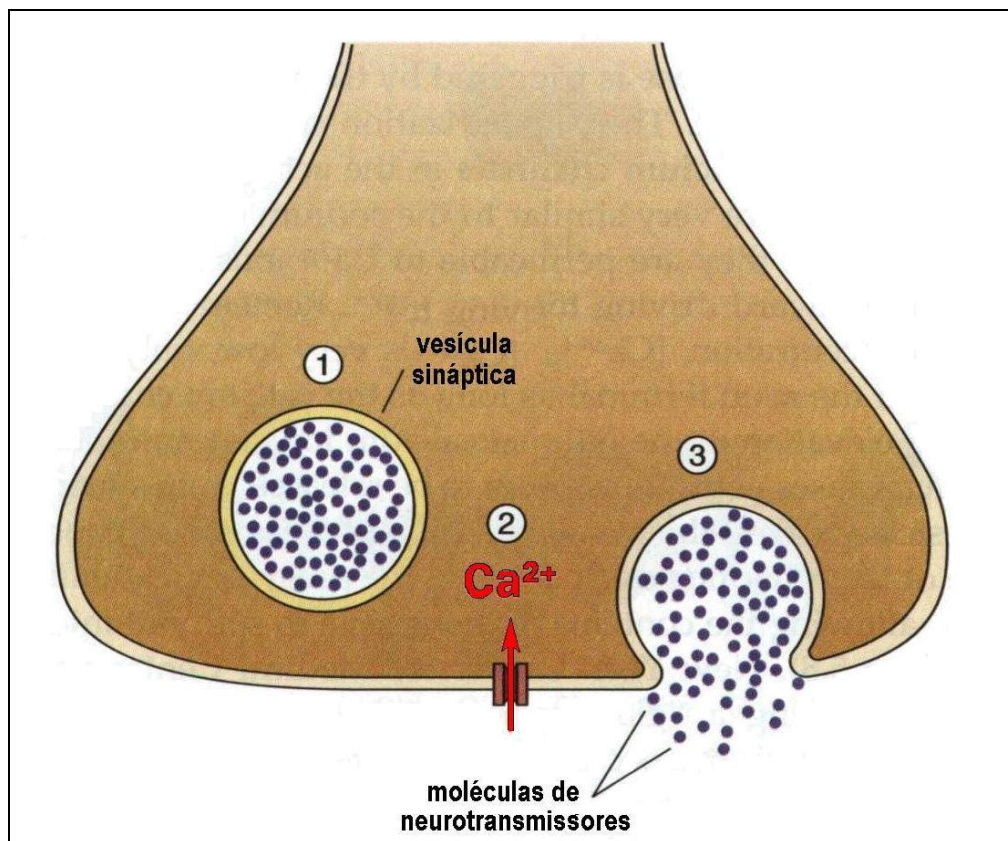


Figura II.16: Liberação de neurotransmissores por exocitose. (1) A vesícula sináptica carregada com neurotransmissores, em resposta a (2) um influxo de Ca^{2+} através dos canais de cálcio, (3) liberam seu conteúdo na fenda sináptica, através da fusão da membrana da vesícula com a membrana pré-sináptica (adaptado de BEAR, 2000).

A liberação de neurotransmissores é essencial para a existência de resposta pós-sináptica e exige a presença do cálcio durante todo o processo de despolarização. Para suprir tal necessidade, os terminais pré-sinápticos possuem alta densidade de canais de cálcio. A concentração de cálcio intracelular controla a liberação dos pacotes de neurotransmissores. Observa-se que o incremento da taxa de influxo de cálcio aumenta o número de vesículas liberadas (DETWILER in PATTON, 1989).

Quando os canais de cálcio da membrana pré-sináptica se abrem e há entrada de íons Ca^{2+} na célula, a concentração de cálcio livre no interior da célula pode subir até 20 vezes. Mesmo assim, a carga de entrada de íons Ca^{2+} correspondente a menos de 1% da entrada do Na^+ . Além disso, os canais de cálcio são mais lentos do que os de sódio, tanto na ativação

quanto na desativação. No momento da excitação da célula, íons Ca^{2+} podem também ser liberados por depósitos intracelulares no citoplasma (HILLE, 1989).

Logo, a entrada de íons de Ca^{2+} possui um papel insignificante no aumento do potencial de ação; porém, mesmo uma pequena entrada destes íons pode acionar mensageiros secundários e ligar ou desligar atividades fisiológicas intracelulares específicas²⁵ (HILLE, 1989, DETWILER in PATTON, 1989).

O cálcio livre pode ser considerado um segundo mensageiro, já que ele estimula a liberação de hormônios, media a exocitose e regula a atividade de enzimas-chave e processos metabólicos em praticamente todas as células (COOK in PATTON, 1989). O aumento no nível de cálcio intracelular pode produzir radicais livres, ativar proteases e fosfolipases e aumentar a interação entre esses íons e proteínas como a calmodulina e a troponina. Estas últimas, por sua vez, ligam ou desligam diferentes funções celulares, como a liberação de neurotransmissores das vesículas (HILLE, 1989).

Os fosfolipídios são os principais lipídios da membrana celular e um muito importante, localizado na folha citofacial (FC), é o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2). O neurotransmissor acetilcolina promove a quebra do PIP_2 e sua clivagem irá produzir duas substâncias, o inositol trifosfato (IP_3) e o diacilglicerol (DAG). O IP_3 aciona os canais de cálcio dos depósitos celulares internos, liberando esses íons para o citoplasma. O DAG, por sua vez, aumenta dramaticamente a afinidade entre o cálcio e uma quinase da membrana, a quinase C (*figura II.17*) (BATTAINI, 1994, GANONG, 1993).

A maior parte dos efeitos do cálcio, quando este atua como segundo mensageiro, é causada por ações de quinases, cuja função é fosforizar proteínas. Uma única quinase pode fosforizar muitas proteínas distintas, alterando suas atividades ou amplificando e distribuindo seus sinais (SIEGELBAUM, 2000). A ligação entre o cálcio e a quinase C fará com que esta ative a fosforização de várias proteínas. Alguns indícios sugerem que a

²⁵ Em alguns tipos de neurônios, a corrente da entrada do Ca^{2+} pode ser maior e ter importância elétrica (HILLE, cap 3; DETWILER in PATTON, cap 11).

quinase C controle a divisão e proliferação celular, embora pouco se saiba ainda sobre ela (COOK in PATTON, 1989). As quinases, de maneira geral, são importantes no acionamento de alterações de longo-prazo na plasticidade sináptica, associada a certas formas de aprendizado e memória (SIEGELBAUM, 2000).

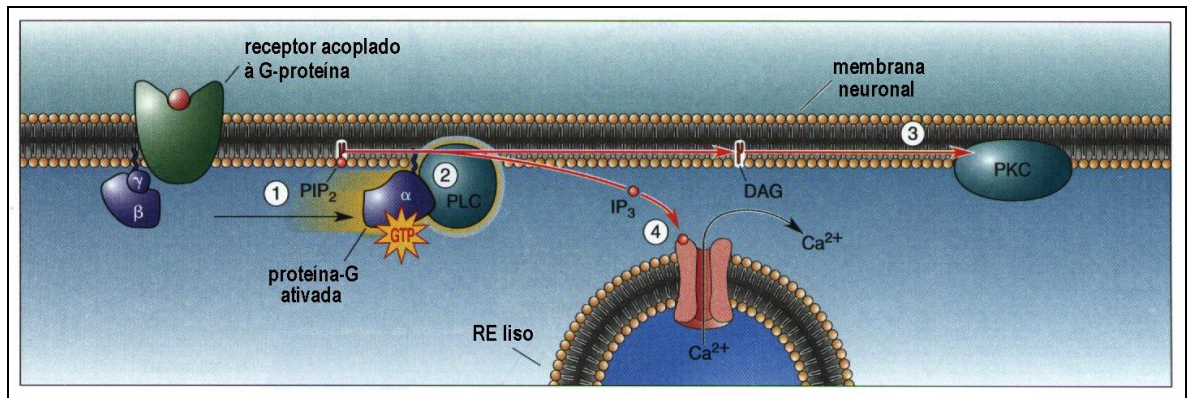


Figura II.17: Mensageiros secundários gerados pela quebra do PIP₂. (1) Proteínas-G ativadas estimulam a fosfolipase C (PLC). (2) A PLC quebra o PIP₂ em DAG e IP₃. (3) A DAG estimula a enzima proteína quinase C (PKC). (4) IP₃ estimula a liberação de Ca²⁺ dos depósitos intracelulares (adaptado de BEAR, 2000).

II.10.8 - Cálcio intracelular e buffers de cálcio

Grande parte do cálcio intracelular está ligada ao retículo endoplasmático e outras organelas. Esses elementos funcionam como depósitos que podem ser acessados, a fim de aumentar a concentração do cálcio livre no citoplasma (GANONG, 1993).

A concentração citoplasmática dos íons Ca²⁺ em células animais é mantida baixa por operações paralelas de vários sistemas de transporte ativo primário e secundário que excretam o Ca²⁺ para o meio extracelular ou o aprisiona em compartimentos intracelulares. Após a repolarização da membrana, os canais de cálcio se fecham e a concentração de cálcio citoplasmático diminui rapidamente, através do seu acoplamento às proteínas ligantes e da ação dos vários tipos de bombas membranares (HILLE, 1989).

A atividade dos íons Ca²⁺ e a taxa de atividade das bombas de cálcio podem ser aumentadas pela adição da calmodulina. As mitocôndrias também podem acumular cálcio, embora

muitos achem que a retirada pelas mitocôndrias só é significativa em estados patológicos (HILLE, 1989).

II.10.9 - O Cálcio e as Mitocôndrias

As mitocôndrias são as estruturas responsáveis pela geração de energia química, que ocorre em um processo interno às suas cristas. Os açúcares, gorduras e proteínas do citosol sofrem uma série de reações químicas, formando o ácido pirúvico. Esse ácido reage com o oxigênio dentro das mitocôndrias, através do ciclo de Krebs, transformando o ADP em ATP + CO₂ (HANSSON, 2003).

Como um resultado do acúmulo de Ca²⁺, do estresse oxidativo ou do envelhecimento, a membrana interna da mitocôndria pode aumentar repentinamente sua permeabilidade a alguns solutos. Esse fenômeno é conhecido pelo nome de *transição de permeabilidade mitocondrial* (TPm) e ocorre através de megacanaís mitocondriais, chamados *poros de transição de permeabilidade mitocondrial* (PTPm). A modulação dos PTPm é complexa e vários fatores contribuem para mantê-los fechados. Entre os fatores que tendem a abri-los estão o influxo excessivo de cálcio e certos agentes oxidantes (CARNEY, 2000, HANSSON, 2003).

As mitocôndrias são capazes de armazenar cargas não-tóxicas de cálcio e liberá-las gradualmente. Quando essa carga se torna muito pesada para uma mitocôndria, ela pode entrar em processo de TPm e liberar o cálcio armazenado, já que o PTPm propicia às mitocôndrias um mecanismo de extrusão rápida desse íon. Ao liberar o excesso de cálcio, a mitocôndria aumenta a carga para as demais ainda intactas. Quando outras mitocôndrias perdem a sua função e entram em TPm, a apoptose e a necrose podem ocorrer (HANSSON, 2003).

Na necrose, as células se rompem, liberando seu conteúdo intracelular, podendo causar reações de inflamação, agravando o meio-ambiente em torno das outras células. Além

disso, a TPm aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e libera proteínas apoptogênicas (HANSSON, 2003).

II.10.10 - O Metabolismo do Colesterol na DA

Os lipídios formam um grupo heterogêneo de compostos, importantes na constituição celular. Eles aparecem tanto na membrana celular quanto nas mitocôndrias, sendo particularmente alto o teor de gordura dos tecidos nervosos. São lipídios, entre outros, os fosfolipídios, os ésteres de colesterol e o colesterol (MURRAY, 1993).

O colesterol, esteróide mais comum nos humanos e componente essencial de todas as membranas eucariótidas, é essencial para o funcionamento celular. Alterações no teor lipídico e de colesterol da membrana celular afetam intensamente algumas de suas propriedades físicas, como ordenação, rigidez, permeabilidade e difusão lateral (HOWLAND, 1998). Cerca de 50% do colesterol necessário para o corpo é sintetizado *de novo*, enquanto o restante provém da dieta alimentar. Praticamente todos os tecidos que contém células nucleadas são capazes de sintetizar colesterol (BURNS, 2002).

Nos humanos, a maior fonte de colesterol é o fígado, de onde ele é distribuído para os outros órgãos. O SNC corresponde a somente cerca de 2% de toda a massa corporal, porém contém aproximadamente 25% de todo o colesterol livre do corpo. Dada a existência da barreira hemato-encefálica, quase todo o colesterol cerebral é sintetizado localmente e dificilmente há qualquer entrada de colesterol no cérebro a partir de órgãos periféricos (YANAGISAWA, 2002a, GOLDE, 2001, HARTMANN, 2001).

A taxa de síntese de colesterol no SNC de fetos e recém-nascidos é bem alta. Conforme o cérebro atinge o tamanho maduro e a mielinização se completa, a síntese se reduz bruscamente, porém sem nunca cessar (HALEY, 2000). Com o envelhecimento, a síntese endógena do colesterol decresce no sistema nervoso. Assim, a viabilidade neuronal passa a depender do fornecimento exógeno deste esteróide (YANAGISAWA, 2002a, GOLDE, 2001).

Nos cérebros adultos, o balanço de colesterol é fortemente controlado e regulado. Aparentemente, enquanto o próprio cérebro sintetiza esteróides, pequenas quantidades de colesterol do plasma entram no SNC, embora a taxas muito pequenas. Esse movimento, porém, pode ser afetado pela alteração da concentração do colesterol no plasma. Infelizmente, a maneira como o colesterol é transportado para o cérebro, mesmo à essa taxa mínima, ainda não foi totalmente esclarecida (BURNS, 2002, HALEY, 2000).

Muito se tem especulado sobre a influência que alterações no metabolismo do colesterol no SNC possam ter sobre o desenvolvimento da DA e de outras doenças neurodegenerativas. Como exemplo, podemos citar um estudo conduzido por NOTKOLA (1998), em que 444 homens entre 70 e 89 anos foram analisados, concluindo-se que um histórico de níveis altos de colesterol é um fator de risco independente e significativo para o desenvolvimento da DA.

II.10.11 - O Colesterol nas Membranas Plasmáticas Sinápticas

As membranas plasmáticas sinápticas (MPS's) são compostas por duas folhas assimétricas: a folha exofacial (FE) e a folha citofacial (FC). Essas duas diferem no que diz respeito à distribuição lipídica, carga elétrica, fluidez, função e localização dos *rafts* lipídicos (*figura II.18*).

Alguns fatores podem alterar a distribuição lipídica entre as duas folhas da membrana, como o consumo crônico de etanol e o avanço da idade, que praticamente duplicam o colesterol da FE. Nesses dois casos, porém, o total de colesterol contido nas duas folhas praticamente não se altera. De fato, alterações significativas nos domínios de colesterol nas MPS's podem ocorrer sem alteração na quantidade total de colesterol (*Figura II.19*). Uma consequência da alteração na distribuição de colesterol pode ser o prejuízo na habilidade de certas moléculas se moverem para dentro e para fora das membranas, alterando o funcionamento celular (WOOD, 2002).

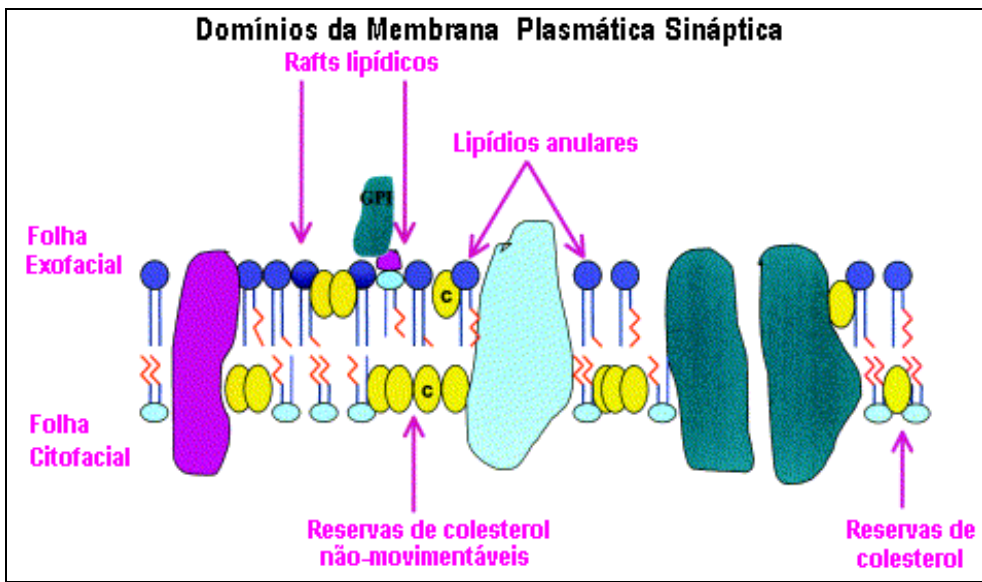


Figura II.18: Representação da membrana plasmática sináptica.

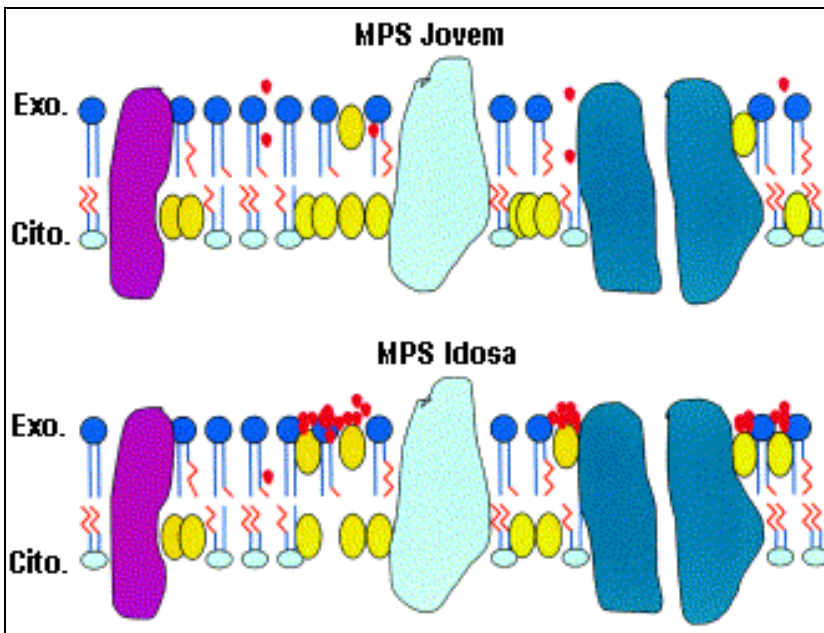


Figura II.19: Comparação entre FC's e FE's de pessoas jovens e idosas. Os pontos menores representam a $A\beta$ e os maiores o colesterol.

As MPS's estão divididas em domínios de colesterol, os quais apresentam diferentes taxas de troca de colesterol entre as folhas. São as chamadas reservas rápidas, constituídas por

monômeros de colesterol, as reservas lentas, constituídas por dímeros ou trímeros, e as reservas não-movimentáveis, constituídas por agregados de colesterol.

Com a idade, a cinética de cada tipo de reserva se altera, as taxas de troca de colesterol diminuem e a razão entre colesterol e fosfolípidos aumenta, afetando a distribuição do colesterol nas MPS's. Muitas funções da membrana plasmática, tais como o acoplamento receptor-efetor, o transporte de íons e a translação de proteínas, podem ser influenciados pela estrutura lipídica das folhas (WOOD, 2002).

Essas alterações no metabolismo e na distribuição do colesterol podem facilitar o desenvolvimento da DA. A questão é determinar a partir de que ponto a alteração da distribuição do colesterol pelas folhas torna-se patológica já que, muitas vezes, essas alterações não são comprometedoras das MPS's (WOOD, 2002).

II.10.12 - O Colesterol e o Processamento da PPA

No caso da DA familiar, fatores genéticos aumentam a produção de $A\beta$ e, conseqüentemente, aumentam a agregação desse elemento. Esses fatores, porém, não podem explicar o aumento na concentração de $A\beta$ que ocorre na DA idiopática, a forma mais freqüente da doença.

Estudos *in vitro* mostraram que o aumento do colesterol acelera a formação de agregados $A\beta$ e que o oposto também ocorre; entretanto, esse mecanismo ainda não foi totalmente compreendido (GOLDE, 2001). Existe a possibilidade de que o colesterol afete o processo de remoção do $A\beta$, ou desloque o processamento da PPA da via $A\beta$ para a via não- $A\beta$ (YANAGISAWA, 2002a).

Foi de SPARKS, 1990, a primeira evidência de que o colesterol da dieta afeta a produção de $A\beta$, através da modulação do processamento da PPA, sugerindo uma possível ligação entre o colesterol e a DA. Ele e sua equipe descobriram que pacientes com doença arterial coronária crítica mostravam um padrão de deposição de $A\beta$ similar ao observado em

pacientes com DA. Um trabalho subsequente do mesmo grupo (SPARKS, 1994) mostrou que uma dieta rica em colesterol induz ao acúmulo de A β no cérebro de coelhos. É interessante notar também que a A β tem um efeito tóxico maior nas MPS's de regiões cerebrais ricas em colesterol do que nas MPS's de regiões cerebrais com menos colesterol (WOOD, 2002).

PAPPOLA (2002), em um estudo realizado com pacientes idiopáticos de DA, encontrou resultados importantes, que apontaram para a existência de uma relação direta entre os depósitos amilóides e a hipercolesterolemia²⁶.

Experimentos com camundongos transgênicos, submetidos a dietas ricas em colesterol, encontraram uma correlação positiva entre o aumento na quantidade de A β e os níveis de colesterol, tanto no plasma quanto no sistema nervoso central (*tabela II.2*). Observou-se ainda, na hipercolesterolemia, uma dramática aceleração da neuropatologia e das mudanças bioquímicas típicas do DA, como: aumento da deposição amilóide e dos níveis de A β no sistema nervoso central (SNC), diminuição nos níveis de fragmentos α PPA solúvel e aumento dos níveis de fragmentos de β PPA (REFOLO, 2000).

Tabela II.2: Efeito da dieta de hipercolesterolemia nos níveis de colesterol no plasma e no SNC, no total de depósitos A β e nos níveis relativos de vários tipos de A β no SNC (REFOLO, 2000).

	Hipercolesterolemia	Dieta Basal
pmol/g total	347,3	171,1
Mg/dl do plasma	201,66	99,85
Mg/g do SNC	16,68	14,76
nº depósitos A β	17,08	10,33
nível relativo de A β ₁₄₂	0,3135	0,194
nível relativo de A β ₁₄₀	0,2664	0,1665
nível relativo de A β ₁₃₈	0,0612	0,042
nível relativo de A β ₁₃₄	0,0923	0,0689

²⁶ Níveis altos de colesterol.

Outras pesquisas verificaram que a hipocolesterolemia induzida²⁷ diminui suavemente os níveis de colesterol no cérebro. No SNC, a redução do colesterol intracelular bloqueia a produção do A β , através da redução da produção de sPPA β ²⁸ (tabela II.3). No sentido oposto, ao suplementar a célula com colesterol, há aumento dos fragmentos de β PPA, aumento na secreção do A β ₄₀ e A β ₄₂ e diminuição do α PPA solúvel (REFOLLO, 2001).

Tabela II.3: Efeito da dieta de hipocolesterolemia nos níveis de A β no SNC (REFOLO, 2001)

	Hipocolesterolemia	Dieta Basal
A β ₄₀ (pmol/g)	143,90	346,02
A β ₄₂ (pmol/g)	219,61	420,50

Essas experiências mostraram que existe uma correlação positiva entre o aumento no A β total e os níveis de colesterol no plasma e no SNC. Logo, podemos sugerir que o colesterol possua um papel mecanicista na formação do A β e que a manipulação farmacológica do colesterol intracelular possa alterar o processamento da PPA (REFOLO, 2000). Atualmente, as estatinas são os agentes disponíveis mais eficazes para a redução do colesterol total e do LDL no plasma. Estudos epidemiológicos recentes demonstraram que o tratamento com estatina reduziu significativamente a produção do A β , uma vez que a maioria delas é capaz de alcançar o SNC, inibindo em parte a taxa da síntese de colesterol no cérebro. WOLOZIN (2000) demonstrou que a terapia com estatina reduz o risco de prevalência de DA em cerca de 60 a 73% (HALEY, 2000, JICK, 2000, HARTMANN, 2001, BURNS, 2002)²⁹.

Esses resultados, porém, devem ser analisados com cautela pois, ao mesmo tempo em que se verifica a redução da PPA e do A β , muitas outras funções celulares são alteradas (WOOD, 2002). Logo, não se sabe ao certo se é realmente a redução do colesterol, e não

²⁷ Através da utilização de BM15.766 e utilizando o modelo transgênico de ratos (MTR) descrito no artigo.

²⁸ Ver Capítulo II, sessão II.5.4, página 35.

²⁹ Ver Capítulo II, seção II.3.11.

algum efeito colateral da estatina, o que causa a diminuição na produção de A β , mas é bastante provável que a primeira hipótese seja verdadeira (FASSBENDER, 2001).

II.10.13 - A Barreira Hemato-Encefálica (BHE)

A BHE consiste em uma monocamada de células, fortemente unidas por junções especiais, de forma a eliminar os espaços intercelulares, formando a membrana inferior vascular (MIV) do cérebro. Sua função é a de prevenir a circulação livre de substâncias para o SNC, controlando a troca de substâncias entre os fluidos cerebrais³⁰ e o sangue. Desta forma, é ela quem define o ambiente homeostático e nutritivo do SNC, uma vez que a mesma impede que o SNC possa contar com as rotas típicas de entrega de nutrientes. Interferências no funcionamento da BHE alteram o ambiente do SNC (BANKS, 1997).

A entrada de substâncias no SNC pode ocorrer por três vias distintas (BANKS, 1997):

- 1) Vias extracelulares: ocorre escoamento residual através dos espaços subaracnóides e outros. Disponível para qualquer substância circulando no sangue, sendo que a taxa de entrada é muito baixa.
- 2) Difusão pela membrana: as substâncias entram pelo lado do sangue da célula e emergem no lado cerebral da mesma. A taxa de passagem depende de características da molécula circulante e de características da membrana celular, como carga e fluidez.
- 3) Sistemas de transporte saturáveis: sistemas individuais e altamente seletivos que permitem a entrada de substâncias para o SNC com maior rapidez (de 10 a 1000 vezes mais rápido) do que os outros mecanismos. Sofrem regulagens e mudam suas características ao longo da vida, provavelmente em resposta às demandas metabólicas do cérebro. Podem ainda ser afetadas por algumas toxinas como, por exemplo, o alumínio.

³⁰ Fluido cérebro-espinhal e fluido intersticial cerebral.

Existem ainda rotas, de mesmo tipo que as anteriores, que transportam substâncias no sentido inverso, isto é, do SNC para o sangue. Deficiências nessas rotas podem acumular toxinas no SNC e causar outros distúrbios (BANKS, 1997).

No caso específico do A β originário do SNC, sabe-se que este atravessa a BHE por difusão transmembrânica. Estados patológicos que afetem a permeabilidade da BHE ao A β , ou a diminuição na sua taxa de degradação no cérebro ou no sangue, podem aumentar o seu acúmulo no SNC (BANKS, 1997).

Algumas alterações morfológicas na BHE, como o aumento significativo na espessura do MIV, ocorrem concomitantemente à DA. Esse espessamento, maior do que o que ocorre no envelhecimento normal, está ligado ao processo patogênico da DA e pode ser observado apenas nas regiões afetadas consistentemente pela doença (WISNIEWSKI, 1982, ZAROW, 1997).

II.11 - ETIOLOGIA

A etiologia da doença é extremamente complexa, sendo difícil ou mesmo impossível definir uma seqüência de eventos, que podem ocorrer de forma muito diversa entre os indivíduos. Essa complexidade parece resultar da combinação de diferentes elementos, como idade avançada, histórico familiar, baixo nível educacional, traumatismo craniano e acúmulo de toxinas (SELKOE, 2000, SOUZA, 1998).

Inúmeras são as hipóteses sobre os mecanismos que causam a morte celular no Alzheimer, porém nenhuma responde sozinha pela causa da doença. Algumas hipóteses têm sido mais aceitas e discutidas atualmente.

II.11.1 - Hipótese Genética

A hipótese genética argumenta que 40% dos pacientes têm parentes de primeiro grau com a

doença e os membros de sua família têm um risco três a quatro vezes maior de adquirir a doença do que a população geral. O risco para os filhos varia de 1,5 a 34% e para irmãos de 2 a 20%. Estudos em gêmeos relatam uma concordância de 40 a 50% para os monozigóticos e de 8 a 50% entre os dizigóticos. Essa hipótese, porém, não explica a grande maioria dos casos de DA, que são idiopáticos, isto é, que não possuem uma explicação genética ou hereditária (TANG, 2000).

Mesmo a herança do alelo $\epsilon 4$, considerado um fator de risco para a DA, não é nem necessário, nem suficiente para causar a doença. Isso porque a DA pode se desenvolver mesmo na ausência desse alelo e algumas pessoas, mesmo portadoras do gene, não a desenvolvem. Logo, mesmo aumentando o risco da doença, esse dependerá também da idade, sexo, grupo étnico e outros fatores ambientais (TANG, 2000).

II.11.2 - Hipótese da Cascata Amilóide

Esta hipótese sugere que o processamento anormal da PPA seja o responsável pela geração dos depósitos $A\beta$ que, por sua vez, causam as alterações patológicas nos cérebros. Assim, os EN's e as alterações vasculares seriam causas secundárias da doença, ao passo que a formação do $A\beta$, ou o funcionamento anormal da PPA, seria um evento inicial do Alzheimer. (SELKOE, 2000, NEVE, 2000)

Em alguns casos, foram detectadas mutações no terminal C da PPA que protegem os fragmentos de $A\beta$ da degradação proteolítica, aumentando desta maneira os depósitos amilóides. O $A\beta$ integral e seus fragmentos são neurotóxicos e podem aumentar a concentração intracelular de Ca^{2+} , ao formar canais de Ca^{2+} na membrana neuronal. Os níveis desse, por sua vez, regulam a fosforização da proteína Tau, favorecendo a formação dos filamentos helicoidais pareados (*figura II.20*).

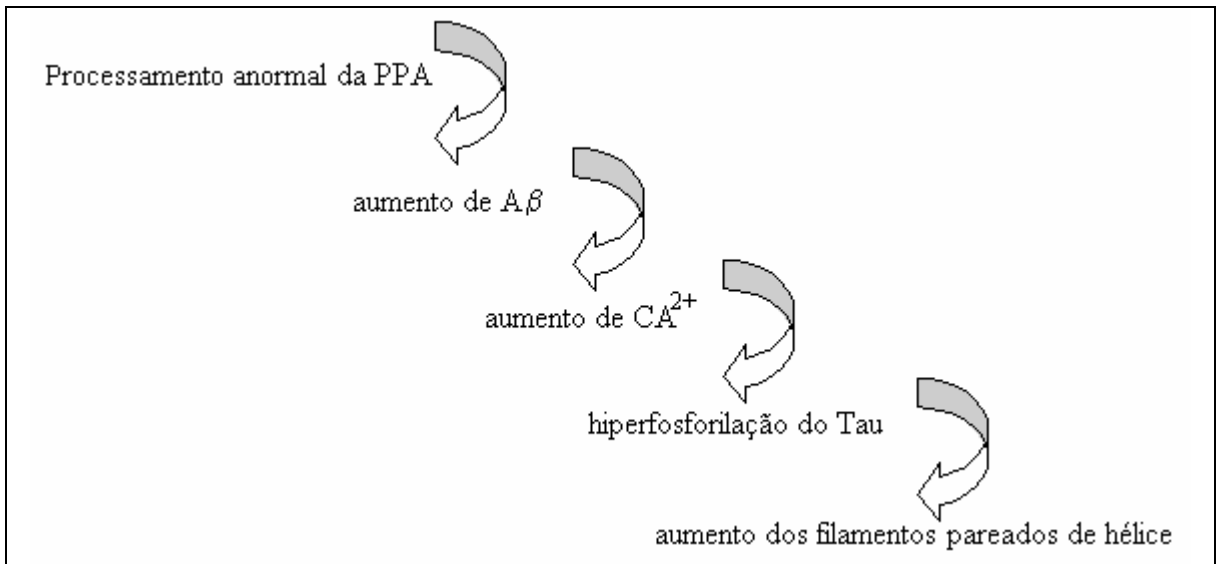


Figura II.20: Sequência de eventos da hipótese da cascata amilóide.

Não podemos afirmar, contudo, se os depósitos de $A\beta$ são o evento primário do Alzheimer ou se os mesmos são um evento secundário a outros ainda indefinidos. Porém, alguns fatores conhecidos servem de suporte à teoria amilóide: (SELKOE, 2000)

- Todos os pacientes de Alzheimer acumulam $A\beta_{42}$ e depois $A\beta_{40}$ em regiões de memória, cognição e de estabilidade comportamental.
- O acúmulo de placas de $A\beta_{42}$ aumenta progressivamente com a idade em indivíduos normais.
- O gene da PPA está codificado no cromossomo 21 e uma trissomia no mesmo leva ao acúmulo muito precoce de $A\beta_{42}$.
- Os genes da PPA, PS1 e PS2, identificados como os principais locais de mutações transmissíveis que podem causar o Alzheimer, aumentam a produção celular de $A\beta_{42}$.
- Expressões da DA familiar levam ao acúmulo progressivo de $A\beta_{42}$.

II.11.3 - Hipótese da Neuroplasticidade

A hipótese anterior, infelizmente, não explica todos os casos observados ou mesmo as placas encontradas em indivíduos normais. Uma outra hipótese sugere que os EN's e as PNS's do Alzheimer sejam manifestações independentes de um fenômeno em comum: uma

perturbação prolongada da plasticidade neuronal. Essa perturbação teria maior potencial de ocorrência no sistema límbico do que em outras partes do cérebro. Realmente, observa-se que todos os fatores genéticos e de risco associados ao Alzheimer podem influenciar, de uma forma ou de outra, a neuroplasticidade (MESULAM, 2000).

O A β , por exemplo, possui propriedades promotoras da plasticidade, que induzem o crescimento dos neuritos, a sinaptogênese e o LTP³¹. Já o fragmento A β ₁₋₄₂ é neurotóxico e inibe o brotamento axonal e o LTP. A expressão dos PS1 mutantes causa uma depressão do crescimento dos neuritos e interfere na formação e manutenção das junções sinápticas. A apoE também promove o crescimento axonal e sinaptogênico. Sua deficiência em ratos gera um déficit da sinaptogênese, que pode ser revertido com a reposição de estrogênio.

A ocorrência desses fatores cria um estado tal que os neurônios precisam trabalhar mais duro para atender à demanda de plasticidade que, com os anos, pode levar a níveis crônicos altos e insustentáveis de atividade celular. Essa demanda crônica promove o surgimento de EN's, inicialmente nos sistemas límbicos e para-límbicos, onde os neurônios possuem os maiores níveis de plasticidade, estando assim mais expostos a mecanismos compensatórios. Um efeito em cascata da demanda de plasticidade faz com que se atinjam os córtices associativos.

Portanto, o Alzheimer surgiria quando o cérebro não pudesse manter a carga de trabalho necessária para se auto-reparar ou codificar novas experiências (MESULAM, 2000).

II.11.4 - Hipótese do Estresse Oxidativo

Existe uma concordância geral de que a idade seja um dos principais fatores de risco para o Alzheimer, porém essa unanimidade acaba ao se tentar definir o que seja o envelhecimento.

³¹ A potenciação de longo prazo (LTP - *long term potentiation*) pode ser descrita como um aumento persistente e rapidamente desenvolvido da resposta à transmissão sináptica, produzida por uma ativação breve e repetitiva de neurônios pré-sinápticos. Prolongada e podendo durar por dias, deve-se a um aumento no Ca²⁺ intracelular nos neurônios pós-sinápticos e representa uma forma de aprendizado e memória (GANONG, 1993).

Segundo a teoria dos radicais livres, o envelhecimento é o resultado de um ataque progressivo e acumulativo às células, que podem ocasionar mutações e anomalias no DNA, RNA e proteínas. Esses danos também podem gerar modificações oxidativas que causam a perda de função e, em casos extremos, morte celular. No Alzheimer, todos os fatores associados à doença levam, direta ou indiretamente, ao estresse oxidativo que, por sua vez, leva à necrose ou à apoptose. Como as mitocôndrias são as responsáveis pelo processo de metabolismo oxidativo das fontes de energia, elas seriam a fonte de geração dos radicais livres que causam o envelhecimento. (CARNEY, 2000, GANONG, 1993)

A microglia participa da resposta inflamatória, sinalizando outras células gliais e neuronais, gerando radicais livres e limpando os depósitos amilóides. Com o aumento da idade, a microglia vai se tornando mais e mais reativa no cérebro, o que faz com que ela seja atraída para o amiloide. Entretanto, a fibra amiloide imobiliza a microglia, resultando em produção de radicais livres (EDELSTEIN-KESHET, 2002).

Uma medida comum do estresse oxidativo é a formação dos aminoácidos oxidados nas proteínas, que afetam as proteínas solúveis e as citoesqueléticas. No envelhecimento e na DA, há um aumento exponencial desse dano oxidativo e no total de lipídeos poliinsaturados presentes nas membranas celulares. Além disso, mitocôndrias de pessoas idosas são menos eficientes na geração do ATP e liberam mais radicais livres. Também são 50% menos eficientes na captura de cálcio, um importante fator para a manutenção da arquitetura sináptica normal e de suas conexões. Quando os níveis de cálcio aumentam, vários sistemas que podem levar à morte celular são ativados.

Na célula adulta normal, a modificação oxidativa das proteínas serve como um marcador para as proteases que as hidrolisam. Com o envelhecimento, essa marcação diminui, desabilitando a remoção das proteínas defeituosas e fazendo com que elas continuem na organela, o que compromete o funcionamento da célula.

CARNEY (2000) formula a hipótese de que um fator importante para o início das alterações patológicas da DA seja a perda das proteases. Quando essa queda alcança um

ponto crítico, outros processos de estresse oxidativo se aceleram, afetando proteases e proteínas, desencadeando o processo de desenvolvimento da patologia. Talvez os fatores que geram esse estresse comecem muitos anos antes de os sintomas surgirem. Conforme a idade avança, a perda das proteases nos pacientes de risco vai gerando a patologia. Para CARNEY, 2000, o controle do dano causado pelas proteases ou o controle dos geradores do estresse oxidativo podem ser as formas mais eficientes para controlar o aparecimento ou a progressão do Alzheimer.

II.11.5 - Hipótese do Colesterol

A associação existente entre os níveis de colesterol intracelular e as alterações neurodegenerativas observadas na DA foi estabelecida a partir da descoberta de um gene mutante, identificado inicialmente em pacientes da doença de Niemann-Pick. O estudo desse gene mostrou que o mesmo codifica uma proteína que está envolvida no transporte intracelular de colesterol para fora dos lisossomos, trazendo declínio cognitivo e neurodegeneração (FREARS, 1999). Nessa doença, foram encontrados EN's idênticos aos da DA, apesar de não terem sido encontradas PNS's, talvez devido à pouca idade dos indivíduos que falecem desse mal (LYNCH, 2000).

Atualmente, muitos estudos epidemiológicos e neuropatológicos mostram a existência de alguns fatores de risco em comum entre a DA e as doenças vasculares, tais como: hipertensão, infartos do miocárdio, lesões isquêmicas, aterosclerose generalizada, herança do alelo $\epsilon 4$ da apoE e, mais recentemente, um histórico de grande consumo de gordura animal (POIRIER, 2003). Além disso, as PNS's, a apoptose e os altos níveis de radicais livres são comuns em pacientes de DA e de doença arteriocoronariana (FREARS, 1999).

Alguns pesquisadores já consideram o alto índice de colesterol plasmático na meia-idade como um fator de risco significativo e independente para o desenvolvimento de declínios cognitivos em idades avançadas (KIVIPELTO, 2001). Com a DA, observa-se um aumento do LDL, que transporta o colesterol para as células, e diminuição do HDL (lipoproteína de

alta densidade³²), que remove o colesterol das células (KUO, 1998, BURNS, 2002). Estudos observaram também uma correlação positiva entre o HDL e o número de placas senis (LAUNER, 2001).

A elevação nos níveis de colesterol total, alguns anos antes dos sintomas clínicos da DA surgirem, pode ser responsável pelo aumento na deposição do A β , levando à degradação neuronal (FREARS, 1999). Essa hipótese, porém, deve ser analisada com cuidado, já que ainda não é possível afirmar que os níveis de colesterol influenciem diretamente a produção e deposição de A β em humanos. Como no caso da utilização de estatina no tratamento da DA, existe a possibilidade de que os agentes redutores de colesterol diminuam o risco da DA através de mecanismos que independem do A β , podendo ser a resposta da célula a um agente redutor, e não a redução em si, o que medeia a diminuição da produção e da deposição do A β (GOLDE, 2001).

Outro ponto de dúvida é se a síntese e o metabolismo do colesterol estão de fato patologicamente alterados no cérebro da DA. Essa recente conexão entre o colesterol e a DA incentivou o estudo do metabolismo do colesterol no SNC, já que muitas diferenças podem ser identificadas entre o metabolismo do colesterol no cérebro e na periferia (YANAGISAWA, 2002a, GOLDE, 2001).

Uma corrente de pesquisa afirma que a modificação da estrutura ou da função do colesterol na membrana neuronal atua na dinâmica do A β . Como pode haver grandes alterações nos domínios de colesterol da membrana, sem que haja alteração no total de colesterol da mesma, esses domínios podem estar alterados na DA, tornando-se vulneráveis a perturbação pelo A β , resultando em disfunções da membrana e da célula (WOOD, 2002). Realmente, a idade avançada e a herança do alelo $\epsilon 4$ da apoE são os dois maiores riscos para a DA e ambas condições resultam na duplicação da quantidade de colesterol na FE das membranas (WOOD, 2003).

³² O “bom” colesterol.

Essa questão é ainda mais complicada quando se verifica que, se por um lado o colesterol modula a clivagem da PPA, aumentando a produção do A β , por outro lado, a diminuição do colesterol aumenta a sensibilidade das células aos efeitos tóxicos do A β (ARISPE, 2002). Logo, a hipótese do colesterol sugere que a DA pode ser uma doença onde a homeostase do colesterol está alterada.

Estudos futuros precisarão avaliar a conexão entre o colesterol, seus metabolitos, e a produção e deposição do A β , identificando novos agentes terapêuticos que atuem em algum ponto na linha de produção do A β (YANAGISAWA, 2002a). Se, de fato, uma dieta rica em gorduras e colesterol aumenta o risco da DA, talvez a aplicação de uma dieta controlada possa ser um meio barato e seguro para a prevenção desta doença (REFOLO, 2000).

III. MODELO DO COLESTEROL

Várias hipóteses sobre qual seria o evento inicial do desenvolvimento da DA foram estudadas durante a fase de revisão bibliográfica. Dentre todas, a hipótese do colesterol foi considerada a mais promissora e serviu de base para a elaboração do modelo matemático-computacional do processo de desenvolvimento da DA, que constituiu o objeto do presente trabalho.

Para se construir um modelo que representasse a interação entre os vários processos e substâncias envolvidos no desenvolvimento da DA, e citados nos capítulos anteriores desse texto, decidiu-se adotar um procedimento de construção hierárquica, partindo-se da identificação dos processos mais gerais da doença.

Cada processo identificado foi então subdividido em sub-processos mais simples. Sempre que um processo gerasse um sub-processo muito complexo para ser representado diretamente por um conjunto de equações, este seria novamente detalhado, e assim sucessivamente, formando uma árvore de detalhamento. Quando os processos folha foram finalmente atingidos, isto é, quando chegamos aos processos fundamentais da doença, um conjunto de equações algébricas ou diferenciais foi definido, a fim de se representar a dinâmica das alterações ocorridas dentro de cada um desses processos fundamentais.

A *figura III.1* mostra uma representação resumida da árvore de detalhamento da DA. Como podemos perceber, o nível de detalhamento necessário para a representação da doença levaria à construção de uma árvore tão complexa que, ao invés de facilitar, atrapalharia a compreensão dos mecanismos da DA. Além disso, esse tipo de representação não permite explicitar as interações que ocorrem entre os processos. Logo, a fim de facilitar a construção e a compreensão do processo modelado, nos inspiramos em técnicas de análise de sistemas para criar um conjunto de diagramas similares a diagramas de fluxo de dados, que serão mostrados mais adiante. Vale lembrar que não houve preocupação em ser fiel à sintaxe de nenhum método específico de modelagem de sistemas. Os diagramas construídos

dessa forma facilitaram bastante a compreensão dos intrincados mecanismos da doença, o que era um dos objetivos iniciais do trabalho.

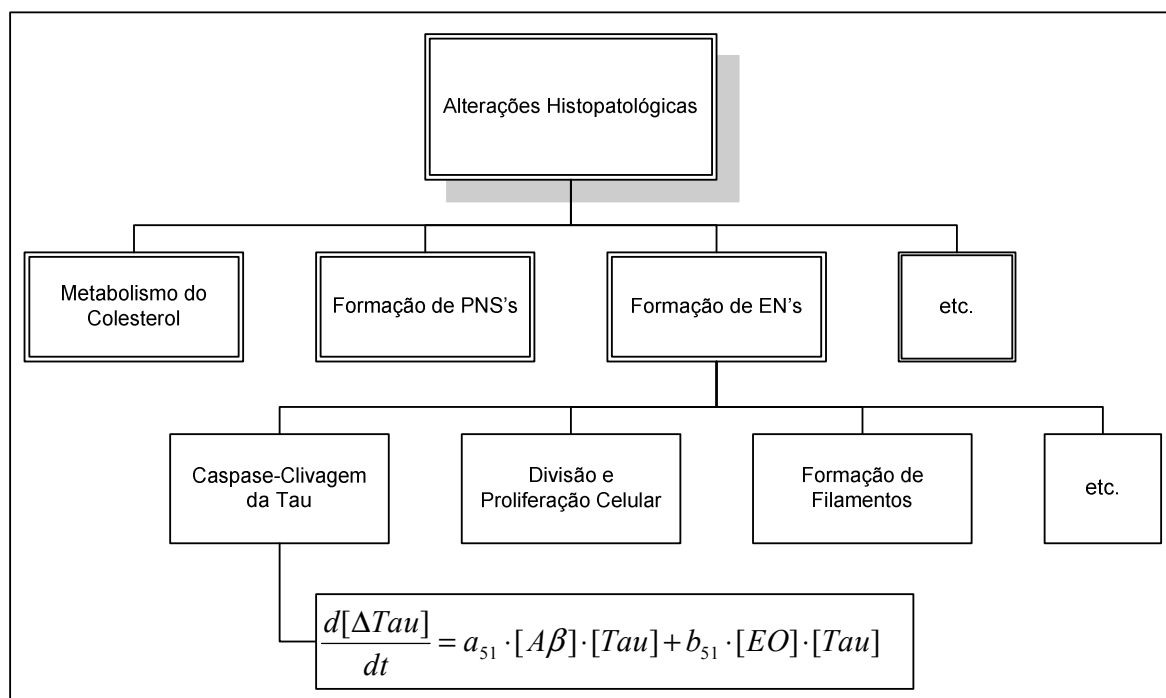


Figura III.1: Representação da doença de Alzheimer em forma de fluxograma.

Algumas vezes, durante a fase de definição das equações representativas do modelo, optou-se por eliminar termos e equações inteiras, quando essas representavam variações insignificantes ou metabólitos intermediários proporcionais a seus reagentes e produtos. Após o término da construção das equações, usou-se o método de Euler para solucioná-las de forma simultânea.

Alguns detalhes quantitativos foram colhidos e poderiam ter sido incorporados à simulação, porém o grande número de parâmetros cujos valores ainda são desconhecidos, discrepantes³³, ou que não foram possíveis de se obter na literatura consultada, limitaria a habilidade de descrever o processo todo em detalhes quantitativos. Vale lembrar que o objetivo da modelagem usando equações diferenciais é o de realizar uma aproximação

³³ Muitos dados quantitativos encontrados na literatura consultada não poderiam ser agregados conjuntamente, por serem originados de experiências com células de diferentes tipos de animais.

cinética e macro da realidade. Por isso, não levamos em consideração quantidades exatas, em moléculas ou volumes, de cada elemento de uma equação. Como estamos trabalhando com a dinâmica dos processos, usamos valores relativos e não absolutos, focalizando, principalmente, as relações de proporção entre as substâncias.

A última fase do trabalho compreendeu o estudo das respostas obtidas através do modelo matemático. Algumas soluções inesperadas ocorreram e, como era de se esperar, estavam sempre acompanhadas de algum erro ocorrido na modelagem. Assim, o modelo foi construído, atualizado e revisto, de forma cíclica, durante todo o processo de simulação.

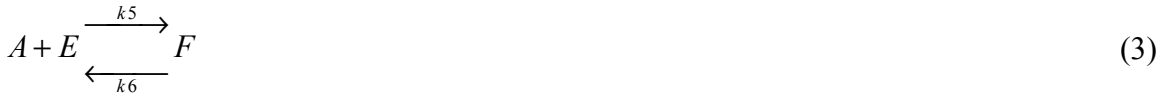
A idéia da simulação é a de investigar a cadeia de eventos que se seguem a um estímulo inicial. Neste modelo, esse estímulo foi definido como sendo o aumento do teor de colesterol na dieta ou a herança do alelo da apoE. Logo, se obtivermos sucesso na construção do modelo, os processos neurodegenerativos deverão começar no momento em que o teor de colesterol da dieta ultrapassar o valor atualmente considerado ideal, que é o de 300mg de ingestão diária, segundo a tabela DRI³⁴ (US, 2005).

III.1 - DETALHAMENTO DO MODELO DO COLESTEROL

Um sistema dinâmico consiste na união entre um conjunto de variáveis dependentes do tempo, chamadas de variáveis de estado, e uma regra que determinará o estado do sistema, em um instante t qualquer. O modelo matemático de um sistema dinâmico consiste de uma equação diferencial, ou um sistema de equações diferenciais.

A construção das equações que modelam o sistema proposto baseia-se em um conjunto de equações estequiométricas, que são transformadas em equações diferenciais. Tomando um exemplo genérico, iremos mostrar, passo a passo, como as equações do modelo foram construídas (FRANKS, 1972). Seja o conjunto de equações estequiométricas a seguir:

³⁴ Dietary Reference Intakes.



Onde k_i é o coeficiente de taxa de reação. Desmembrando as equações acima, teremos um conjunto de seis equações unidirecionais:



As equações de taxa de produção de cada substância, em termos de concentrações, podem ser deduzidas das equações de (4) a (9). Cada uma dessas novas equações indicará com que velocidade as substâncias do lado direito de uma equação estequiométrica são produzidas (FRANKS, 1972). Tomando-se, como exemplo, a equação (4), podemos ver que as substâncias C e D são produzidas a partir das substâncias A e B. Essa reação ocorrerá a

uma velocidade R_i , que é proporcional ao volume V do recipiente em que elas se encontram e às concentrações de A e B. No exemplo dado:

$$R_1 = k_1 \cdot V \cdot [A] \cdot [B] \quad (10)$$

$$R_2 = k_2 \cdot V \cdot [C] \cdot [D] \quad (11)$$

$$R_3 = k_3 \cdot V \cdot [C] \cdot [B] \quad (12)$$

$$R_4 = k_4 \cdot V \cdot [E] \quad (13)$$

$$R_5 = k_5 \cdot V \cdot [A] \cdot [E] \quad (14)$$

$$R_6 = k_6 \cdot V \cdot [F] \quad (15)$$

Onde:

[S] = concentração da substância S.

V = volume da reação.

R_i = velocidade da reação i .

Se considerarmos o volume do recipiente onde ocorrem todas as reações como sendo unitário, as equações anteriores se transformam em:

$$R_1 = k_1 \cdot [A] \cdot [B] \quad (16)$$

$$R_2 = k_2 \cdot [C] \cdot [D] \quad (17)$$

$$R_3 = k_3 \cdot [C] \cdot [B] \quad (18)$$

$$R_4 = k_4 \cdot [E] \quad (19)$$

$$R_5 = k_5 \cdot [A] \cdot [E] \quad (20)$$

$$R_6 = k_6 \cdot [F] \quad (21)$$

Analisando cada substância individualmente, podemos construir suas equações de balanço de massa. Tomemos, como exemplo, o que ocorre com a substância A. Analisando, conjuntamente, as equações estequiométricas iniciais e as reações de (16) a (21), podemos

ver que A é consumida nas reações R_1 (equação 16) e R_5 (equação 20)³⁵ e produzida pelas reações R_2 (equação 17) e R_6 (equação 21)³⁶. Logo, sua concentração aumenta proporcionalmente à velocidade das reações R_2 e R_6 e diminui proporcionalmente à velocidade das reações R_1 e R_5 . Logo, a equação de balanço de massa de A será:

$$\frac{d[A]}{dt} = R_2 + R_6 - R_1 - R_5 \quad (22)$$

Analogamente, teremos:

$$\frac{d[B]}{dt} = R_2 + R_4 - R_1 - R_3 \quad (23)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = R_1 + R_4 - R_2 - R_3 \quad (24)$$

$$\frac{d[D]}{dt} = R_1 - R_2 \quad (25)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = R_3 + R_6 - R_4 - R_5 \quad (26)$$

$$\frac{d[F]}{dt} = R_5 - R_6 \quad (27)$$

Substituindo os valores de R_i das equações nas equações acima, teremos, para A :

$$\frac{d[A]}{dt} = R_2 + R_6 - R_1 - R_5 = k_2 \cdot [C] \cdot [D] + k_6 \cdot [F] - k_1 \cdot [A] \cdot [B] - k_5 \cdot [A] \cdot [E] \quad (28)$$

³⁵ Como essa substância aparece no lado esquerdo da equação estequiométrica, há uma clara indicação de que a mesma é consumida nesta reação.

³⁶ Como essa substância aparece no lado direito da equação estequiométrica, há uma clara indicação de que a mesma é produzida nesta reação.

O mesmo pode ser feito para as demais substâncias e chegaremos, enfim, ao conjunto de equações diferenciais que modela as reações representadas pelas equações estequiométricas iniciais:

$$\frac{d[B]}{dt} = k_2 \cdot [C] \cdot [D] + k_4 \cdot [E] - k_1 \cdot [A] \cdot [B] - k_3 \cdot [C] \cdot [B] \quad (29)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k_1 \cdot [A] \cdot [B] + k_4 \cdot [E] - k_2 \cdot [C] \cdot [D] - k_3 \cdot [C] \cdot [B] \quad (30)$$

$$\frac{d[D]}{dt} = k_1 \cdot [A] \cdot [B] - k_2 \cdot [C] \cdot [D] \quad (31)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = k_3 \cdot [C] \cdot [B] + k_6 \cdot [F] - k_4 \cdot [E] - k_5 \cdot [A] \cdot [E] \quad (32)$$

$$\frac{d[F]}{dt} = k_5 \cdot [A] \cdot [E] - k_6 \cdot [F] \quad (33)$$

De uma forma geral, sempre que uma substância possuir um elemento facilitador, ele aparecerá como um termo positivo em sua equação de taxa de produção. Analogamente, os termos que dificultam a produção ou consomem uma substância aparecerão como termos negativos na equação. Os valores de k_i são definidos empiricamente (FRANKS, 1972). O mesmo foi feito nessa tese, uma vez que a obtenção de valores experimentais, das reações incluídas no modelo, encontrou as dificuldades expostas anteriormente.

Para gerar os diversos estados que o sistema pode assumir ao longo do tempo, utilizamos o método de Euler, que se baseia na aproximação da solução por retas tangentes. Neste método, dada uma equação diferencial (*figura III.2*) (CUNHA, 2003):

$$\frac{dy}{dx} = f(x_i, y_i)$$

e seu valor inicial $y(x_0) = y_0$. O valor da equação no passo seguinte, h , será:

$$y_{i+1} = y_i + h \cdot f(x_i, y_i)$$

$$x_{i+1} = x_i + i \cdot h, \quad n = 0, 1, 2, \dots$$

onde o valor de h é tal que:

$$h = \frac{x_{\max} - x_{\min}}{n^{\circ} \text{ de intervalos}}$$

Graficamente:

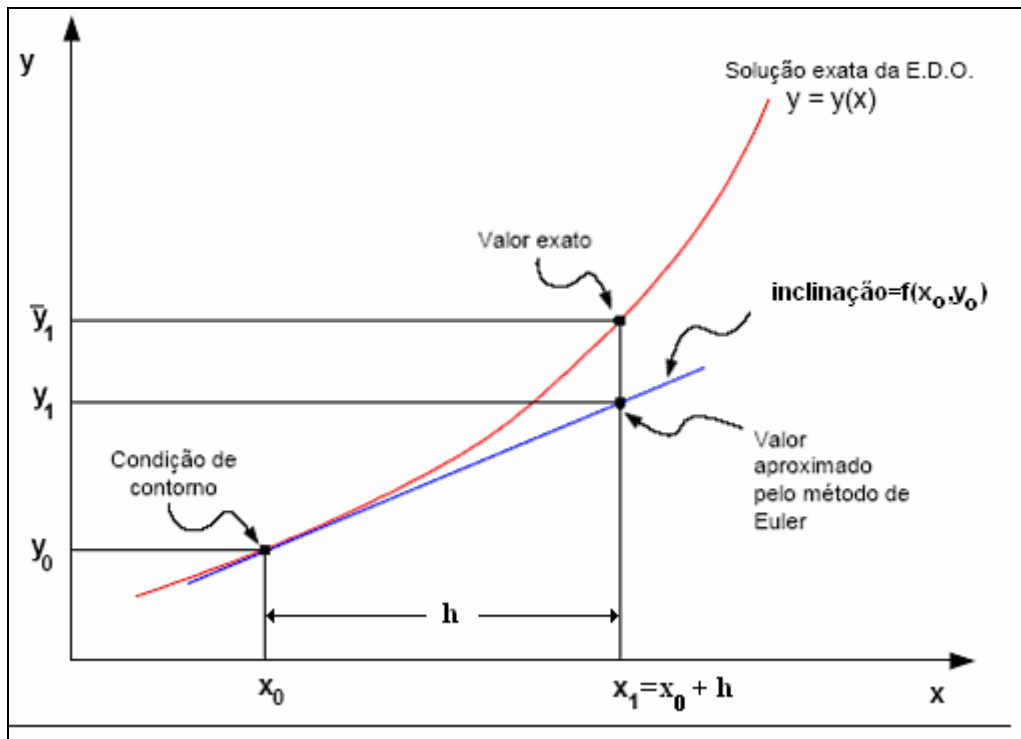


Figura III.2: Representação gráfica do método de aproximação de Euler.

III.2 - DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

O diagnóstico da DA, como já citado anteriormente, é feito por exclusão, uma vez que existem vários sintomas comuns entre ela e outras doenças neurodegenerativas. Logo, para se caracterizar um quadro clínico como sendo um caso de DA é necessária a ocorrência das duas alterações características da doença: as PNS's e os EN's. Podemos ainda considerar que o produto final da doença será a morte neuronal que essas ocorrências irão provocar.

De forma resumida, pode-se dizer que os principais fatores de risco para que a doença se desenvolva são: a idade avançada, a taxa alta de colesterol³⁷ e alguns componentes genéticos³⁸. Portanto, podemos afirmar que esses fatores de risco afetarão, de alguma maneira, processos importantes do funcionamento cerebral que, uma vez alterados, desembocarão no aparecimento das PNS's e dos EN's e no aumento da morte neuronal.

Se seguirmos a teoria do estresse oxidativo, que afirma ser o processo de envelhecimento um acúmulo de danos causados pelos radicais livres (GANONG), a variável *idade* poderá ser retirada do modelo. Assim, ao invés dessa variável, adotamos a premissa de que os níveis de radicais livres no SNC constituem um fator gerador de alterações fisiológicas. Assim, quanto maior for a produção de radicais livres no cérebro, maior será a perturbação ao funcionamento de alguns processos neuronais. Como o processo de oxidação está incluído no modelo construído, alguns eventos poderão acionar a produção de radicais livres que, por sua vez, afetará o funcionamento de outros processos.

Como consequência das considerações anteriores, as variáveis externas ao modelo serão apenas a herança do alelo da apoE e o teor de colesterol da dieta. O alelo da apoE será fixado a cada simulação (pois uma pessoa só pode ter um alelo durante toda a vida), ao passo em que a taxa de colesterol da dieta pode ser alterada durante a simulação.

³⁷ Conforme a hipótese fundamental desta tese.

³⁸ Desses últimos, consideraremos apenas os alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$, responsáveis pela síntese da proteína apoE, uma vez que o foco do trabalho é o estudo do papel do colesterol na DA. O estudo dos outros fatores genéticos envolvidos na patologia da DA está fora do escopo deste trabalho.

A seguir, iremos formalizar algumas hipóteses que precisaram ser assumidas durante o desenvolvimento do modelo, a fim de se resolver algumas ambigüidades encontradas na literatura.

Hipótese 1: A ocorrência de eventos apoptóticos fará com que o neurônio tente reiniciar seu ciclo de vida. A tentativa de mitose no neurônio maduro irá causar a sua apoptose.

Seguiremos a teoria defendida por NEVE, 2000, a qual afirma que, se um neurônio for forçado a reativar seu processo de divisão celular após atingir a maturidade, ele morre.

Hipótese 2: O colesterol afeta, de forma inversamente proporcional, a permeabilidade da membrana celular à proteína A β .

Quando a taxa de colesterol da membrana é muito pequena, sua permeabilidade é alta e o A β é capaz de atravessá-la para ser degradado no interior do neurônio. O aumento do teor de colesterol da membrana neuronal diminui, proporcionalmente, sua fluidez, dificultando a entrada do A β . Quando o teor de colesterol se encontra em uma faixa intermediária, uma fração do total de A β , na forma polimerizada, irá se posicionar no meio da mesma, formando canais de cálcio. Se o teor de colesterol ultrapassar essa faixa intermediária, os polímeros do A β serão totalmente impedidos de se inserir na membrana, acumulando-se no meio extracelular.

Hipótese 3: Uma fração do colesterol da dieta é capaz de entrar no SNC, através da BHE.

Hipótese 4: O A β solúvel é capaz de ser exportado através da BHE, tanto sozinho quanto conectado à proteína apoE. A ligação do A β com essa proteína faz com que essa travessia seja mais rápida e, conseqüentemente, mais eficiente.

Apesar de ocorrer também transporte do A β pela proteína apoS, o mesmo será ignorado neste trabalho, uma vez que não existem evidências de que essa proteína esteja relacionada à DA.

O modelo proposto possui grande complexidade, não apenas pelo imenso número de variáveis envolvidas, mas também por trabalhar com o importante balanceamento da homeostase do colesterol.

Por um lado, o colesterol possui um papel protetor da função sináptica. Pode-se supor, por exemplo, que uma pequena redução no teor de colesterol da membrana neuronal diminua a sua resistência ao A β , evitando a inserção parcial deste na membrana. Um resultado seria a redução na taxa de formação de canais de cálcio, impedindo o excesso dessas estruturas.

Assim, reduzindo-se o colesterol da MPS, haveria pouca entrada de cálcio na célula, o que, em células idosas, com componentes já danificados, poderia ter um efeito benéfico. No caso específico das mitocôndrias, que são algumas das estruturas responsáveis pela remoção do excesso de cálcio do citoplasma, a redução da entrada de cálcio diminuiria a sua carga de trabalho e a conseqüente produção de radicais livres.

Por outro lado, o excesso de colesterol pode se tornar tóxico quando, por exemplo, o aumento de seu teor na membrana plasmática induzir a formação de clusters específicos na mesma, facilitando o processo de agregação do A β . Logo, o aumento da taxa de colesterol no SNC irá aumentar a toxicidade do A β . Além disso, haverá um aumento anormal no número de canais de cálcio, trazendo consigo um aumento no influxo destes íons na célula, comprometendo o seu funcionamento.

Conforme definido previamente, as únicas variáveis externas ao sistema são o alelo da apoE e o teor de colesterol da dieta. Logo, como a DA se caracteriza pela formação de alterações específicas, podemos concluir que o alelo da apoE e o teor de colesterol da dieta irão gerar as alterações histopatológicas da DA. Graficamente, podemos representar essa afirmação pelo gráfico da *figura III.3*. Segundo o método descrito na sessão anterior, o processo de formação das Alterações Histopatológicas deverá ser desmembrado em outros processos mais simples, conforme veremos a seguir.

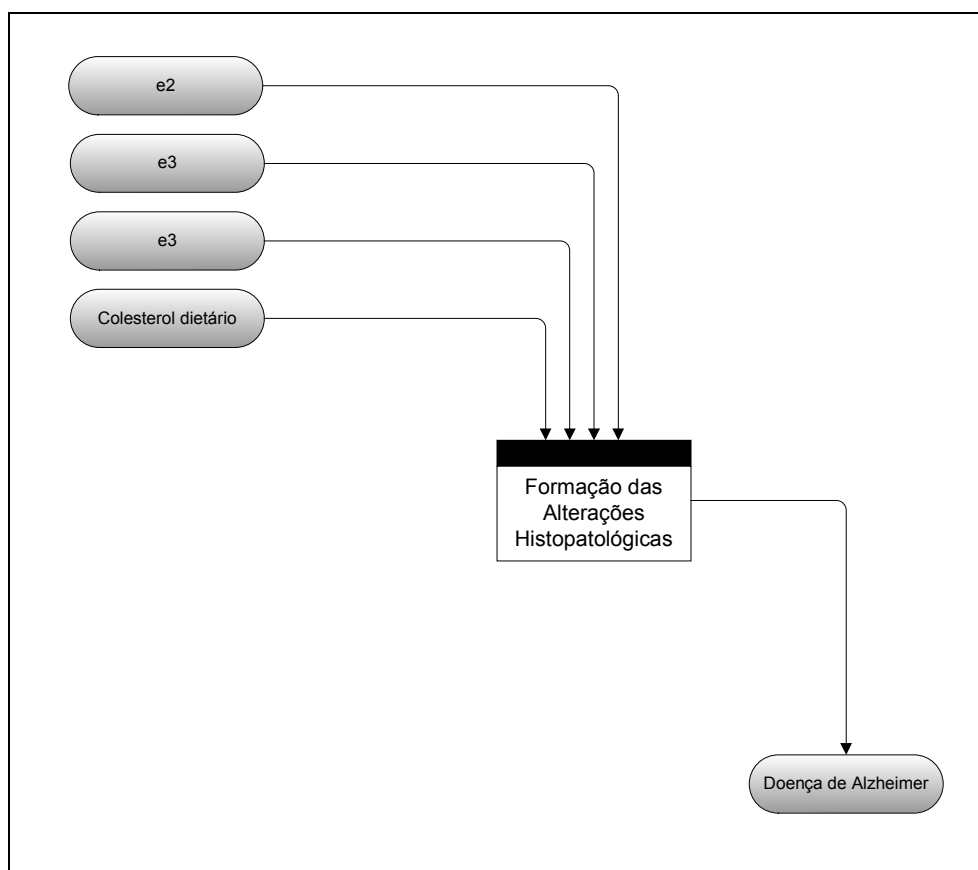


Figura III.3: Causas da Doença de Alzheimer.

III.3 - FORMAÇÃO DE ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS

Durante o estudo sobre a DA, foram identificados alguns processos-chave envolvidos na formação das alterações características da DA. Assim, o processo de *Formação de Alterações Histopatológicas* foi decomposto em seis subprocessos principais (*figura III.4*), sendo eles:

- Metabolismo do Colesterol.
- Formação de PNS's.
- Estresse Oxidativo.
- Metabolismo do Cálcio.
- Formação de EN's.
- Morte Neuronal.

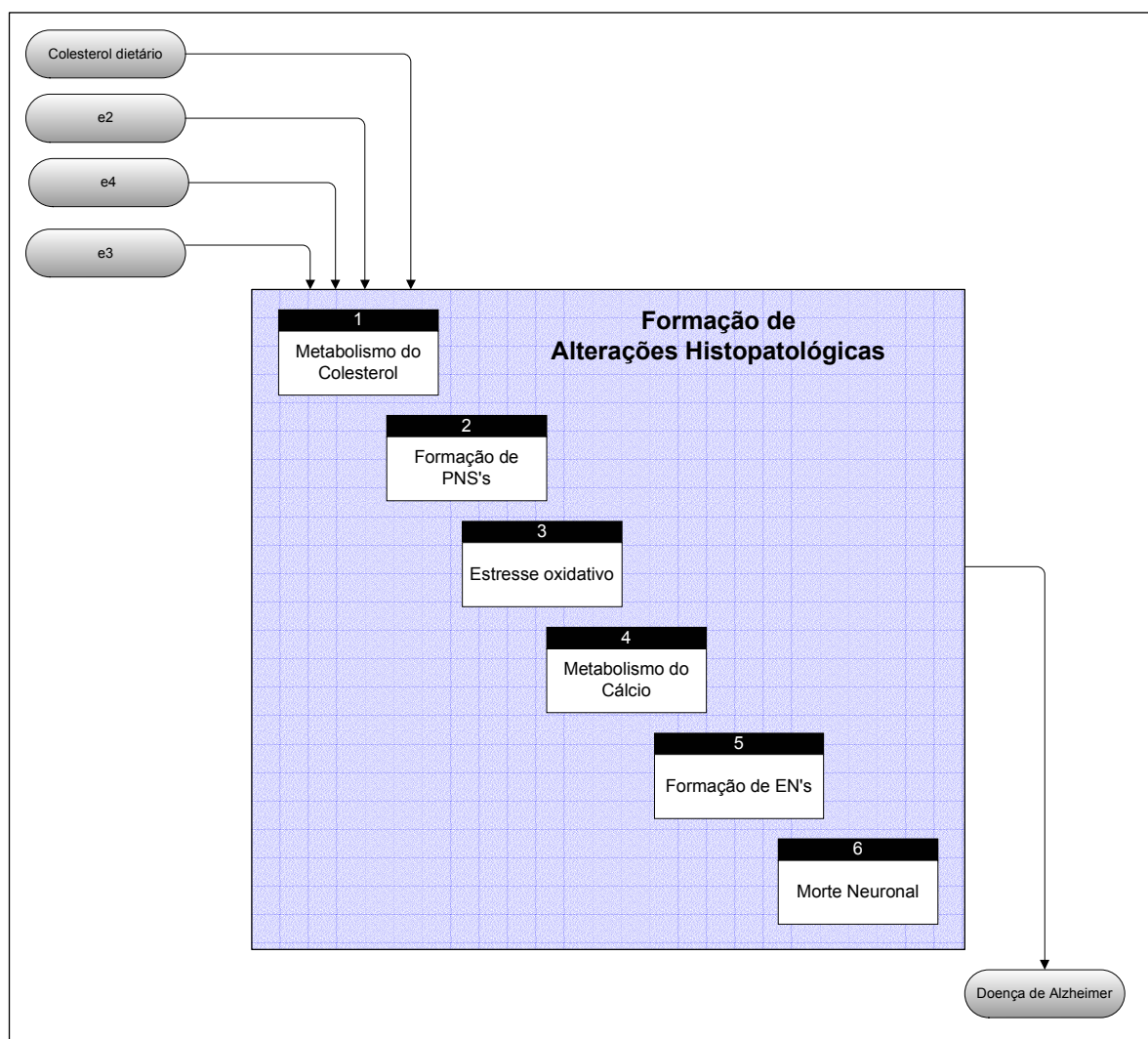


Figura III.4: Explosão do processo de Formação de Alterações Histopatológicas.

Após a identificação dos processos principais, verificou-se a existência de uma grande interação entre eles. A identificação de todas as variáveis³⁹ que, produzidas por um processo, irão influenciar um outro processo, é essencial para o entendimento da dinâmica da DA. Além disso, verificamos, para cada processo, quais fatores poderiam afetar o seu funcionamento e qual era o processo, ou variável externa, responsável por essa influência. Para realizar essa tarefa, o procedimento adotado foi o de isolar cada processo e estudá-lo individualmente.

³⁹ Essas variáveis podem ser substâncias, estruturas ou, ainda, alterações na concentração desses elementos.

A união de todos os processos e suas respectivas interações podem ser resumida pela *figura III.5*.

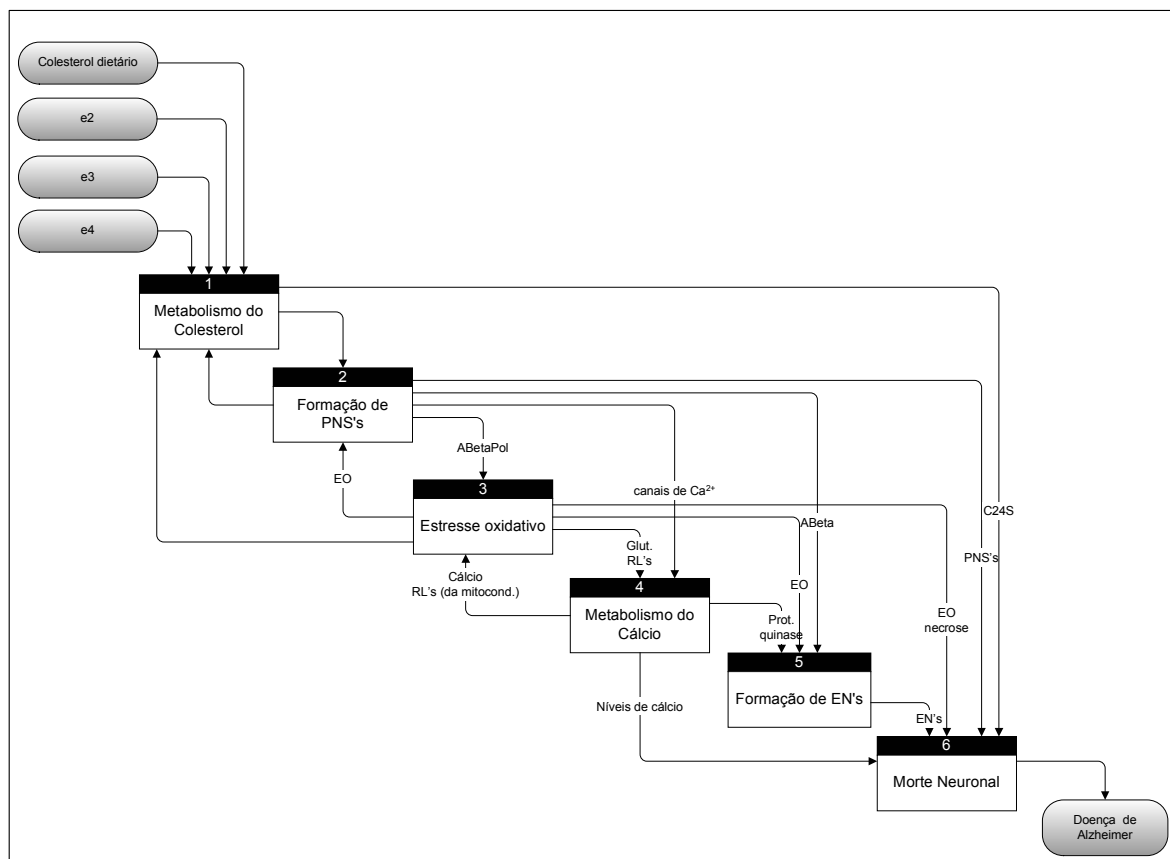


Figura III.5: Diagrama geral do processo de desenvolvimento da Doença de Alzheimer

Uma vez que os processos citados foram considerados muito complexos para a construção de um modelo matemático diretamente a partir deles, cada um foi novamente explodido e detalhado, até que se chegasse aos processos básicos do modelo. Os processos denominados Estresse Oxidativo e Metabolismo do Cálcio, por sua extrema complexidade, foram objetos de estudo de duas monografias de mestrado desenvolvidas concomitantemente a esse trabalho (BARRETO, 2005, REIS, 2005).

A união dos modelos desenvolvidos nessas monografias com o modelo do presente trabalho encontrou algumas dificuldades, já que as reações oxidativas e o acionamento das bombas de cálcio, por exemplo, são eventos muito mais rápidos do que a formação de

PNS's e EN's. A forma escolhida para unificar todos os processos foi utilizar um passo de mesmo tamanho em todas as equações, mas controlando a velocidade das reações através das taxas de cinética química de cada reação. Assim, enquanto um passo de integração corresponde a 10^{-6} segundos nos trabalhos anteriores, no modelo desta tese ele irá corresponder a um período de oito horas, porém sem alterarmos o valor nominal do passo h . No total, a simulação por um período de 100 anos corresponderia a 109500 passos de 8 horas. Para facilitar a visualização dos eventos, arredondamos o número de passos para 100000, correspondendo a períodos aproximados de 8 horas, por 100 anos.

Na ligação com o modelo do Metabolismo do Cálcio, as oscilações, inerentes ao modelo e mostradas nos resultados encontrados por BARRETO, 2005, tornariam muito complexa a sua conexão direta com o modelo desta tese. Nesse trabalho anterior, as concentrações intracelulares de cálcio foram modeladas de forma a representar oscilações que ocorrem em poucos microssegundos e que influenciam o potencial de ação do neurônio. O presente trabalho, por outro lado, trabalha com valores médios dessas concentrações, ao longo de décadas. Para que fosse possível unir os dois modelos, seria necessário refazer todo o processo de balanceamento do Metabolismo do Cálcio, para que ambos trabalhassem com a mesma escala temporal. Para evitar a necessidade de se refazer todo o modelo do Metabolismo do Cálcio, a resultante desse sistema é calculada aqui, diretamente, através da utilização de uma equação sigmóide, como será explicado mais adiante.

Por outro lado, a conexão com o modelo do Estresse Oxidativo não exigiu nenhuma alteração neste, uma vez que as escalas de tempo dos dois trabalhos e as variáveis necessárias para a união dos modelos já estavam presentes em ambos. Assim, como o sistema de simulação foi implementado em linguagem orientada a objetos, bastou acessar diretamente as classes e atributos do modelo do Estresse Oxidativo, para que a conexão se realizasse.

Todos os demais processos mostrados na *figura III.5* foram estudados nesta tese. A seguir detalharemos cada um deles, isoladamente, descrevendo seu funcionamento e suas

interações com os outros componentes, sejam eles processos, entradas externas, ou ainda, resultantes finais do modelo.

III.4 - O METABOLISMO DO COLESTEROL

O processo de controle do metabolismo do colesterol no SNC, se isolado dos demais processos, pode ser representado pela *figura III.6*.

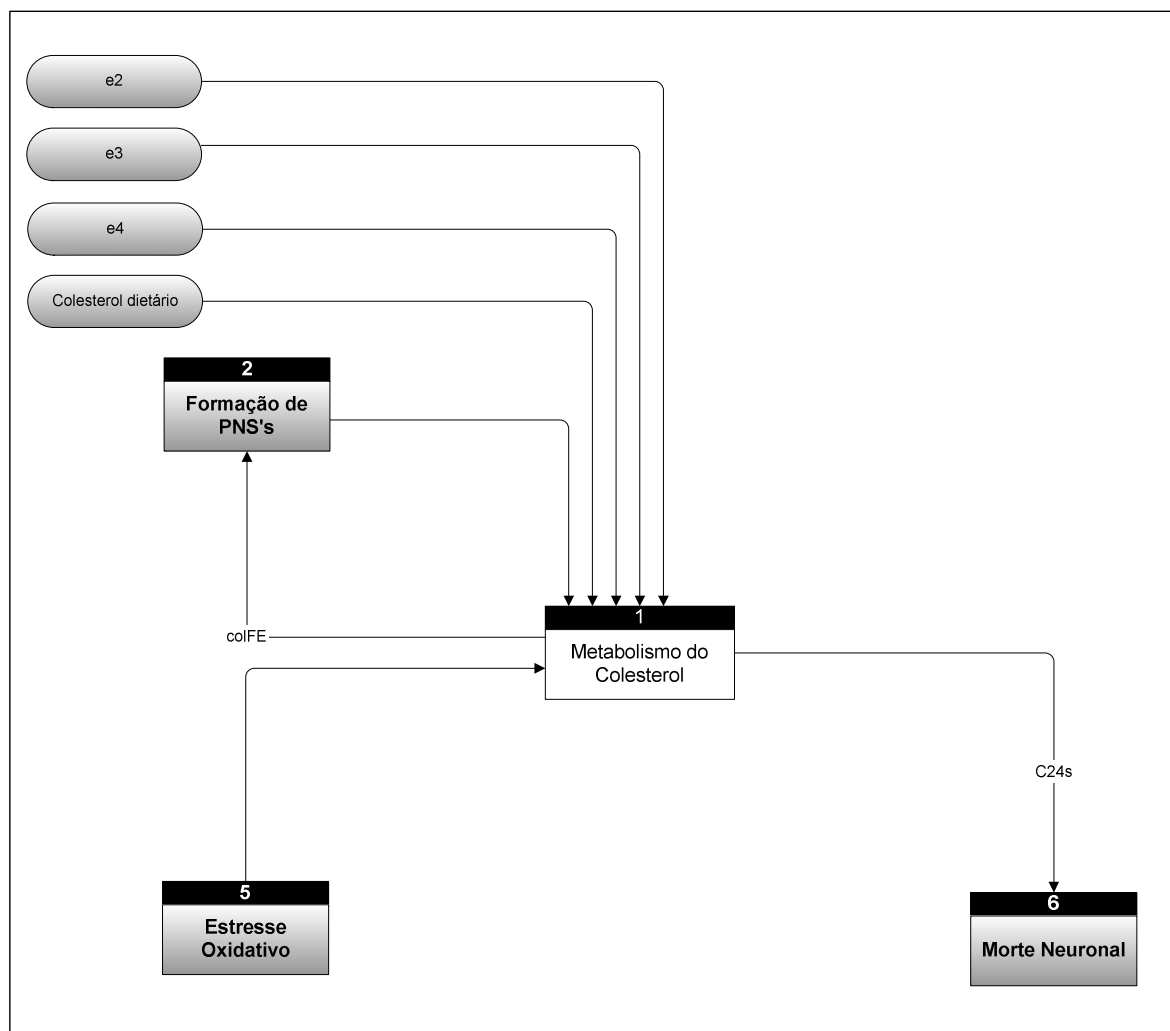


Figura III.6: Diagrama geral do Metabolismo do Colesterol.

Durante o estudo desse processo, pudemos identificar cinco sub-processos, que serão detalhados a seguir (*figura III.7*):

- Entrada de Colesterol no SNC.
- Controle do Nível de Colesterol no SNC.
- Síntese da apoE.
- Configuração das MPS's.

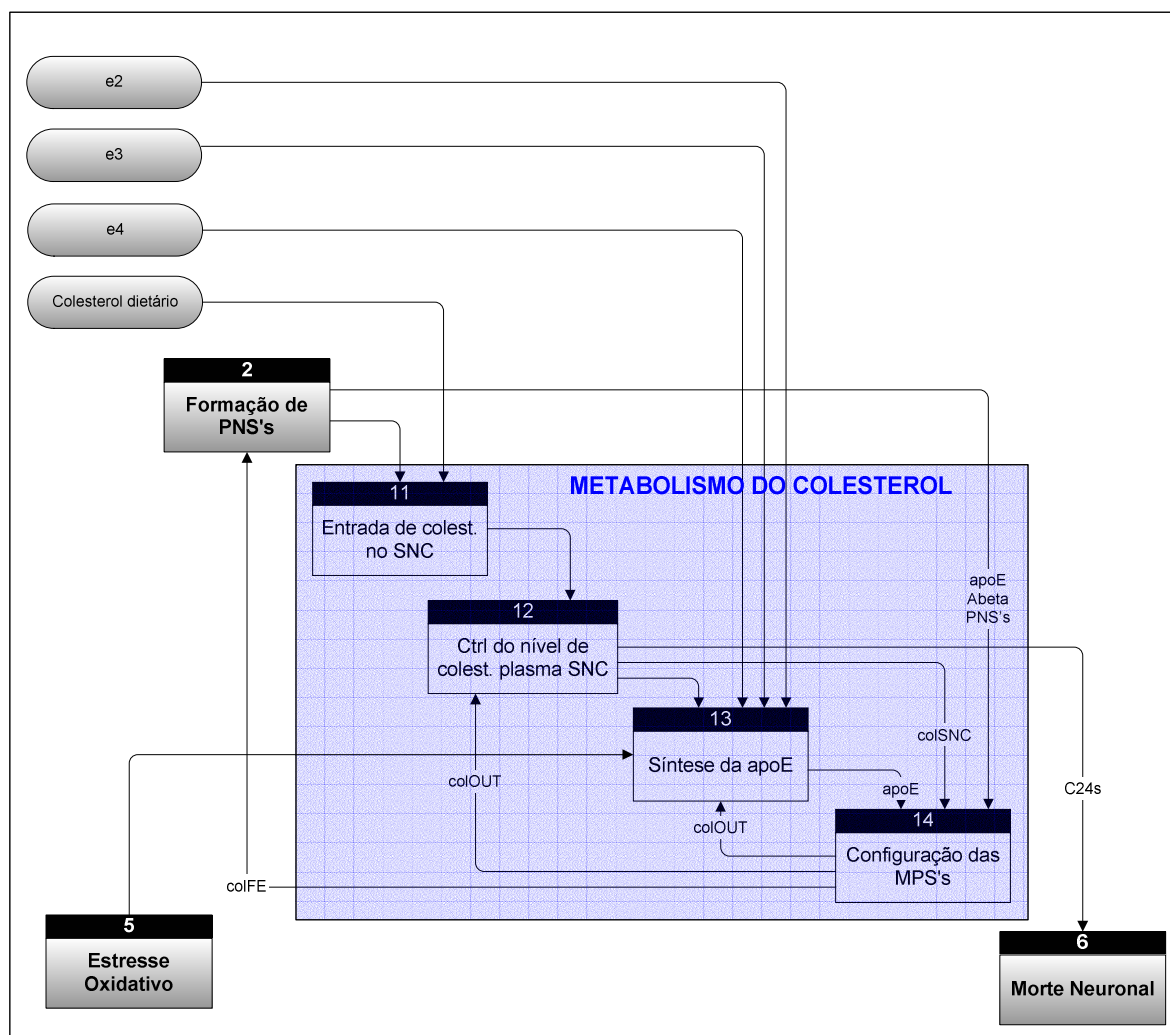


Figura III.7: Explosão do processo de Metabolismo do Colesterol.

III.4.1 - Processo: Entrada de Colesterol no SNC

Não há consenso nos estudos sobre as relações existentes entre os níveis de colesterol no plasma e no SNC, em pacientes com a DA. A dúvida surge porque o colesterol sanguíneo e o colesterol cerebral estão localizados em dois depósitos distintos, separados pela BHE. Diferentes pesquisas, conduzidas com abordagens distintas, chegaram a diferentes conclusões sobre o colesterol no cérebro. Várias delas indicam que o cérebro pode receber colesterol do sangue, sendo transportado através da BHE, provavelmente mediado por receptores LDL. Outras afirmam que o fornecimento de colesterol por fontes exógenas ao cérebro é desprezível, concluindo que o cérebro obtém a maior parte de seu colesterol da biossíntese *in situ*, pelo menos no início da vida (EDMOND, 1991).

Outros estudos mostraram que cerca de 7% do colesterol cerebral origina-se de fontes exógenas, concluindo que a hipótese da BHE não vale para o colesterol. Além disso, ele poderia chegar ao cérebro via plexo coróide ou pela barreira cérebro-espinhal sanguínea (EDMOND, 1991). De fato, muitos caminhos, tanto extras como intracelulares, estão disponíveis para que proteínas, peptídeos, viroses e toxinas entrem no SNC evitando a BHE. Experimentos com ratos comprovam ainda a existência de vias extracelulares para a entrada de proteínas do plasma no SNC, que evitam a BHE (BROADWELL, 1993).

No modelo, considerou-se que a quantidade de colesterol que entra no SNC ($colIN$), em um dado instante, é diretamente proporcional ao colesterol ingerido diariamente ($colDieta$). Logo:

$$[colIN] = a_{11} \cdot [colDieta] \quad (34)$$

Algumas alterações observadas no funcionamento de enzimas da BHE, de animais submetidos à dieta de hipercolesterolemia, levantaram a suspeita de que o aumento do colesterol afete, de alguma maneira, o funcionamento da barreira (KALMAN, 2001). Uma dessas alterações pode decorrer de um distúrbio, ainda desconhecido, na integridade estrutural da parede vascular, causando o aumento de permeabilidade da BHE. Essas

alterações podem ser observadas junto às PNS's, acompanhando um aumento no influxo de colesterol. Nesses pontos, podemos observar uma infiltração das PNS's no vaso, o aumento da membrana basal e mudanças degenerativas do revestimento endotelial (VORBRODT, 1994). Logo, precisamos acrescentar mais um termo à equação anterior, relacionando a quantidade de PNS's ao colesterol entrando no SNC⁴⁰:

$$[colIN] = a_{11} \cdot [colDieta] + b_{11} \cdot [PNS] \quad (35)$$

As interações modeladas pela equação (35) podem ser representadas pelo diagrama abaixo (figura III.8):

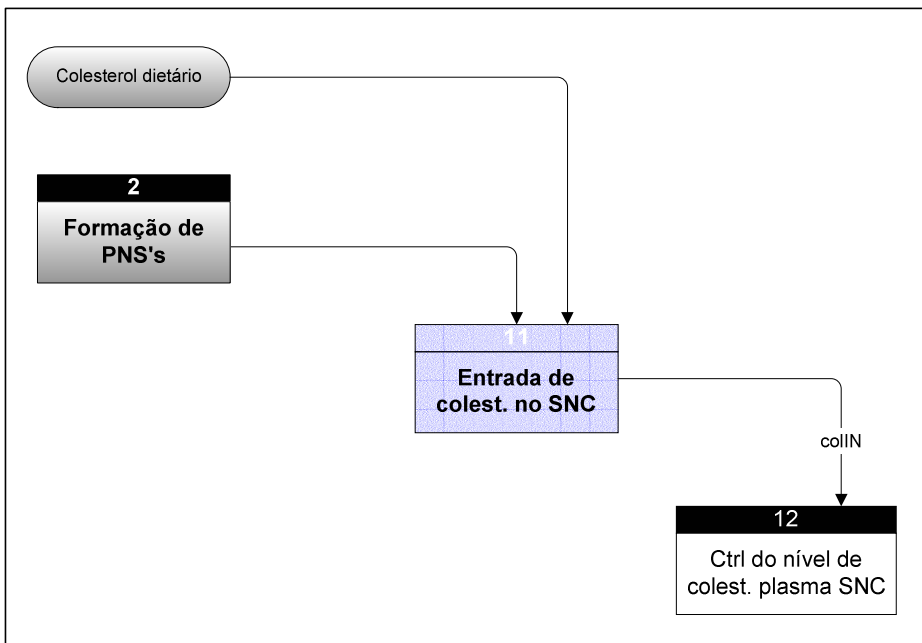


Figura III.8: Entrada de Colesterol no SNC.

⁴⁰ Durante o processo de balanceamento de uma equação, seu comportamento foi analisado individualmente, para cada termo que a compõe. Assim, foi possível analisar a forma como cada termo influencia a resultante da equação. Os valores de cada coeficiente de taxa de reação foram então definidos de forma a tornar a equação balanceada por seus termos.

III.4.2 - Processo: Controle do Nível de Colesterol no SNC

O saldo de colesterol no cérebro ($colSNC$), a cada instante, é dado pela diferença entre o colesterol que entrou no cérebro, via BHE ($colIN$), menos o que saiu, pelo mesmo caminho ($colOUT$)⁴¹, ligado à apoE.

$$[colSNC] = [colIN] - [colOUT] \quad (36)$$

Se a quantidade total de colesterol no cérebro for de fato um fator de risco para a DA, então é razoável afirmar que a quantidade de colesterol em um cérebro com DA é diferente da quantidade de colesterol em um cérebro sem DA. O aumento do teor de colesterol no SNC, em decorrência do aumento do colesterol no plasma é muito suave e não possui de fato significância estatística. Entretanto, o teor de colesterol no córtex cerebral mostra um aumento mais robusto e significativo (HOWLAND, 1998).

Uma possibilidade para isso é que o teor de colesterol não se altere de forma significativa porque o cérebro consegue manter o mesmo a níveis normais. Quando o teor de colesterol no cérebro aumenta a ponto de saturar, ocorre o acionamento de uma via alternativa de extrusão. Isso é feito por conversão do colesterol para uma substância neurotóxica, o 24s-hidroxicolesterol (C24S), que é resultante do metabolismo alterado do colesterol e o principal produto da eliminação de seu excesso do cérebro. Quando convertido em C24S, o colesterol é capaz de atravessar sozinho a BHE. De fato, observa-se um aumento nos níveis dessa substância nos pacientes de DA e de demência vascular (BURNS, 2002, PAPPOLLA, 2002, WOOD, 2003). Logo, a produção de C24S é diretamente proporcional ao colesterol no cérebro ($colSNC$). Além disso, mesmo quando o teor de colesterol no SNC é alto, consideramos no modelo que a conversão para C24S só irá ocorrer quando não houver apoE disponível para transportá-lo para fora do cérebro. Logo, teremos que:

⁴¹ Ver equação (13).

$$[C24S] = c_{12} \cdot \frac{[colSNC]}{[apoE]} \quad (37)$$

Quando $[apoE] \geq 0$, e:

$$[C24S] = c_{12} \cdot [colSNC] \quad (38)$$

Quando não há apoE disponível no SNC.

Adicionando esse último termo à equação (36), teremos:

$$[colSNC] = [colIN] - [colOUT] - [C24S] \quad (39)$$

Graficamente, a equação (39) pode ser representada pela *figura III.9*, a seguir:

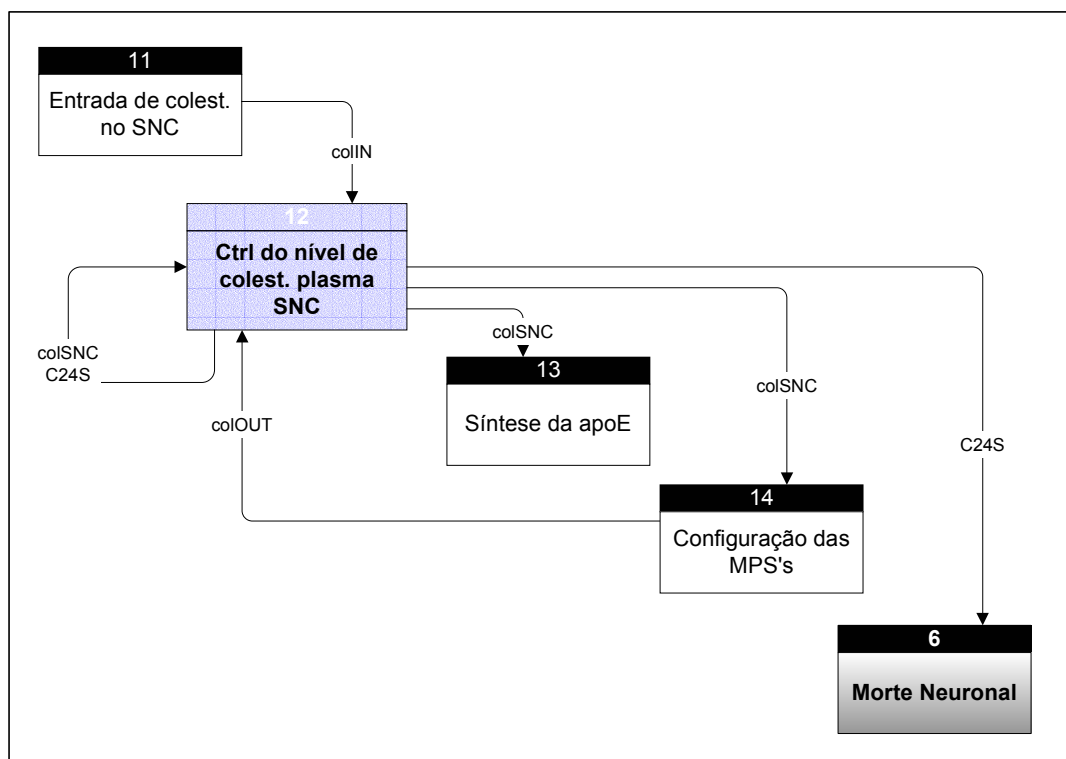


Figura III.9: Controle do Nível de Colesterol no SNC.

III.4.3 - Processo: Síntese da apoE

Aparentemente, a expressão da apoE no fígado e no cérebro é regulada pelos níveis de colesterol plasmático. Muitas evidências, comprovadas por experiência *in vivo* e *in vitro*, mostraram que a hipercolesterolemia aumenta a expressão da apoE no cérebro (HALEY, 2000, PAPPOLLA, 2002). Em uma experiência realizada com ratos, observou-se que o aumento na apoE do plasma, em resposta ao aumento do colesterol, possui uma correlação positiva de 0,86 (HOWLAND, 1998).

Em humanos, nota-se que indivíduos portadores de duas cópias do alelo $\epsilon 4$ apresentam níveis altos de colesterol no plasma e maior risco de desenvolverem DA e doenças cardiovasculares (REFOLO, 2000). Então, consideraremos que os níveis da apoE, na presença do alelo $\epsilon 2$, são maiores do que os níveis quando ocorre a expressão do alelo $\epsilon 4$. Conseqüentemente, para uma mesma concentração de colesterol no SNC, o transporte do colesterol será mais eficiente com o alelo $\epsilon 2$ do que com o alelo $\epsilon 4$.

Logo, como a taxa de produção da proteína apoE aumenta proporcionalmente ao teor de colesterol do SNC ($colSNC$), ao mesmo tempo em que depende do alelo da mesma ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ou $\epsilon 4$), podemos dizer que a taxa de produção de apoE ocorre segundo à equação⁴²:

$$\frac{d[apoE]}{dt} = a_{13} \cdot [colSNC] \cdot [\epsilon 2] + b_{13} \cdot [colSNC] \cdot [\epsilon 3] + c_{13} \cdot [colSNC] \cdot [\epsilon 4] \quad (40)$$

Assim, para uma mesma quantidade de colesterol no SNC, teremos:

$$a_{13} > b_{13} > c_{13}$$

A distribuição do colesterol nas MPS's de ratos idosos é similar à dos ratos com deficiência de apoE, onde as FE's têm, no mínimo, duas vezes mais colesterol do que o grupo de controle. Como a apoE é sintetizada nos astrócitos e transportada para os neurônios, esse

⁴² Outros termos ainda serão adicionados a esta equação mais adiante.

transporte pode se alterar com a idade. Pode haver também diminuição da capacidade do apoE em se ligar aos lipídios ou interagir com os receptores da superfície. De fato, o risco do apoE4 parece ser mediado pelo alto colesterol apenas nos indivíduos com mais de 65 anos (FREARS, 1999).

Então, podemos simplificar a afirmação anterior, considerando que a eficiência da apoE não se altere com a idade, mas sua produção sim (WOOD, 2002). Como estamos considerando que o envelhecimento ocorre como resultado do estresse oxidativo (EO), novamente este será considerado no lugar da idade. Se a apoE diminui com a idade, podemos acrescentar um termo à equação (40), que se transforma em:

$$\frac{d[apoE]}{dt} = a_{13} \cdot [colSNC] \cdot [\varepsilon 2] + b_{13} \cdot [colSNC] \cdot [\varepsilon 3] + c_{13} \cdot [colSNC] \cdot [\varepsilon 4] - d_{13} \cdot [EO] \quad (41)$$

Como cada tipo de apoE terá uma eficiência diferente no transporte do colesterol e do A β , optamos por dividir o valor da concentração de apoE em concentrações de apoE2, apoE3 e apoE4, a fim de facilitar a compreensão de algumas equações do modelo. Logo, as concentrações de cada tipo de apoE serão utilizadas separadamente. Desta forma, a equação (41) foi desmembrada em três outras equações:

$$\frac{d[apoE2]}{dt} = a_{13} \cdot [colSNC] \cdot [\varepsilon 2] - d_{13} \cdot [EO] \quad (42)$$

$$\frac{d[apoE3]}{dt} = b_{13} \cdot [colSNC] \cdot [\varepsilon 3] - d_{13} \cdot [EO] \quad (43)$$

$$\frac{d[apoE4]}{dt} = c_{13} \cdot [colSNC] \cdot [\varepsilon 4] - d_{13} \cdot [EO] \quad (44)$$

As equações (42) a (44) podem ser representadas pelo diagrama a seguir (*figura III.10*):

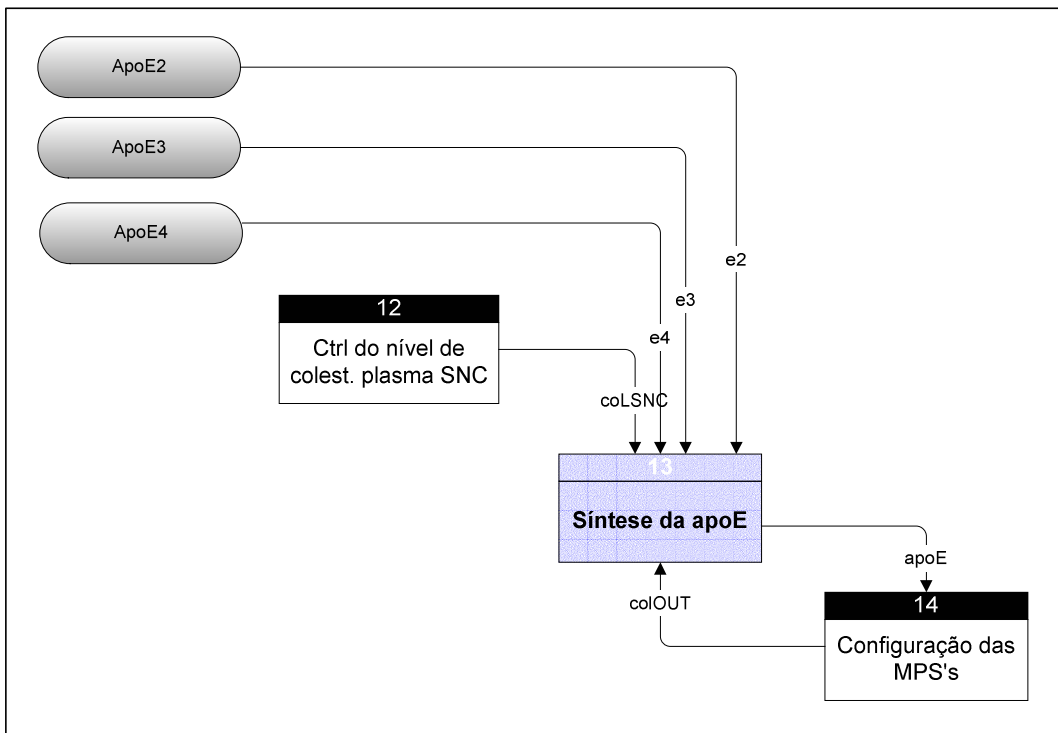


Figura III.10: Síntese da apoE.

III.4.4 - Processo: Configuração das MPS's

Como a maior parte do colesterol no SNC está na membrana neuronal, podemos dizer que a quantidade de colesterol na MPS ($colMPS$) é diretamente proporcional ao colesterol no SNC ($colSNC$):

$$[colMPS] = a_{14} \cdot [colSNC] \quad (45)$$

Esse valor, porém, é constantemente alterado, já que, a cada instante, uma parte da apoE já sintetizada é utilizada para remover o colesterol em excesso do SNC, na tentativa de manter os teores cerebrais ideais desse esteróide. A apoE se liga ao colesterol para que o mesmo possa ser exportado pela BHE (TRIEU, 2000).

Como cada tipo de apoE irá ter uma eficiência distinta, a quantidade anterior será alterada segundo a taxa descrita pela equação a seguir:

$$\frac{d[colMPS]}{dt} = -b_{14}[colMPS] \cdot [apoE2] - c_{14} \cdot [colMPS] \cdot [apoE3] - d_{14} \cdot [colMPS] \cdot [apoE4] \quad (46)$$

Temos ainda que atualizar os valores da apoE. Incluindo os termos negativos da equação (46) nas equações (42) a (44), temos:

$$\frac{d[apoE2]}{dt} = a_{13} \cdot [colSNC] \cdot [\varepsilon2] - b_{14} \cdot [colMPS] \cdot [apoE2] - d_{13} \cdot [EO] \quad (47)$$

$$\frac{d[apoE3]}{dt} = b_{13} \cdot [colSNC] \cdot [\varepsilon3] - c_{14} \cdot [colMPS] \cdot [apoE3] - d_{13} \cdot [EO] \quad (48)$$

$$\frac{d[apoE4]}{dt} = c_{13} \cdot [colSNC] \cdot [\varepsilon4] - d_{14} \cdot [colMPS] \cdot [apoE4] - d_{13} \cdot [EO] \quad (49)$$

Como o colesterol que sai do SNC (colOUT), via BHE, está ligado à apoE (KOUKINOV, 2001), simplificaremos o cálculo do total de colesterol exportado a cada instante, considerando que todo ele se origina da MPS. Podemos então calcular o valor desse termo, que aparece nas equações (36) e (39), através da equação abaixo, que corresponde à mesma quantidade de colesterol que saiu da membrana (*equação 46*):

$$[colOUT] = b_{14} \cdot [colMPS] \cdot [apoE2] + c_{14} \cdot [colMPS] \cdot [apoE4] + d_{14} \cdot [colMPS] \cdot [apoE3] \quad (50)$$

Sabe-se que a FC de cérebros jovens contém algo em torno de 85% de todo o colesterol da membrana plasmática (JI, 2002). Assim, inicialmente:

$$[colFC] = 0,85 \cdot [colMPS] \quad (51)$$

Porém, com o envelhecimento, a distribuição de colesterol entre as folhas da membrana tende a se igualar, acompanhando o aumento do teor total de colesterol da mesma (WOOD, 2002). Além disso, especula-se que os domínios de colesterol da membrana, particularmente os da FE, estejam alterados na DA, tornando-se vulneráveis à perturbação

pelo $A\beta$. Como as reservas de colesterol, que efetuam as trocas entre o colesterol da FE e o da FC, encontram-se nesses domínios lipídicos, iremos assumir que não a idade, mas sim o acúmulo de $A\beta$ e PNS's e o estresse oxidativo (EO) afetam a distribuição entre o colesterol da FC (colFC) e o colesterol da FE (colFE), resultando em disfunções da membrana e da célula. Logo:

$$[colFC] = 0,85 \cdot [colMPS] - e_{14} \cdot [PNS] - f_{14} \cdot [A\beta] - g_{14} \cdot [EO] \quad (52)$$

Como:

$$\begin{cases} \alpha \cdot [colFE] + \beta \cdot [colFC] = [colMPS] \\ \alpha + \beta = 1 \end{cases}$$

Onde: α e β são os percentuais de colesterol na FE e na FC, respectivamente, em relação à quantidade total de colesterol na membrana.

Temos que:

$$[colFE] = [colMPS] - [colFC] \quad (53)$$

A representação gráfica das equações que compõem esse processo está na *figura III.11*, a seguir.

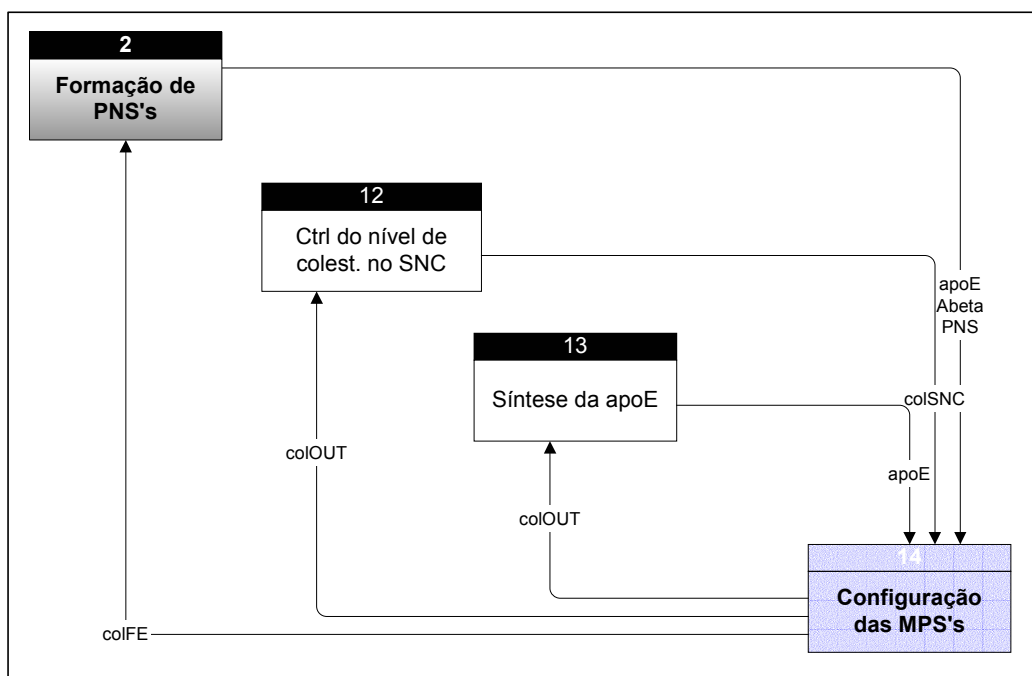


Figura III.11: Configuração das MPS's.

III.5 - FORMAÇÃO DE PLACAS NEURÍTICAS SENIS

Um outro processo chave do desenvolvimento da DA é a formação de PNS's. Isolando-se esse processo, podemos representar suas interações com os demais, através do diagrama da *figura III.12*.

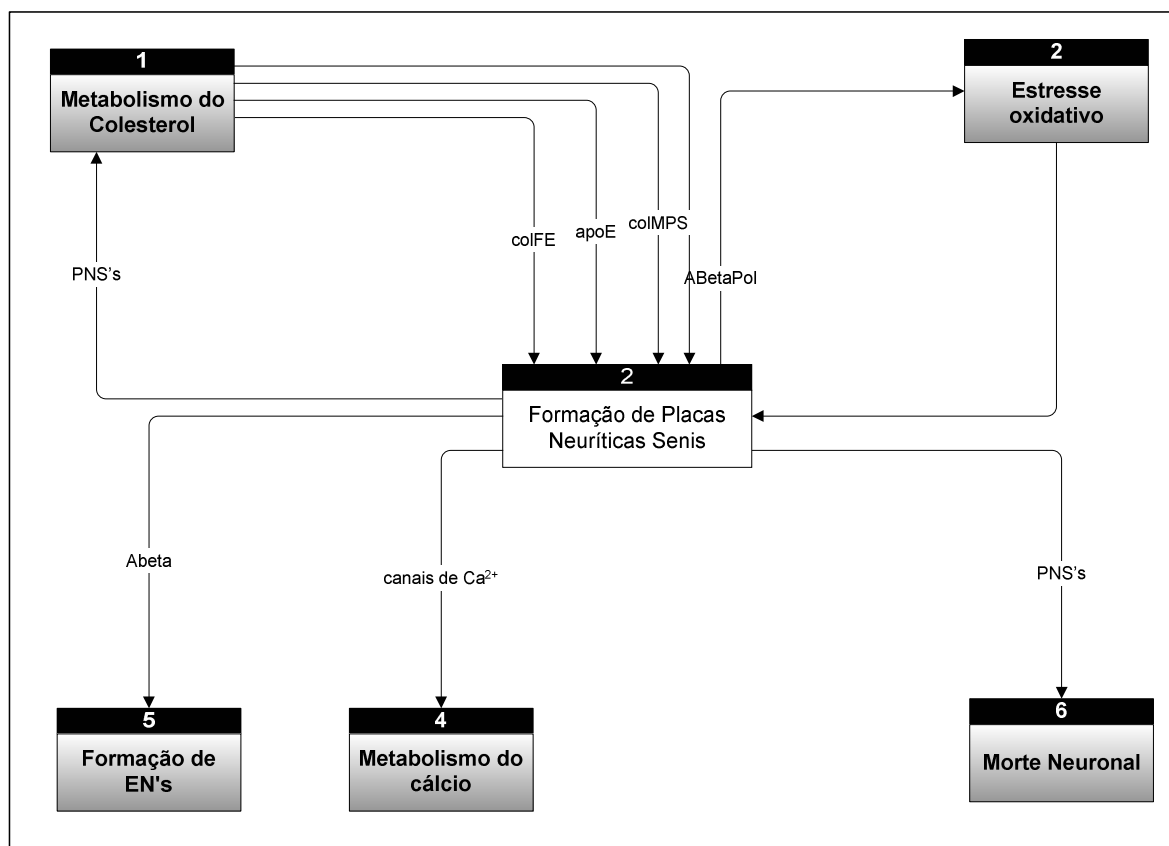


Figura III.12: Formação de Placas Neuríticas Senis.

Ao detalharmos o processo de formação das PNS's, foi possível identificar os seguintes sub-processos:

- Processamento do PPA.
- Exportação do A β .
- Degradação do A β .
- Agregação e Fibrilação do A β .
- Formação de PNS's.

Assim, a inclusão desses processos no diagrama da *figura III.12* levou ao diagrama da *figura III.13*.

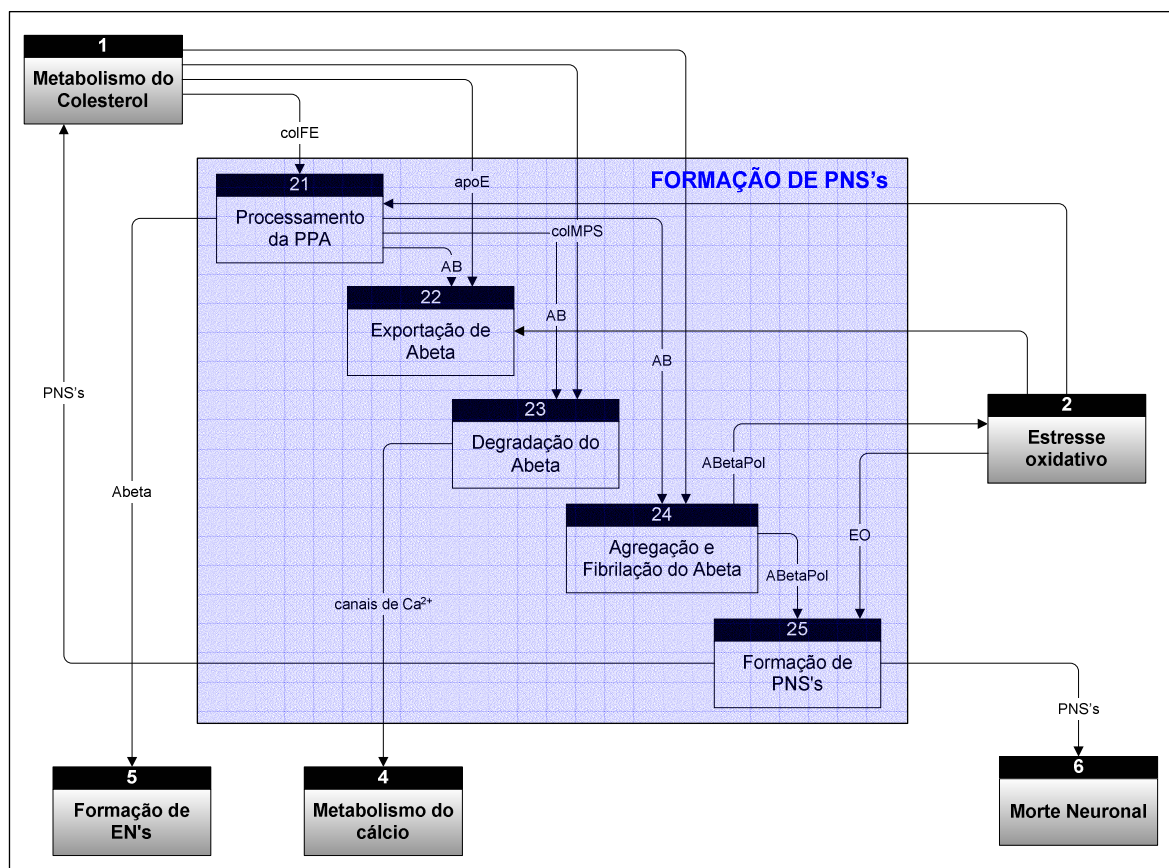


Figura III.13: Explosão do processo de Formação de Placas Neuríticas Senis.

III.5.1 - Processo: Processamento do PPA

São nas membranas do retículo endoplasmático, do complexo de Golgi, dos endossomas e na própria membrana plasmática que as secretases da PPA aparentemente interagem com o colesterol. Como a rigidez e a fluidez das membranas são afetadas com a alteração da taxa do colesterol, o movimento lateral da PPA e das secretases também pode ser alterado. Todos os pontos de clivagem da PPA se localizam na região transversal da FE (figura II.14⁴³), sendo então possível que uma alteração nos níveis do colesterol da membrana afete o contato e a atividade entre a PPA e suas secretases (REFOLO, 2000).

⁴³ Ver Capítulo II, sessão II.5.4, página 35.

Sabe-se que a redução do teor de colesterol da MPS inibe tanto a β -secretase quanto a γ -secretase. Em contraste, a atividade da α -secretase é aumentada quando o colesterol é reduzido (HARTMANN, 2001). No caso inverso, quando há diminuição da quantidade de α -secretases e aumento da quantidade de β e γ -secretases, há aumento na produção de $A\beta^{44}$ (GOLDE, 2001, HOWLAND, 1998, FREARS, 1999).

Apenas uma fração da PPA do plasma é internalizada na célula (ARISPE, 2001). A fim de simplificar o modelo, iremos supor que exista uma quantidade infinita de PPA e que a mesma será invariante. Sendo assim, podemos considerar que a taxa de produção do $A\beta$ dependerá apenas do colesterol na membrana (colMPS) e será diretamente proporcional a ele. Assim:

$$\frac{d[A\beta_{prod}]}{dt} = a_{21} \cdot [colMPS] \quad (54)$$

Uma estrutura importante, formada por um subconjunto da FE, é o microdomínio caveolar (MC). Essas estruturas estão relacionadas ao transporte e sinalização celular e ocorrem na maioria das células dos mamíferos, incluindo neurônios e microglia (WOOD, 2002). Os MC's são caracterizados por uma composição lipídica que inclui um alto teor de colesterol, caveolina, esfingomiélna e proteínas sinalizadoras, algumas importantes para a patologia da DA, como a PS1, as α e β -secretases e outras que modulam a clivagem da β -secretase na PPA. Logo, o colesterol presente nos MC's deve ser vital para os processos bioquímicos envolvidos na produção e acúmulo do $A\beta$, na transdução de sinais e nas funções de tráfego vesicular nesses microdomínios (REFOLO, 2000).

Se alterações nas concentrações periféricas do colesterol afetam minimamente o teor de colesterol no cérebro como um todo, ainda não se sabe como essas mudanças podem afetar os domínios lipídicos intramembranosos. Mais uma vez, ainda é preciso definir quando essas alterações se tornam patológicas (BURNS, 2002).

⁴⁴ Ver Capítulo II, seção II.5.4, página 35.

Então, como as α e β -secretases se localizam nos MC's, que ficam na FE, podemos reescrever a equação anterior para:

$$\frac{d[A\beta prod]}{dt} = a_{21} \cdot [colFE] \quad (55)$$

Sabemos que, na DA, o cérebro está sujeito a uma grande carga de estresse oxidativo, em toda a sua extensão. Uma possibilidade para o aumento desse estresse seria a de que o colesterol celular causasse a oxidação dos componentes da membrana. Em contrapartida, a ação dos radicais livres diminuiria o acesso das secretases à PPA. Lipídios danificados por oxidação (EO), por sua vez, também podem aumentar a produção de fragmentos A β (PAPPOLLA, 2002, KAKIO, 2002). Agregando essas informações à equação (55), teremos:

$$\frac{d[A\beta prod]}{dt} = a_{21} \cdot [colFE] + b_{21} \cdot [EO] \quad (56)$$

Essa equação pode ser representada pelo diagrama da *figura III.14*, a seguir:

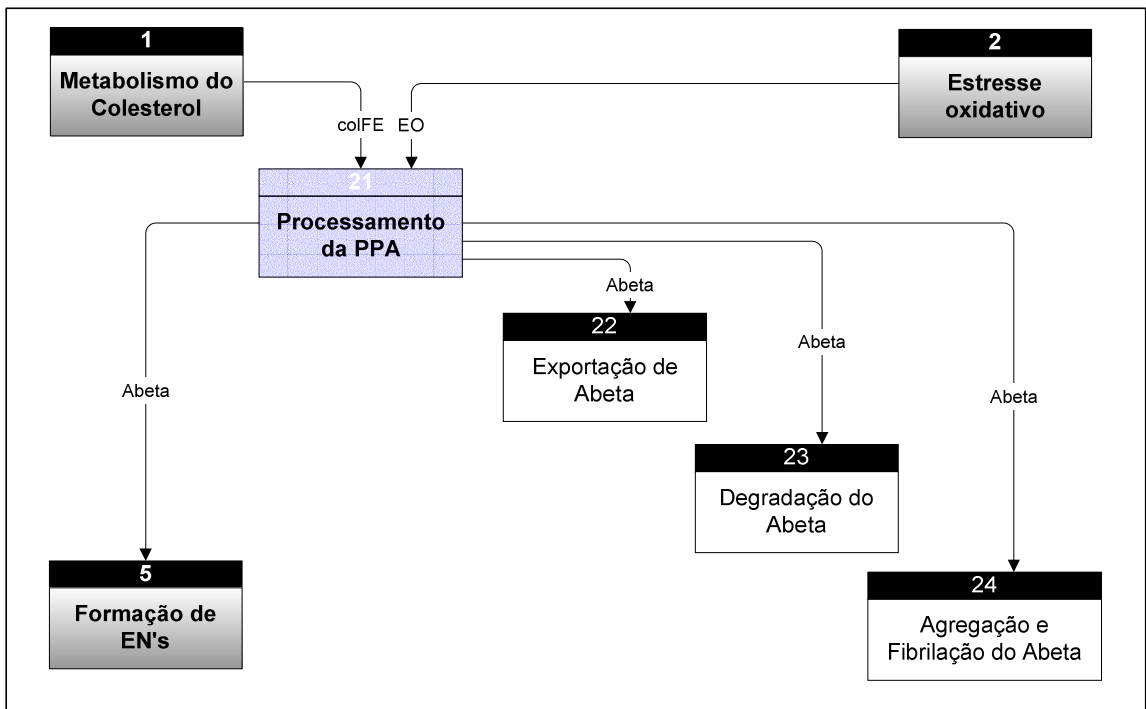


Figura III.14: Processamento da PPA.

III.5.2 - Processo: Exportação do $A\beta$

A apoE atua na remoção do $A\beta$ circulante, que é seqüestrado pelos capilares cerebrais e transportado, para fora do cérebro, através da BHE (MARTEL, 1997). Matematicamente, o $A\beta$ exportado ($A\beta_{out}$) é calculado por:

$$\frac{d[A\beta_{out}]}{dt} = a_{22}[A\beta] \cdot [apoE2] + b_{22}[A\beta] \cdot [apoE3] + c_{22} \cdot [A\beta] \cdot [apoE4] \quad (57)$$

Esse transporte também pode ocorrer com o $A\beta$ na forma livre, sem se ligar ao apoE. Não se sabe ao certo quanto do $A\beta$ será transportado em cada caso (MARTEL, 1997, BURNS, 2002) mas, sabidamente, o transporte do $A\beta$ realizado pela proteína apoE faz com que ele atravesse a BHE muito mais rápido do que sozinho (BANKS, 1997). Logo, precisamos acrescentar um último termo à equação (57) que represente a saída do $A\beta$ na forma livre:

$$\frac{d[A\beta_{out}]}{dt} = a_{22} \cdot [A\beta] \cdot [apoE2] + b_{22} \cdot [A\beta] \cdot [apoE3] + c_{22} \cdot [A\beta] \cdot [apoE4] + d_{22} [A\beta] \quad (58)$$

Como o apoE saiu do cérebro junto com o A β , novamente iremos atualizar o seu total disponível, alterando as equações (47) a (49), que se tornam:

$$\frac{d[apoE2]}{dt} = a_{13} \cdot [colSNC] \cdot [\epsilon 2] - b_{14} \cdot [colMPS] \cdot [apoE2] - a_{22} \cdot [A\beta] \cdot [apoE2] - d_{13} \cdot [EO] \quad (59)$$

$$\frac{d[apoE3]}{dt} = b_{13} \cdot [colSNC] \cdot [\epsilon 3] - c_{14} \cdot [colMPS] \cdot [apoE3] - b_{22} \cdot [A\beta] \cdot [apoE3] - d_{13} \cdot [EO] \quad (60)$$

$$\frac{d[apoE4]}{dt} = c_{13} \cdot [colSNC] \cdot [\epsilon 4] - d_{14} \cdot [colMPS] \cdot [apoE4] - c_{22} \cdot [A\beta] \cdot [apoE4] - d_{13} \cdot [EO] \quad (61)$$

Sabe-se que a apoE4 possui menor afinidade pelo colesterol e menor velocidade no seu efluxo do que a apoE3 (TRIEU, 2000). Ela também é menos eficiente na distribuição do colesterol do que o apoE2 (FREAS, 1999). Logo, apesar dos valores das constantes de taxa de reação das equações (59) a (61) serem definidos empiricamente, as seguintes relações devem ser obedecidas:

$$a_{13} > b_{13} > c_{13} \quad , \quad b_{14} > c_{14} > d_{14} \quad \text{e} \quad a_{22} > b_{22} > c_{22}$$

Podemos constatar a presença de A β nas paredes das principais veias cerebrais de indivíduos de cerca de 20 anos. Essa observação, em uma idade tão prematura, sugere que o A β seja drenado, durante toda a vida, ao longo das vias perivasculares. Com a ocorrência de oclusão das artérias corticais em idades mais avançadas, a distribuição do A β no parênquima cortical e nas paredes das veias é afetada, ocorrendo acúmulo do A β nas paredes dos capilares. Assim, a oclusão arterial causaria uma falha na eliminação do A β do cérebro idoso, o que pode ser um fator importante da patogênese da DA (WELLER, 2002).

A idade altera as artérias cerebrais levando à perda de elasticidade, reduzindo a força das pulsações arteriais e diminuindo a drenagem do A β . As pulsações cessam quando as artérias são completamente obstruídas, alterando os padrões de eliminação do A β e do fluxo do fluido intersticial. Logo, pode existir aí uma ligação entre as doenças cardiovasculares e a distribuição do A β no cérebro (WELLER, 2002). Mais uma vez, trocaremos a variável idade pelo nível da oxidação no cérebro (EO) e incluir esse termo na equação (58):

$$\frac{d[A\beta_{out}]}{dt} = a_{22} \cdot [A\beta] \cdot [apoE2] + b_{22} \cdot [A\beta] \cdot [apoE3] + c_{22} \cdot [A\beta] \cdot [apoE4] + d_{22}[A\beta] - e_{22} \cdot [EO] \quad (62)$$

A equação (62) pode ser representada pelo diagrama da *figura III.15*:

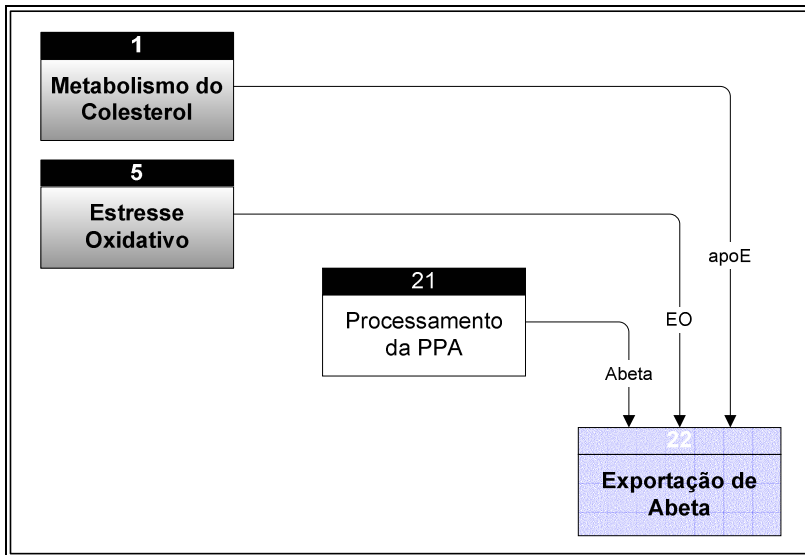


Figura III.15: Exportação do A β .

III.5.3 - Processo: Degradação do A β

Os monômeros do A β podem ser degradados pelos neurônios primários, pelos astrócitos e pela microglia. (WOOD, 2002). A incorporação de A β nas MPS's de células é inversamente proporcional ao conteúdo de colesterol das membranas. Logo, alterações na composição lipídica das membranas neuronais teriam conseqüências nas interações do A β com as células. A redução do conteúdo de colesterol, por exemplo, facilitaria a internalização e degradação do A β (A β degrad). Por outro lado, quando o teor de colesterol das MPS's for muito grande, o A β será totalmente impedido de ser internalizado para degradação, aumentando as chances de agregação (WOOD, 2002).

Em termos matemáticos, teremos:

$$\frac{d[A\beta\text{degrad}]}{dt} = a_{23} \cdot \frac{[A\beta]}{[colFE]} \quad (63)$$

Muitos defendem a hipótese de que o A β , polimerizado em oligômeros, forme canais iônicos nas membranas e que o colesterol module essa inserção e a conseqüente formação de canais iônicos tóxicos. Após a extração de colesterol da membrana plasmática, ocorre um suave aumento da carga negativa da membrana, facilitando a interação desta com o A β polimerizado, que se abre formando canais, favorecendo o influxo de íons de cálcio (*Figura III.16*) (ARISPE, 2002).

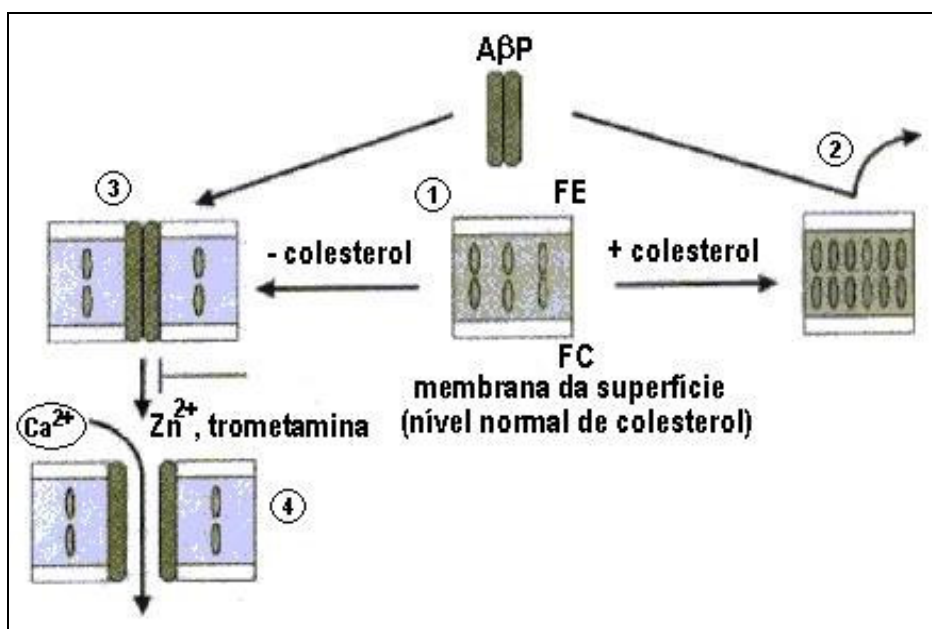


Figura III.16: Interação do A β com a membrana plasmática (ARISPE, 2002)

Por um lado, a inserção do A β polimerizado na membrana impede a agregação do mesmo no meio extracelular. Por outro, ela pode causar danos maiores, como: a destruição da estrutura da membrana, o aumento da produção de radicais livres, que ocorre com o aumento do influxo de cálcio, e a alteração de propriedades físico-químicas da membrana, como fluidez e dinâmica lipídica, além de afetar a atividade de várias proteínas que se ligam à mesma (JI, 2002). De fato, alguns resultados de experiências *in vitro* mostram que células enriquecidas de colesterol exógeno se tornam mais resistentes à ação tóxica do A β , enquanto a redução do colesterol traz efeito inverso (YAGAMI, 2002).

Desta forma, em certo ponto, o aumento do colesterol da membrana, ao prejudicar a internalização dos polímeros de A β para degradação, protegeria as células da formação excessiva de canais de cálcio (ARISPE, 2002).

Para representar o comportamento descrito pela hipótese (2) do trabalho⁴⁵, a taxa de formação de canais deverá aumentar proporcionalmente ao aumento do teor de colesterol

⁴⁵ Ver sessão VII.2, página 69.

da membrana, existindo porém um limite superior de saturação. Logo, podemos dizer que a taxa de formação dos canais de cálcio obedece à seguinte função sigmóide:

$$\frac{d[\text{canais de Ca}^{2+}]}{dt} = b_{23} \cdot \frac{1}{1 + e^{-c_{23} \cdot ([\text{colMPS}] - [\text{A}\beta_{\text{pol}}]) - d_{23}}} \quad (64)$$

Onde: b_{23} = amplitude da curva

c_{23} = inclinação da curva

d_{23} = ponto de inflexão da curva

O processo de degradação do A β pode ser representado pelo diagrama da *figura III.17*, abaixo:

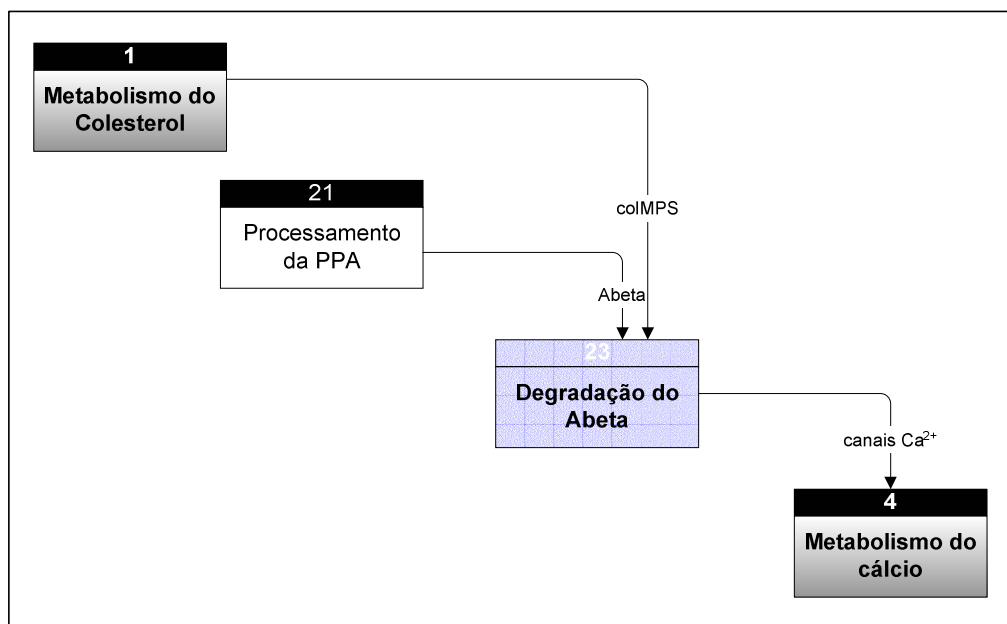


Figura III.17: Degradação do A β .

III.5.4 - Processo: Agregação e Fibrilação do A β

O A β tende a se ligar à membrana neuronal. Quando a MPS apresenta uma baixa densidade lipídica, o A β irá formar estruturas de α -hélices, que não são neurotóxicas, ao se ligar à membrana. Quando o teor de colesterol da MPS's aumenta, a diminuição da degradação do A β fará seus níveis subirem. Além disso, com o aumento do teor de colesterol na MPS, o A β passa por uma transição de conformação para estruturas β -folha. Esse processo de transformação serve ainda como uma semente para a formação fibrilar amilóide tóxica (Figura III.18) (KAKIO, 2002, JI, 2002).

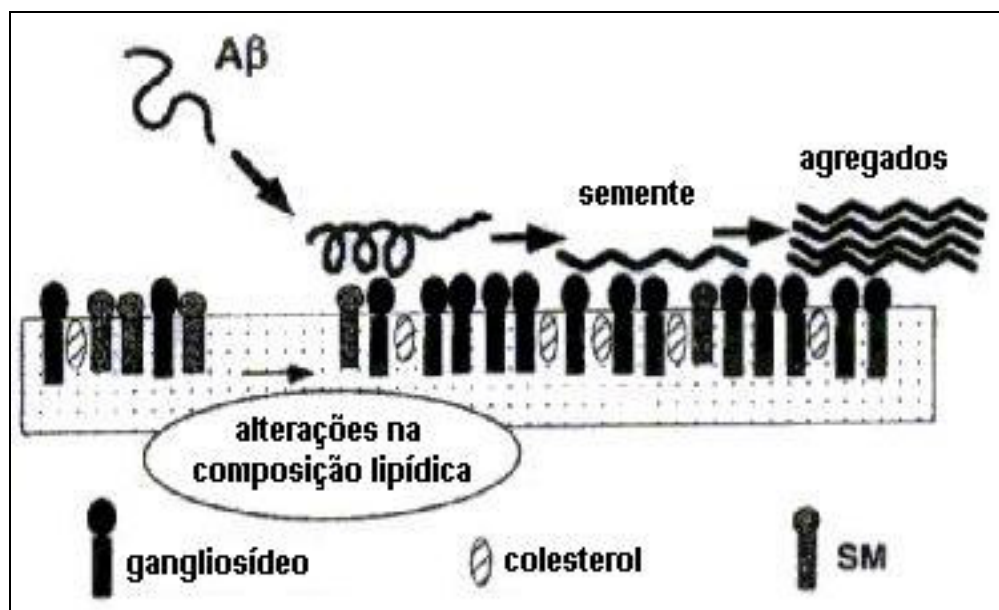


Figura III.18: Modelo da formação fibrilar amilóide mediada por gangliosídeos. (KAKIO, 2002)

A conversão do A β solúvel e não-tóxico para a forma tóxica do A β , rica em estruturas de β -folhas, é considerado o passo inicial do desenvolvimento da DA. Assim, o A β com conformação alterada aceleraria a agregação do A β solúvel, funcionando como uma semente, de forma dependente do colesterol (KAKIO, 2002).

Uma hipótese corrente sugere que o A β inicie o processo de agregação pela ligação com uma molécula de glicoproteína, o gangliosídeo GM1. O complexo GM1-A β pode ser

observado tanto em pacientes de DA quanto em pacientes da síndrome de Down. Experiências *in vitro* mostraram que o GM1-A β acelerou a taxa de formação de fibras amilóides, que tendem a ser relativamente resistentes à degradação. Dentro dos *rafts* lipídicos, apenas o GM1 funciona como ponto de conexão para o A β , sendo interessante observar que o A β não reconhece o GM1 individual, mas apenas *clusters* deste, cuja formação é facilitada pelo colesterol. Sob condições patológicas, alterações na composição lipídica local, como o aumento no colesterol, induzem à formação desses *clusters* (YANAGISAWA, 2002b, KAKIO, 2002, EDELSTEIN-KESHET, 2002).

Já a redução de colesterol e de GM1 das membranas reduzem acentuadamente a sensibilidade de células cultivadas ao A β . Portanto, mudanças na distribuição do colesterol nas MPS's também podem contribuir para a polimerização do A β (WOOD, 2002). Em resumo, podemos dizer que o A β irá se polimerizar (A β pol) a uma taxa diretamente proporcional ao teor de colesterol da membrana (colMPS) e ao saldo de A β no SNC (*figura III.19*). Então:

$$\frac{d[A\beta_{pol}]}{dt} = a_{24} \cdot [colMPS] \cdot [A\beta] \quad (65)$$

Finalmente, podemos então calcular o saldo de A β no cérebro, a cada instante, através da fórmula:

$$[A\beta] = [A\beta_{prod}] - [A\beta_{out}] - [A\beta_{degrad}] - [A\beta_{pol}] \quad (66)$$

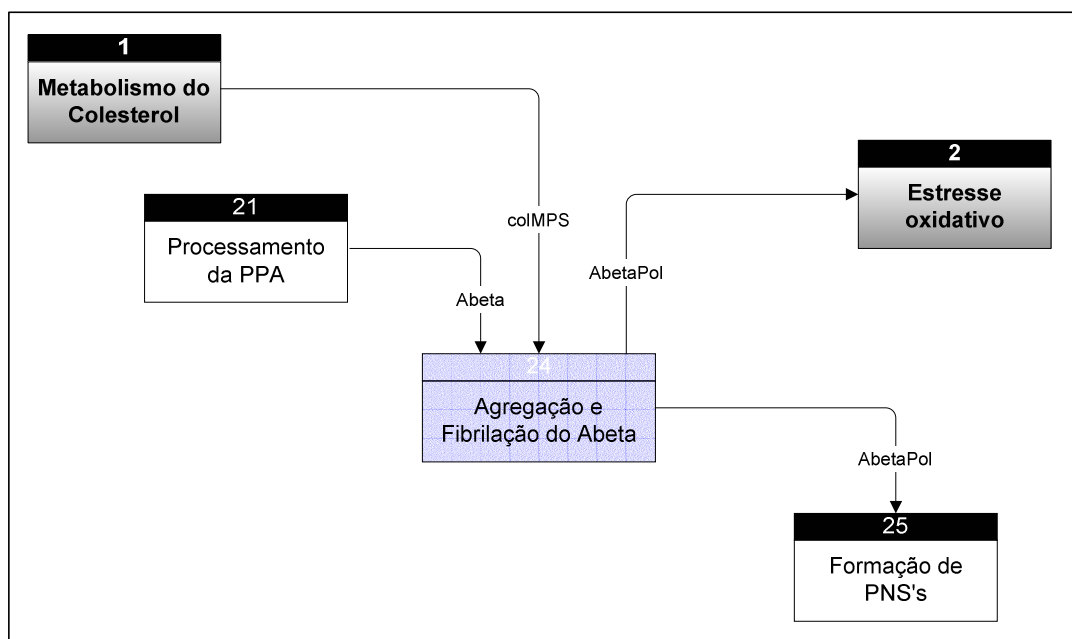


Figura III.19: Agregação e Fibrilação do A β .

III.5.5 - Processo: Formação de PNS's

Os depósitos amilóides são formados por um acúmulo extracelular da proteína A β em seu estado polimerizado (GOLDE, 2001). Além disso, muitos efeitos neurotóxicos do A β são mediados pelos radicais livres. Um indício da existência de uma relação entre o A β e o estresse oxidativo é a localização histológica dos marcadores de oxidação em torno dos depósitos amilóides. Observa-se uma acentuação desses marcadores nessa vizinhança e de forma anormal nos neurônios vulneráveis ao DA. Os depósitos de A β , por sua vez, também iniciam uma reação na microglia e nos astrócitos, gerando uma cascata de fatores que amplificam o dano e a oxidação (*figura III.20*) (PAPPOLLA, 2002).

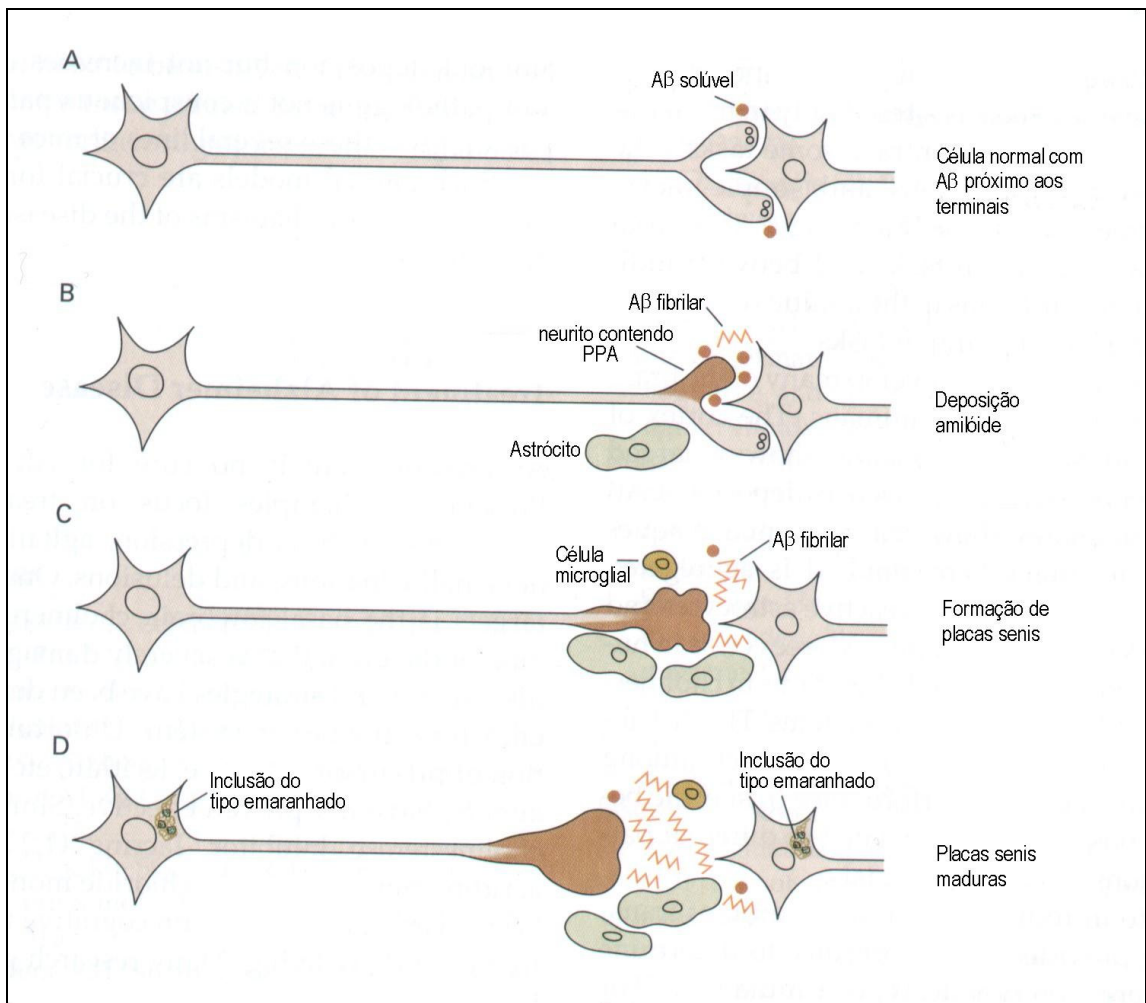


Figura III.20: Evolução das lesões características da DA (KANDEL, 2000).

Logo, podemos considerar que a taxa de formação das PNS's depende da quantidade de Aβ fibrilar ($A\beta_{pol}$) e do nível de inflamação na região (EO). Então:

$$\frac{d[PNS]}{dt} = a_{25} \cdot [A\beta_{pol}] \cdot [EO] \quad (67)$$

A equação (67) pode ser representada pelo diagrama da *figura III.21*.

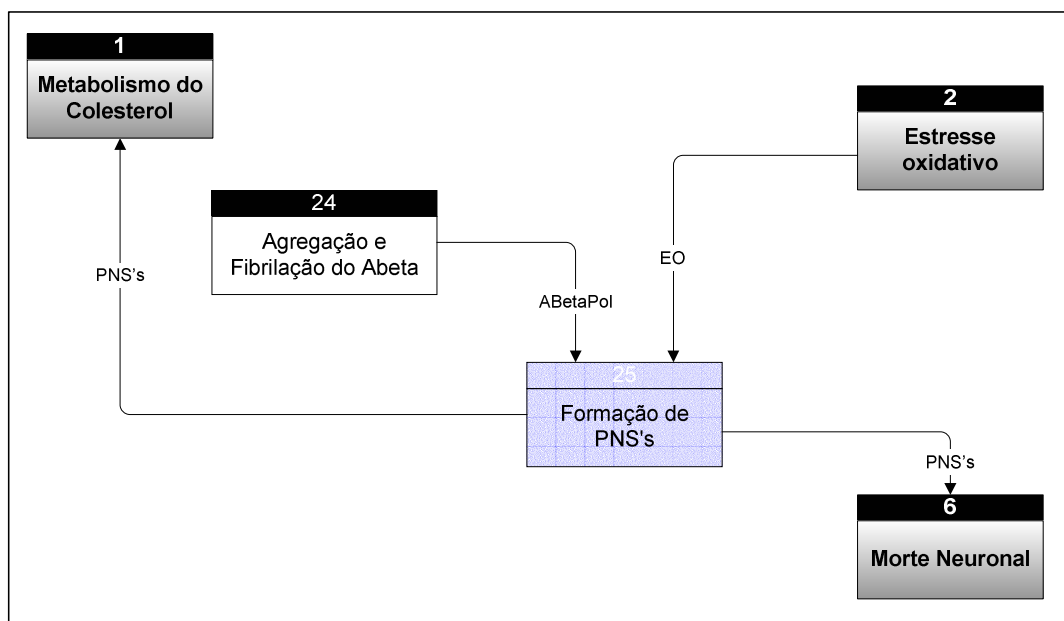


Figura III.21: Formação de PNS's.

III.6 - FORMAÇÃO DE EMARANHADOS NEUROFIBRILARES

Outro processo importante para o desenvolvimento da DA é o processo de formação de EN's. Isolando esse processo, chegaremos ao diagrama da *figura III.22*.

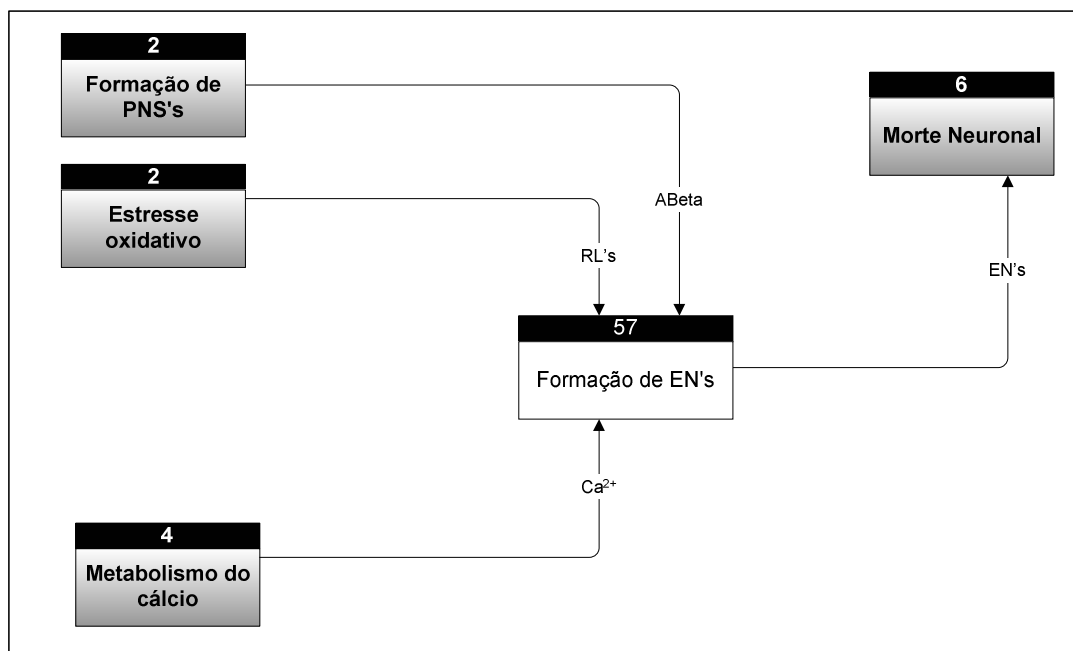


Figura III.22: Formação de Emaranhados Neurofibrilares.

O detalhamento desse processo identificou a existência de sete sub-processos principais.

São eles:

- Caspase-Clivagem da Tau.
- Divisão e Proliferação Celular.
- Formação de Filamentos.
- Fosforização da Tau.
- Desconexão dos Microtúbulos.
- Formação de EN's.

Esses processos e suas conexões aos demais podem ser representados pelo diagrama a seguir (*figura III.23*):

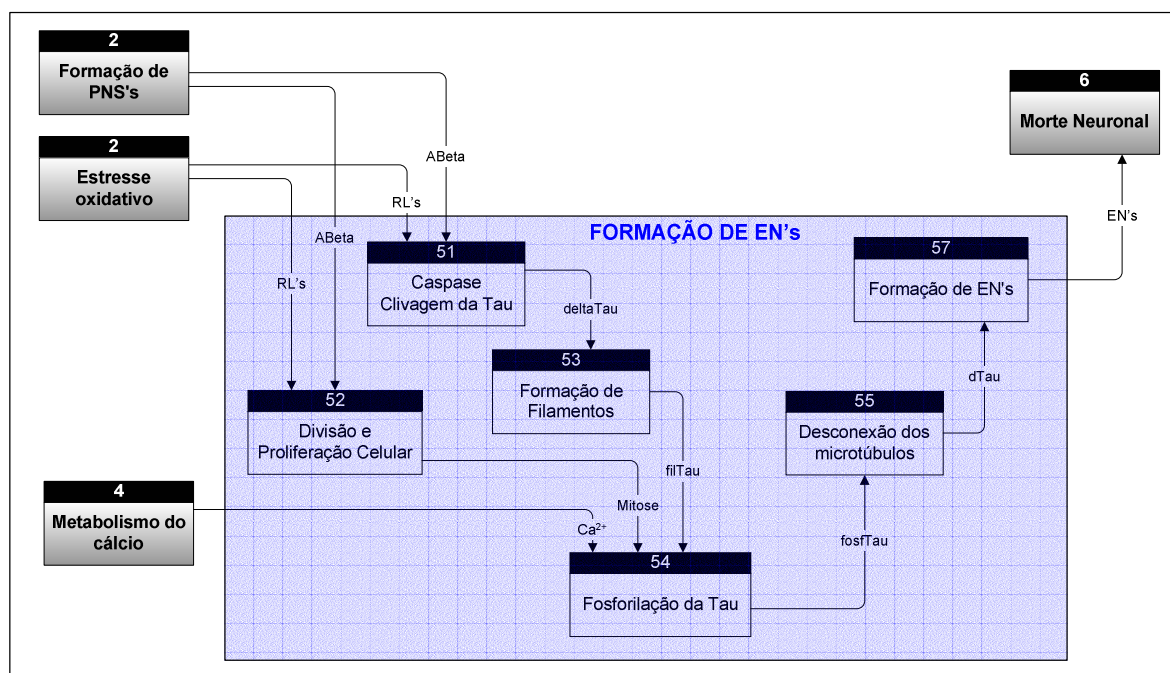


Figura III.23: Formação de Emaranhados Neurofibrilares.

III.6.1 - Processo: Caspase-Clivagem da Tau

Alguns componentes do citoesqueleto, incluindo a Tau, são marcados por caspases após a ocorrência de um estímulo apoptótico. As caspases são proteases que, segundo evidências cada vez mais fortes, participam do processo de clivagem da Tau, produzindo fragmentos da proteína Tau. *In vitro*, a caspase-clivagem da Tau leva à retração do neurito, contribuindo para os déficits sinápticos e morte celular (RISSMAN, 2004).

Os fragmentos de Tau (Δ Tau) são encontrados junto aos depósitos de $A\beta$ solúvel, sugerindo que o acúmulo de $A\beta$ intra e extracelular induzam a caspase-clivagem da Tau. Essa hipótese foi confirmada por algumas experiências *in vitro* (RISSMAN, 2004, GAMBLIN, 2003).

Existe ainda a indicação de que, além do $A\beta$, o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial, resultante deste último, sejam capazes de ativar as caspases, iniciando a patologia dos EN's (RISSMAN, 2004). Logo, podemos dizer que:

$$\frac{d[\Delta Tau]}{dt} = a_{s1} \cdot [A\beta] \cdot [Tau] + b_{s1} \cdot [EO] \cdot [Tau] \quad (68)$$

A equação acima pode ser representada pelo diagrama da *figura III.24*.

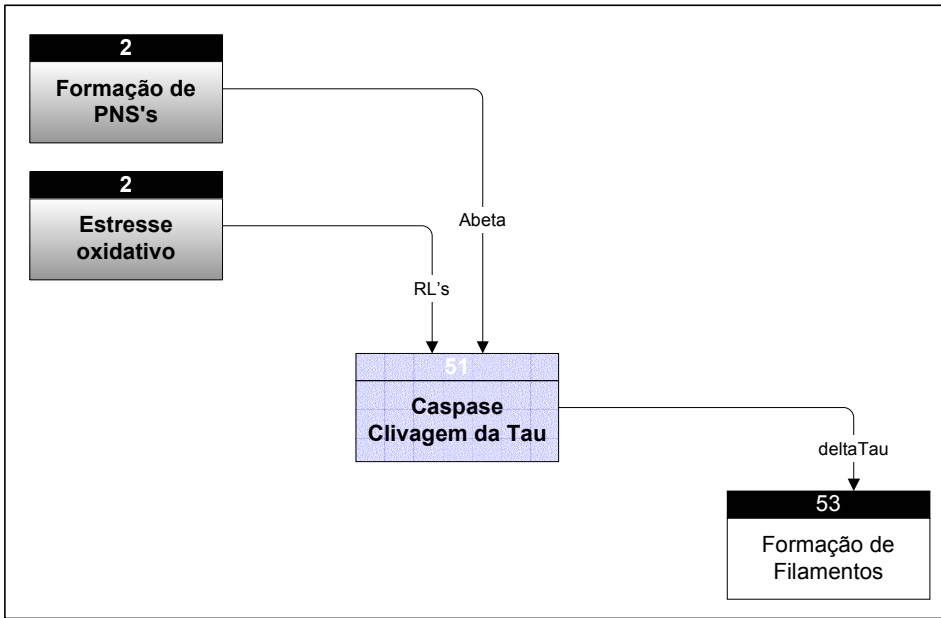


Figura III.24: Caspase-clivagem da Tau.

III.6.2 - Processo: Divisão e Proliferação Celular

Atualmente, alguns pesquisadores afirmam que neurônios afetados por algum insulto como, por exemplo, a toxicidade do $A\beta$ e o estresse oxidativo, tentem reentrar na fase de proliferação. Existe, porém, um forte vínculo entre a indução da mitose em neurônios maduros e a morte celular. O acionamento do programa do ciclo de vida da célula, quando ocorre em células maduras, pode levar a célula à apoptose, o que explicaria a perda maciça de neurônios na DA (ILLENBERGER, 1998, NEVE, 2000). Formalmente (*figura III.25*):

$$\frac{d[Mit]}{dt} = a_{52} \cdot [A\beta] + b_{52} \cdot [EO] \quad (69)$$

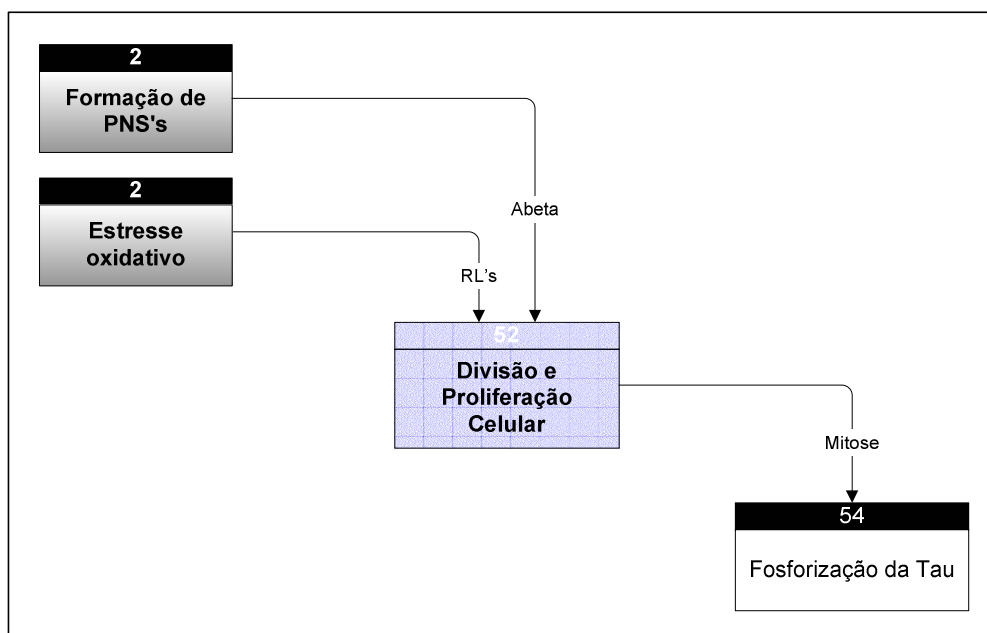


Figura III.25: Divisão e Proliferação Celular.

III.6.3 - Processo: Formação de Filamentos

Após a caspagem-clivagem, ocorre uma alteração na conformação da Tau fragmentada (ΔTau)⁴⁶, que cataliza a sua transformação para a forma filamentosa nos microtúbulos. Além disso, os fragmentos da Tau não só aumentam a formação dos filamentos ($f\text{Tau}$), mas também agem como semente para a formação de filamentos diretamente da Tau integral (RISSMAN, 2004). Assim:

$$\frac{d[f\text{Tau}]}{dt} = a_{53} \cdot [\Delta\text{Tau}] + b_{53} \cdot [\text{Tau}] \cdot [\Delta\text{Tau}] \quad (70)$$

Graficamente, podemos representar a equação (70) pelo diagrama da *figura III.26*.

⁴⁶ A Tau adota uma conformação MC1-imunoreativa.

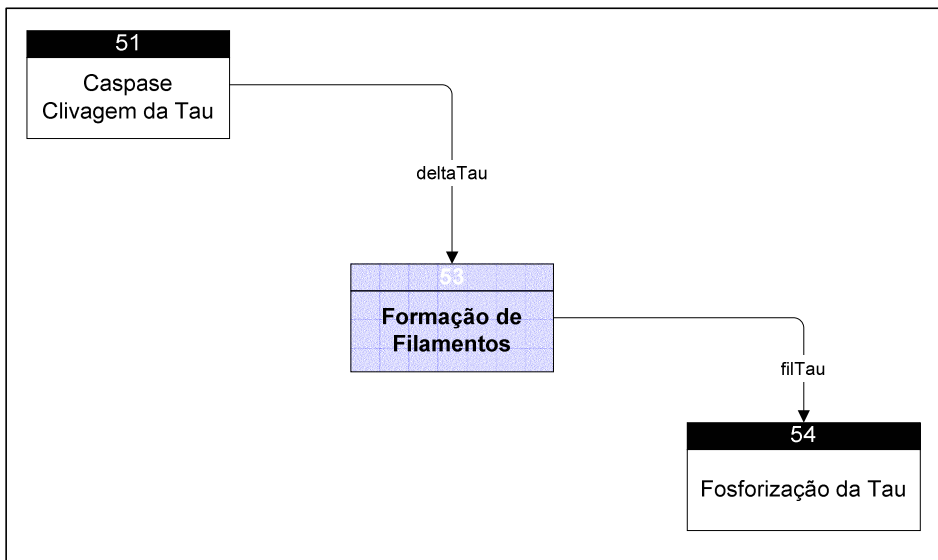


Figura III.26: Formação de Filamentos.

III.6.4 - Processo: Fosforização da Tau

Algumas quinases, envolvidas na fosforização da Tau, são reguladas pelos níveis de cálcio intracelular. Elas atuam quando o teor de cálcio aumenta no meio intracelular, podendo ocorrer então a hiperfosforilação da Tau (MURRAY, 1993).

Também durante a mitose, a Tau se torna extremamente fosforizada (PTau), com um aumento de até 700% no seu teor de fósforo. Esse fenômeno possui correlação com a desconexão da Tau dos microtúbulos e a reorganização da rede dos mesmos (ILLENBERGER, 1998).

Atuando como um mecanismo compensatório de proteção, a fosforização da Tau (PTau) ocorre para dissociá-la dos microtúbulos, quando esta se encontra na sua forma filamentosa (RISSMAN, 2004).

Agregando esses dados, teremos (*figura III.27*):

$$\frac{d[PTau]}{dt} = a_{54} \cdot [fTau] + b_{54} \cdot [Tau] \cdot [Mit] + c_{54} \cdot [Tau] \cdot [canais\ de\ Ca^{2+}] \quad (71)$$

Onde:

$$a_{54} > b_{54}, \text{ e } a_{54} > c_{54}$$

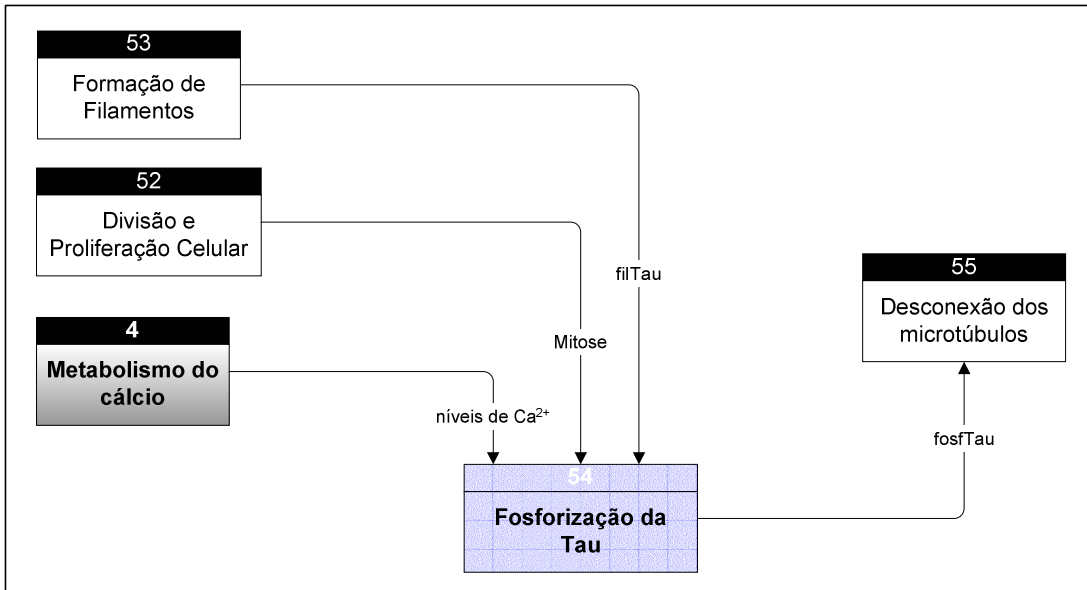


Figura III.27: Fosforização da Tau.

III.6.5 - Processo: Desconexão dos Microtúbulos

A desconexão da Tau, em estado filamentosos e hiperfosforizado, acaba causando uma desestabilização na estrutura do neurônio, afetando a sua integridade. Logo, apesar da desconexão dos filamentos de Tau dos microtúbulos ter uma motivação inicial neuroprotetora, ela acaba levando à morte neuronal (RISSMAN, 2004). Logo, para a Tau desconectada (*descTau*), temos (*figura III.28*):

$$\frac{d[descTau]}{dt} = a_{55} \cdot [PTau] \quad (72)$$

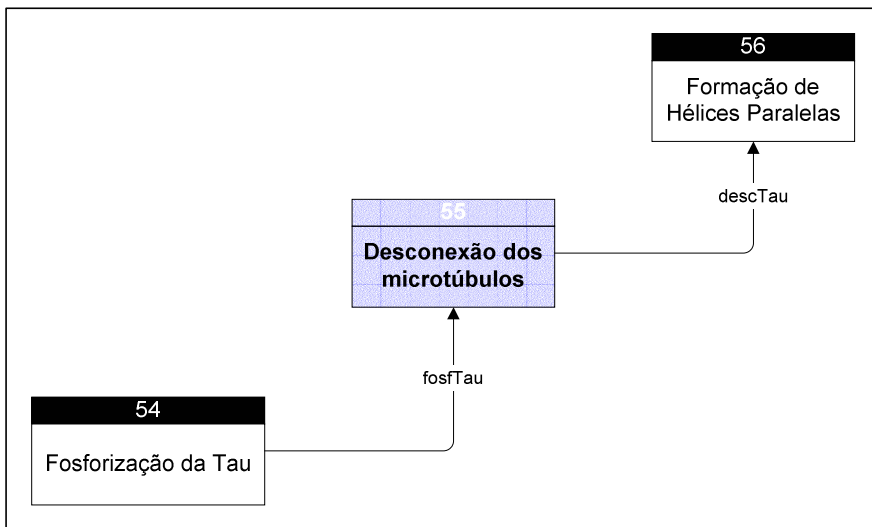


Figura III.28: Desconexão dos Microtúbulos.

III.6.6 - Processo: Formação de EN's

Na DA, verifica-se que a maior parte da Tau se encontra desconectada dos microtúbulos. Esse estado da Tau favorece a sua agregação em filamentos helicoidais pareados, que são o componente principal dos EN's (ILLENBERGER, 1998). Uma ocorrência característica desses filamentos é a presença da proteína Tau, desconectada, em estado hiperfosforizado (FORLENZA, 1998, MURRAY, 1993). Assim (*figura III.29*):

$$\frac{d[EN]}{dt} = a_{57} \cdot [descTau] \quad (73)$$

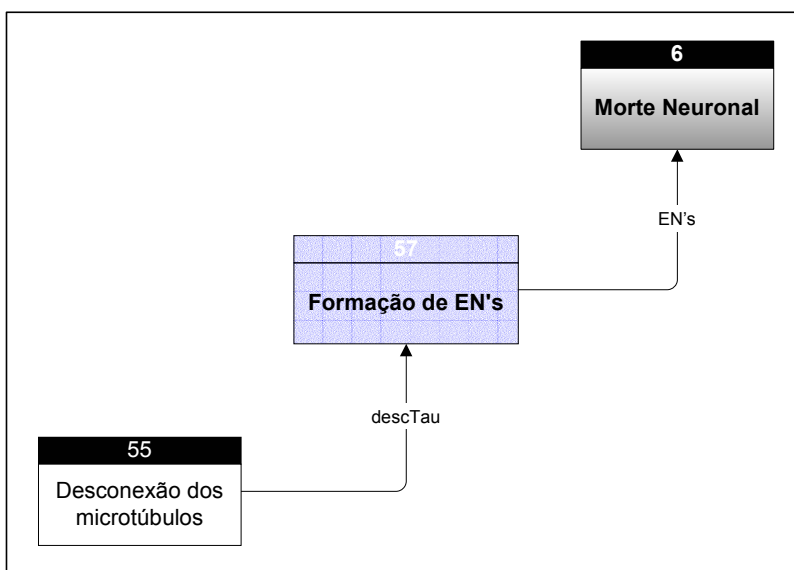


Figura III.29: Formação de EN's.

Podemos ainda resumir todo o processo de formação de EN's através da *figura III.30*, a seguir.

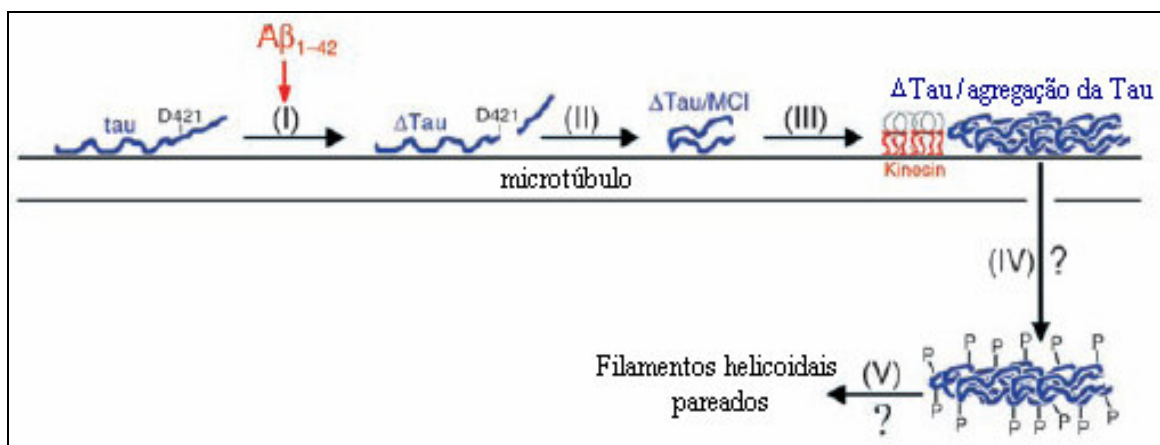


Figura III.30: Processo de formação de EN's. (I) O $A\beta$ estimula a ação da caspase-clivagem da Tau. (II) Após a caspase-clivagem, a Tau adota a conformação MCI. (III) A alteração da conformação aumenta a formação filamentosa e a agregação da Tau. (IV) A Tau é hiperfosforizada e dissociada do microtúbulo. (V) Ocorre a formação do EN (adaptado de RISSMAN, 1993).

III.6.7 - Processo: Morte Neuronal

Todos os fatores que levam à morte neuronal na DA (MorteN), e que foram considerados nesta pesquisa, podem ser resumidos pela equação abaixo (*figura III.31*):

$$\frac{d[MorteN]}{dt} = a_{61} \cdot [EN] + b_{61} \cdot [PNS] + c_{61} \cdot [Ca^{2+}] + d_{61} \cdot [Mit] + e_{61} \cdot [C24s] \quad (74)$$

Uma simplificação feita no modelo foi considerar que o nível de morte neuronal irá caracterizar a DA, pois o mesmo está relacionado à atrofia cerebral que ocorre na doença.

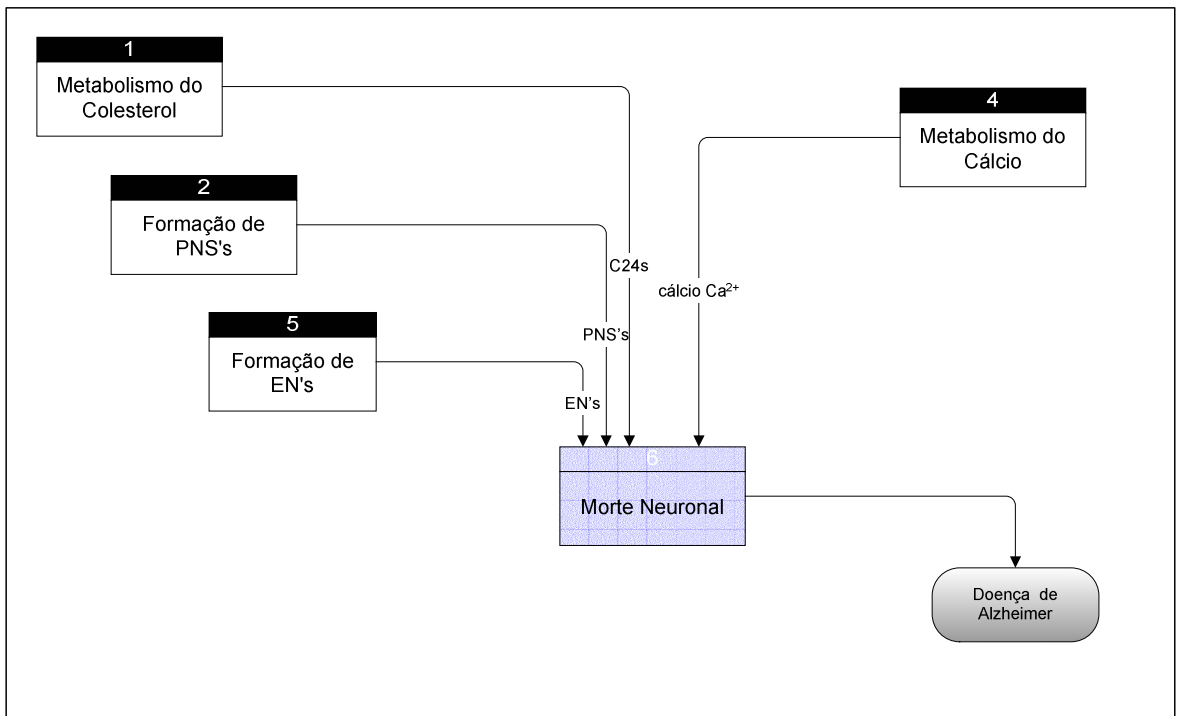


Figura III.31: Morte Neuronal.

IV. RESULTADOS ENCONTRADOS

Os experimentos realizados podem ser divididos em dois grupos. Experimentos do primeiro grupo tiveram a finalidade de validar o modelo construído. Os experimentos de validação ajudaram também a elucidar a comunicação entre diversos processos da DA. No segundo grupo encontram-se as simulações que visavam testar algumas hipóteses sobre a doença, coletadas na literatura consultada. Nesses últimos, foram inseridas algumas perturbações no sistema, ou partes dele eram inibidas. Os resultados obtidos em cada simulação e as conclusões que puderam ser aferidas serão relatados após a descrição de cada teste.

Em sintonia com o foco do trabalho, que é o estudo do papel do colesterol no desenvolvimento da DA, grande parte dos testes realizados comparou o comportamento do sistema quando se simulava uma dieta de teor de colesterol basal com uma dieta de hipercolesterolemia. Neste trabalho, uma dieta basal corresponde a um consumo diário de 300mg de colesterol, enquanto a dieta de hipercolesterolemia corresponde a um consumo diário de 600mg de colesterol, ou seja, o dobro do teor da dieta ideal.

Optamos ainda por estudar apenas a expressão de um alelo da apoE a cada simulação, não havendo então casos de expressão mista dos alelos. Todavia, o modelo construído suporta esse tipo de simulação, sem que nenhuma alteração adicional necessite ser feita.

IV.1 - EXPERIMENTOS DE VALIDAÇÃO

IV.1.1 - O funcionamento da BHE

Segundo a tabela de ingestão diária recomendada (IDR) (US, 2005), o consumo ideal de colesterol, para adultos e crianças maiores de quatro anos, é de 300mg diários.

Em uma experiência, conduzida por REFOLO, 2000, ratos transgênicos⁴⁷ foram alimentados com 1000% de colesterol a mais do que o de sua dieta ideal. Após sete

⁴⁷ Contendo expressão de genes mutantes humanos da PPA e da PS1.

semanas, observou-se um aumento de mais de 100% no colesterol total, o que levou também a um aumento de cerca de 13% no colesterol do SNC⁴⁸.

Os dados encontrados por esse experimento (*tabela IV.1*) indicam que na dieta basal, quando o colesterol total era de 171,1 pmol/g, 8,6% dele, ou 14,76 pmol/g, alcançaram o SNC. Já durante a dieta de hipercolesterolemia, o colesterol total era de 347,3 pmol/g e apenas 4,8%, ou 16,68 pmol/g chegaram ao SNC.

Tabela IV.1: Comparação entre o colesterol total no sangue e no SNC, em diferentes dietas (REFOLO, 2000).

	Coolest. Total		Coolest. SNC	
	μ	σ	μ	σ
Basal	171,1	63,36	14,76	0,95
Hipercol.	347,3	124,09	16,68	1,2

Se supusermos que a mesma diferença percentual ocorrerá nos humanos⁴⁹, podemos dizer que, em dietas basais, quando o colesterol total é de 200mg/dl, 17,2mg/dl de colesterol devem chegar ao SNC. Quando submetidos a uma dieta de hipercolesterolemia, o colesterol total chegaria 400mg/dl e apenas 19,2mg/dl alcançariam o SNC.

Logo, continuando no paralelo entre o homem e o rato, podemos dizer que ocorrerá a mesma alteração no percentual do colesterol do SNC, porém com uma variação menor na ingestão de colesterol. Afinal, um aumento de 1000% de colesterol equivaleria a uma ingestão diária de 300g, o que seria impraticável. Portanto, neste trabalho, consideraremos que a dieta de hipercolesterolemia corresponde a uma ingestão diária de 600mg de colesterol, ou seja, o dobro da ingestão recomendada.

⁴⁸ Na dieta de hipercolesterolemia os ratos foram alimentados com 5% de colesterol e 10% de gorduras, enquanto na dieta basal esses teores consistem de 0,005% de colesterol e 10% de gorduras.

⁴⁹ Simplificações como essa foram necessária em vários pontos do trabalho, devido à grande dificuldade de se obter resultados de pesquisas realizadas com células humanas.

Vamos porém assumir que, como no experimento de REFOLO, nas dietas basais de 300mg de colesterol, 8,6% deste total chega ao SNC. Conforme o teor do colesterol aumenta, menor o percentual do total que irá chegar ao SNC, até chegar ao limite inferior de 4,8%. Note que, em valores nominais esse total aumenta. Construímos então uma curva (*figura IV.1*) que irá indicar, para cada taxa de colesterol total no sangue, qual o percentual que se espera que alcance o SNC. A curva foi definida segundo a equação sigmóide (74), uma vez que estamos assumindo a existência de limites superiores e inferiores para o percentual de colesterol da dieta que alcança o SNC. Além disso, também se assumiu uma transição suave entre os dois limites percentuais.

$$\text{PercentColesterolChegaSNC} = (0.087 - 0.048) \cdot \frac{1}{1 + e^{0.022 \cdot ([\text{colDieta}] - 450) + 0.048}} \quad (75)$$

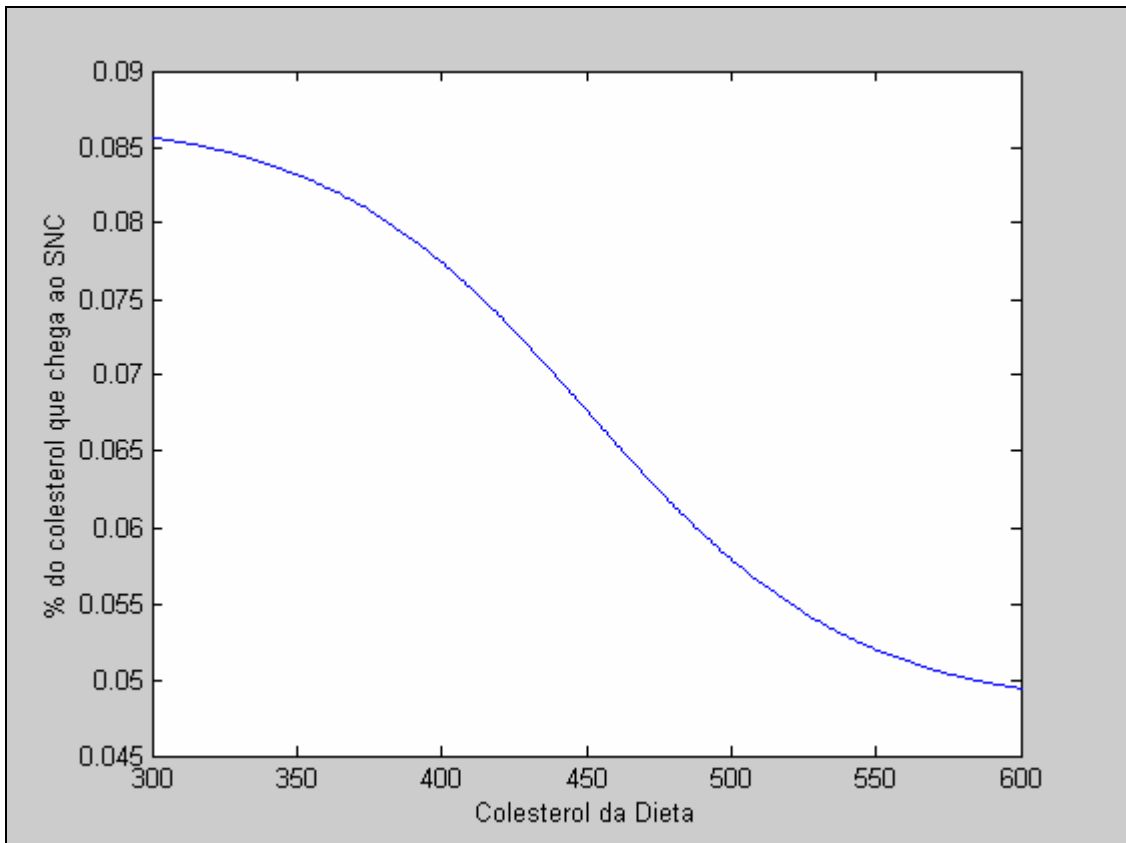


Figura IV.1: Evolução do percentual de colesterol total que penetra no SNC.

Não se pretendia, porém, restringir artificialmente o teor de colesterol do SNC, mas sim modelar o comportamento da BHE e dos mecanismos de controle homeostático do SNC. De fato, existe um mecanismo de limpeza e de seleção da BHE que tenta manter o ambiente cerebral ideal (EDMOND, 1991). Logo, o objetivo era o de, com o sistema dinâmico em funcionando, usar a curva da *figura IV.1* para validar o funcionamento do mesmo.

Nas figuras que se seguem, mostramos a quantidade de colesterol que chega ao SNC, tanto nas dietas normais (*figura IV.2*), quanto nas dietas de hipercolesterolemia (*figura IV.3*). Em ambos os gráficos, também está traçada a linha que determina qual o valor de colesterol esperado no SNC (coESP), calculado através da curva da *figura IV.1*. Podemos notar que, em dietas de 300mg de colesterol diários, em todos os alelos da apoE, a curva de colesterol que chega ao SNC fica abaixo da quantidade esperada, o oposto do que ocorre com dietas de 600mg de colesterol diários. Também podemos perceber que a quantidade de colesterol que chega ao SNC é sempre menor para o alelo $\epsilon 2$, quando comparada aos outros alelos. Já a quantidade de colesterol no SNC na ocorrência do alelo $\epsilon 4$ é sempre maior do que a dos demais alelos, como era de se esperar.

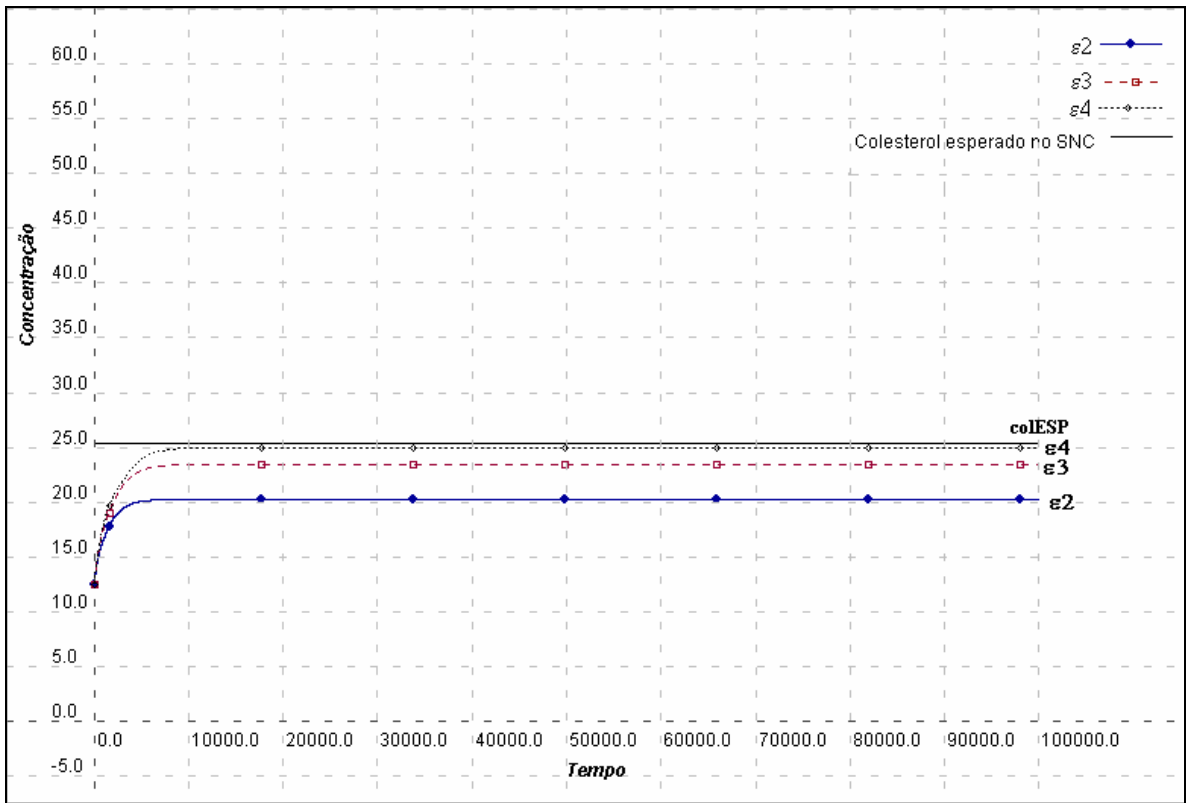


Figura IV.2: Comparação entre o colesterol esperado e o colesterol no SNC, com dieta de 300mg de colesterol.

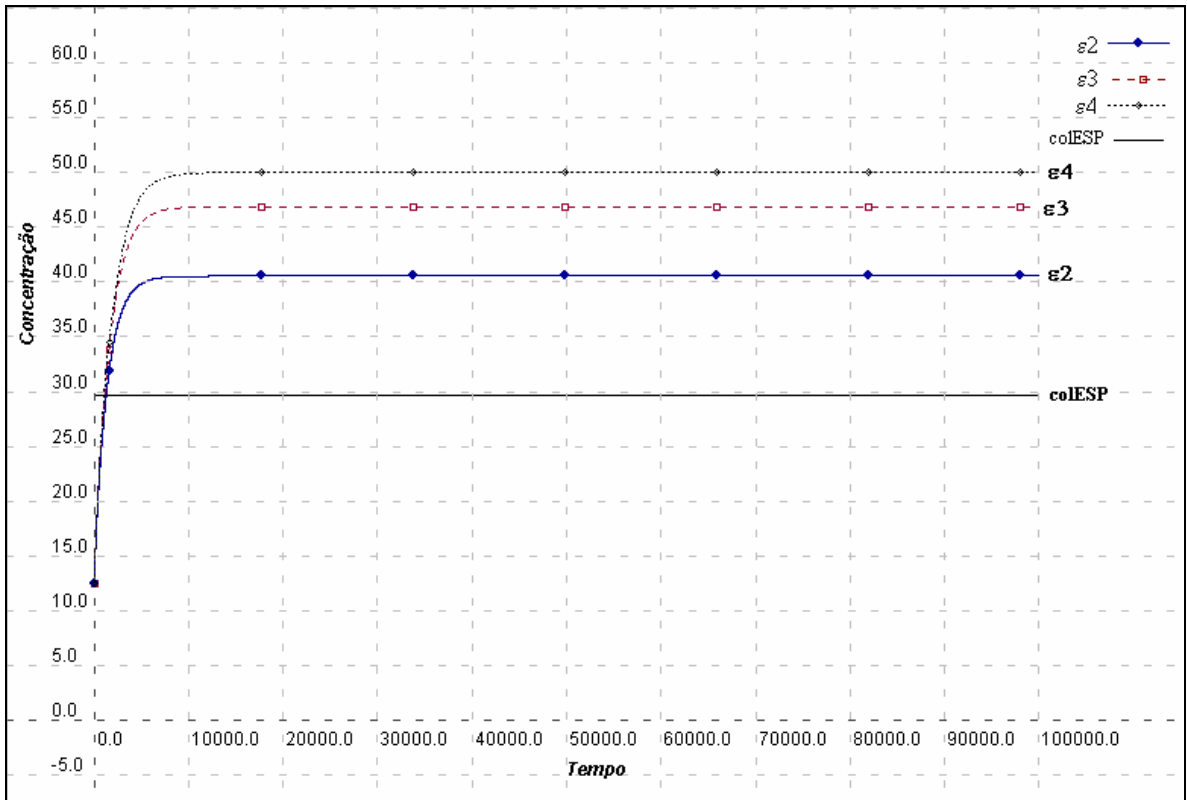


Figura IV.3: Comparação entre o colesterol esperado e o colesterol no SNC, com dieta de 600mg de colesterol.

IV.1.2 - A influência do colesterol da dieta nos níveis de apoE no cérebro

Uma dieta rica em lipídeos, ao mesmo tempo em que aumenta a concentração de colesterol no plasma, aumenta também a concentração de apoE no sangue e no SNC. HOWLAND, 1998, analisou as variações do colesterol e da apoE que ocorrem em diversos compartimentos, quando se aumenta o colesterol da dieta dos ratos. Os resultados encontrados por ele estão mostrados na *tabela IV.2*. Podemos notar que, no SNC, ocorre um aumento de 12,9% no nível de apoE entre a dieta basal e a dieta de hipercolesterolemia.

Tabela IV.2: Comparações entre dietas normais e de hipercolesterolemia (HOWLAND, 1998).

	Dieta Normal	Dieta Hipercolest.	% de aumento
Colest. Plasma (mg/dl)	109,9 ± 20,1	332,5 ± 65,4	202,55
Colest. SNC (mg/g)	6,1 ± 0,6	7,7 ± 0,9	26,23
Colest. Córtex Frontal (mg/g)	13,3 ± 0,3	16,0 ± 0,7	20,30
apoE SNC (%)	100 ± 2,8	112,9 ± 4,0	12,9
apoE Córtex Frontal (%)	100 ± 25,3	237,6 ± 25,8	137,6

Se o risco do alelo $\epsilon 4$ é maior do que o do alelo $\epsilon 2$, então é razoável supor que os níveis da apoE com o genótipo $\epsilon 4$ sejam maiores do que com o alelo $\epsilon 2$. Na simulação realizada, observou-se esse mesmo comportamento, como mostrado na *tabela IV.3*.

Tomando-se, para cada tipo de dieta, a média dos níveis de apoE no SNC dos diferentes alelos, notamos que esse valor passa de 0,26, na dieta basal para 0,31, na dieta de hipercolesterolemia. Logo, podemos constatar que houve um aumento de 19%, o que é bem próximo do valor experimental encontrado para a experiência de HOWLAND, 1998, que relatou um aumento de aproximadamente 13% nos níveis de apoE do SNC de ratos (*tabela IV.2*).

Tabela IV.3: Comparações entre dietas normais e de hipercolesterolemia, encontradas na simulação.

idade	níveis de apoE na dieta normal			níveis de apoE na hipercolesterolemia		
	E2	E3	E4	E2	E3	E4
10	0,2489	0,3877	0,9219	0,2594	0,4035	0,9281
20	0,2038	0,3167	0,8545	0,2166	0,3362	0,8639
30	0,1908	0,2894	0,7875	0,2026	0,3062	0,7856
40	0,1761	0,2539	0,6686	0,1832	0,2646	0,6645
50	0,1557	0,2083	0,5125	0,1567	0,2149	0,5338
60	0,1322	0,161	0,3498	0,1278	0,1684	0,4245
70	0,1086	0,1193	0,206	0,1015	0,1325	0,3527
80	0,0873	0,0867	0,097	0,0804	0,1091	0,3217
90	0,0691	0,0637	0,0297	0,0654	0,0975	0,3294
100	0,0546	0,0491	0,0036	0,0564	0,097	0,3726
Médias	0,1427	0,1936	0,4431	0,145	0,2130	0,5577
μ das médias	0,2598			0,3052		

IV.1.3 - A influência do colesterol da dieta no metabolismo do $A\beta$

IV.1.4 - Níveis de β -amilóide

O nível médio de $A\beta$ solúvel é muito maior em pacientes da DA do que nos indivíduos sem a doença e está diretamente correlacionado com a gravidade da mesma. Nos casos familiares da DA, a produção de $A\beta$ pode ser até seis vezes maior do que em pessoas sem a doença (EDELSTEIN-KESHET, 2002). Esse aumento da produção do $A\beta$ também pode se relacionar ao alelo da apoE presente (MARTEL, 1997).

Nos testes realizados, verificou-se ainda a existência de uma diferença entre os níveis da $A\beta$ solúvel que ocorrem nos dois tipos de dieta estudados, como mostrado nas *figuras IV.4* e *IV.5*. Além disso, em dietas de hipercolesterolemia, a diferença entre os níveis de apoE para cada alelo da mesma se acentua (*figura IV.5*).

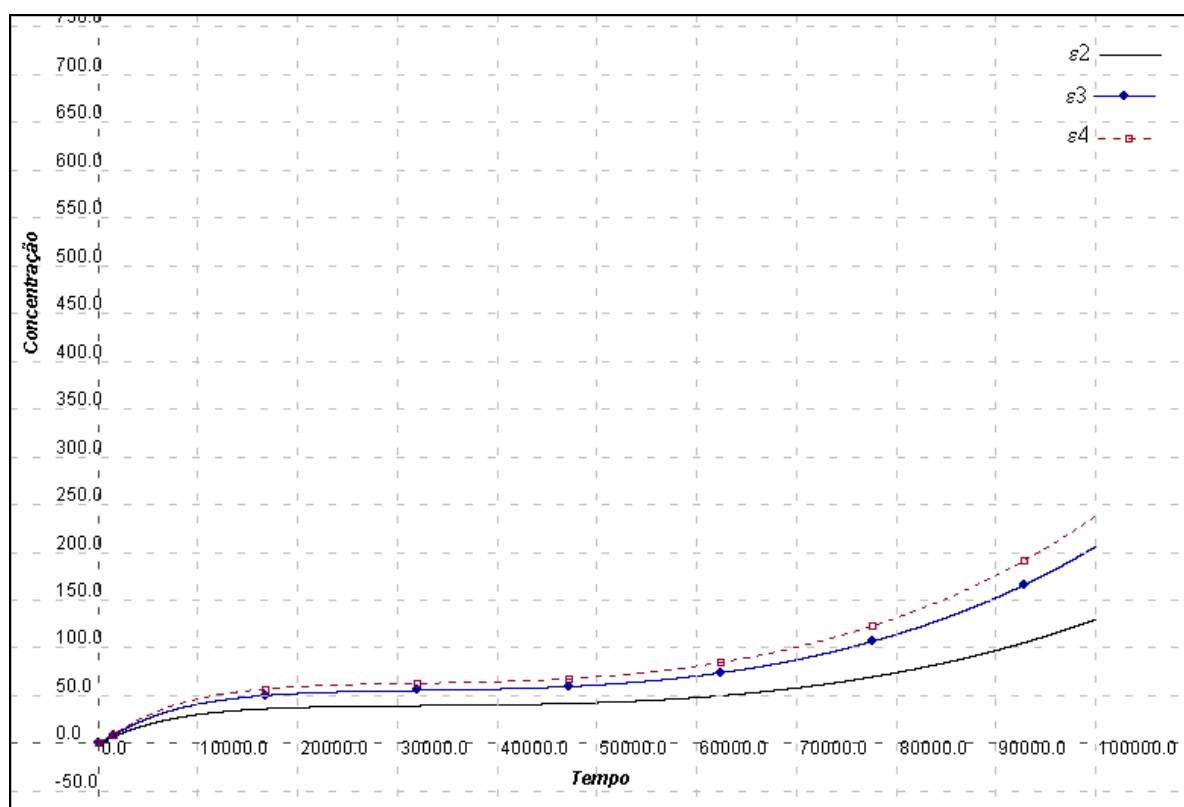


Figura IV.4: Níveis de Aβ com dieta de 300mg de colesterol.

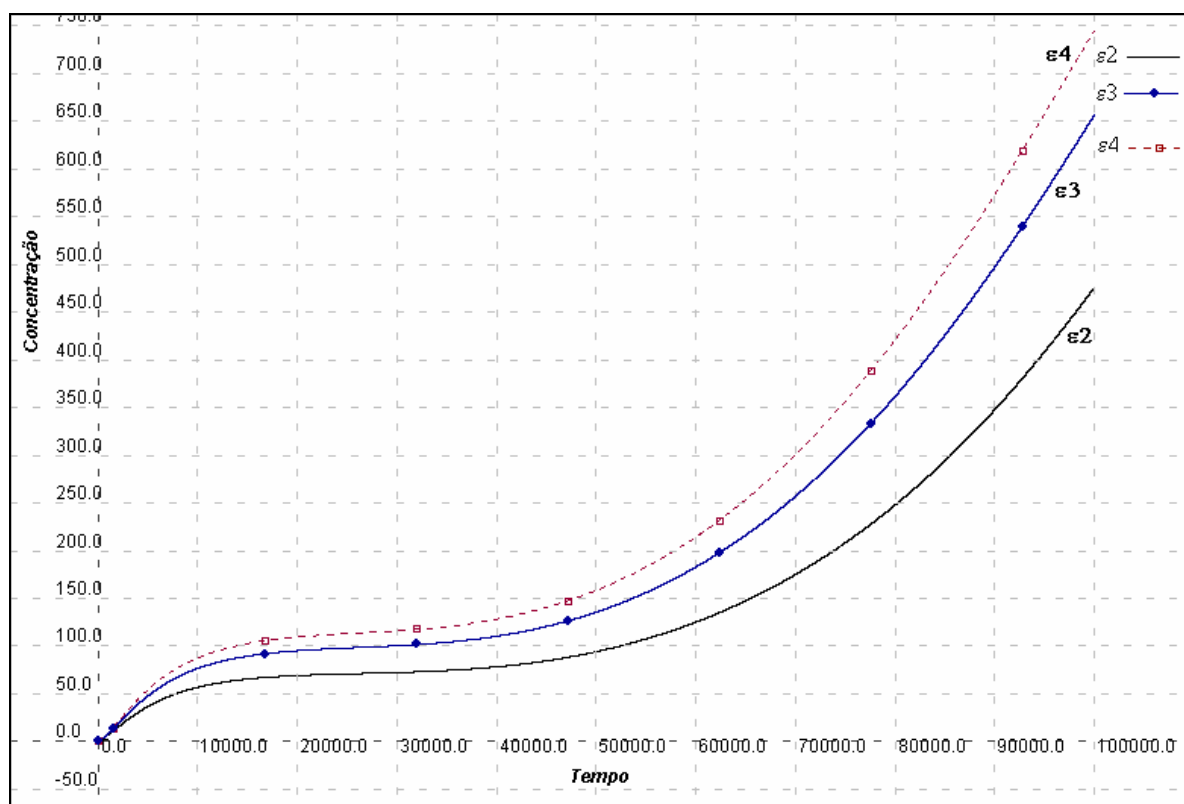


Figura IV.5: Níveis de Aβ com dieta de 600mg de colesterol.

A *tabela IV.4* mostra os valores médios dos níveis de A β , dos diferentes alelos da apoE, entre os dois tipos diferentes de dieta estudados e que foram encontrados na simulação. A média dos valores obtidos, para cada dieta, indica uma diferença de 135% entre os níveis médios de A β , em cada caso.

Tabela IV.4: Comparações entre os níveis de A β encontrados na simulação, nas dietas normais e de hipercolesterolemia.

idade	níveis de aBeta na dieta normal			níveis de aBeta na hipercolesterolemia		
	$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$	$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
10	28,6262	38,8113	43,9601	54,008	72,453	82,3425
20	37,2974	51,8834	58,8854	68,9087	94,8193	108,9464
30	40,1314	56,535	64,2764	74,0516	103,1869	119,1643
40	43,3256	62,033	70,7934	82,0877	116,4751	135,1349
50	48,7476	71,3542	81,8603	97,1998	141,6321	165,4159
60	57,1404	85,8141	99,0409	122,5389	183,9485	216,359
70	69,2256	106,8538	124,1305	162,0418	249,1629	294,2601
80	86,1295	136,7344	159,9405	220,6721	342,8436	404,2737
90	109,6178	178,8968	210,669	303,8892	467,8947	547,037
100	142,3171	238,1964	282,0453	415,7397	619,8031	713,3613
Médias	66,2559	102,7112	119,5602	160,1138	239,2219	278,6295
μ das médias	96,1758			225,9884		

Esse valor é menor do que o relatado por EDELSTEIN-KESHET, 2002, que prevê um aumento de 600% nos casos de DA mas, ainda assim, a diferença entre os níveis de A β nas duas dietas é bastante significativa (*figura IV.6*).

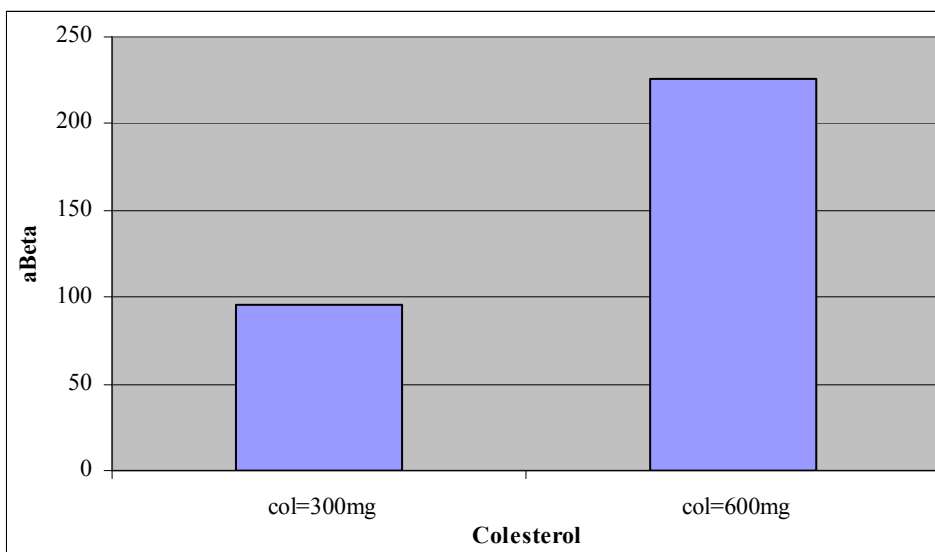


Figura IV.6: Comparação entre os níveis de $A\beta$ para as dietas de 300mg e de 600mg de colesterol diários.

Em outro trabalho, realizado por REFOLO, 2000, o valor médio de depósitos $A\beta$ passou de 10,33 para 17,08, quando os ratos são submetidos a uma dieta de hipercolesterolemia (tabela IV.5). Logo, o aumento percentual foi de 65%. Mais uma vez, os resultados encontrados na literatura variam conforme o objeto de estudo da pesquisa, porém a simulação obteve uma diferença relativa que aponta para a mesma direção daquela encontrada nos trabalhos citados.

Tabela IV.5: Comparação entre os níveis de $A\beta$, na dieta normal e de hipercolesterolemia (REFOLO, 2000).

	Depósitos $A\beta$	
	μ	σ
Dieta Basal	10,33	3,26
Dieta de Hipercolesterolemia	17,08	7,11

IV.1.5 - Agregação do A β

MURRAY (1993) levantou a hipótese de que, se o processo de agregação do A β pudesse ser suspenso, a doença não evoluiria. Segundo ele, apesar da inexistência de uma droga específica para tal⁵⁰, compostos que inibam a formação de A β ou o mantenham em forma solúvel poderiam ser úteis terapeuticamente.

Na simulação, testamos o comportamento do sistema quando o processo de agregação do A β é inibido. Os resultados encontrados são coerentes com a hipótese anterior e as figuras a seguir ilustram a experiência. Na *figura IV.7*, mostramos os níveis de produção de PNS's e EN's resultantes de uma simulação de dieta de 600mg diários, em indivíduos portadores do alelo $\epsilon 4$, com a evolução normal da doença.

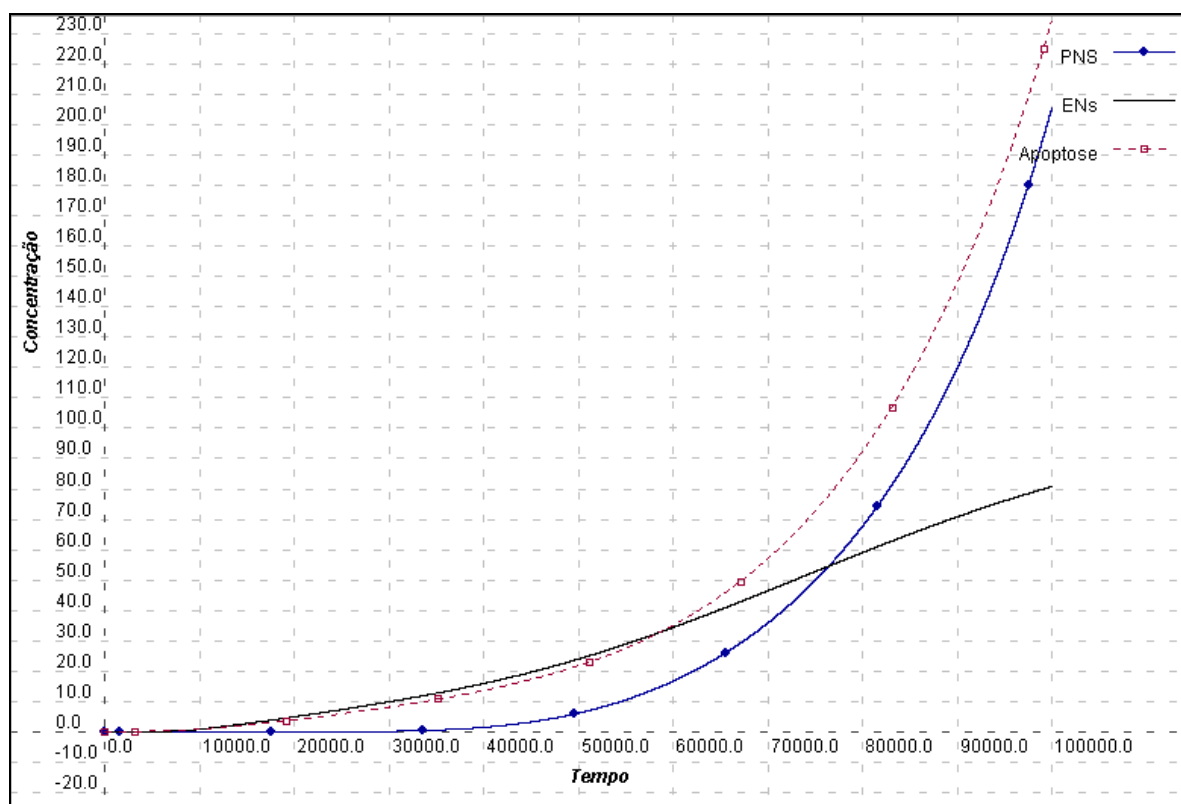


Figura IV.7: Formação de PNS's e EN's, para o $\epsilon 4$, com 600mg de colesterol e agregação do A β .

⁵⁰ Não existe um medicamento específico para a DA, muito embora se especule sobre a possibilidade de se encontrar uma droga que consiga alterar a deposição amilóide em tecidos (MURRAY, 1993).

Em comparação, podemos observar que, na *figura IV.8*, quando o processo de agregação do A β é inibido, ocorre a supressão do processo inflamatório e, conseqüentemente, a inibição da formação de PNS's. A formação de EN's porém, se mantém. De fato, a caspase-clivagem da Tau pode ser acionada pela presença do A β solúvel, cuja produção não foi inibida. Apesar de não ser mais convertido para A β polimerizado, o A β apresenta uma redução na sua produção. Coerentemente, notamos uma leve diminuição na taxa de formação de EN's.

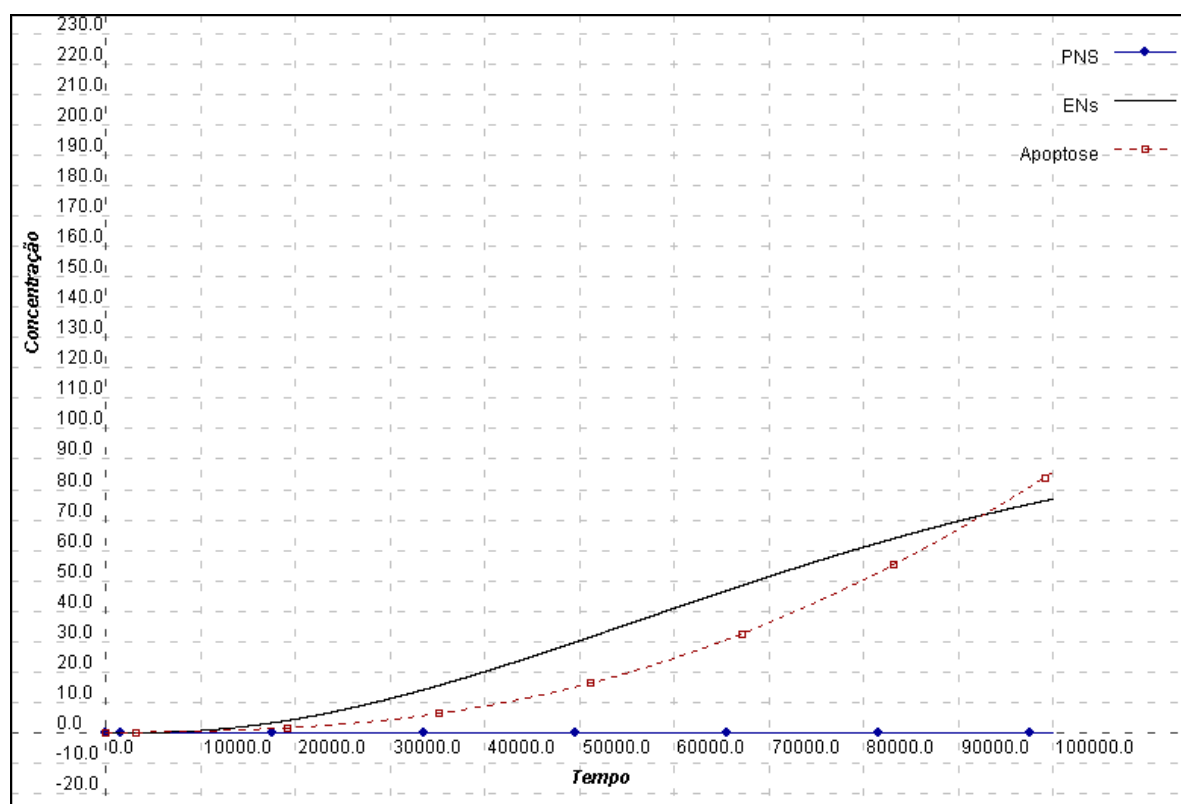


Figura IV.8: Formação de PNS's e EN's, para o $\epsilon 4$, com 600mg de colesterol e inibição da agregação do A β .

Não é difícil explicar a redução na produção do A β . Como não se formam mais PNS's, também não haverá perturbação no funcionamento da BHE por essas estruturas, evitando o aumento do efluxo do colesterol para o SNC. Como conseqüência, as alterações na distribuição do colesterol entre as folhas da membrana neuronal irão ocorrer de forma bem mais lenta (*figura IV.9*). Conseqüentemente, a produção de amilóide se reduz, como podemos observar da comparação entre a *figura IV.2* (curva do $\epsilon 4$) e a *figura IV.10*.

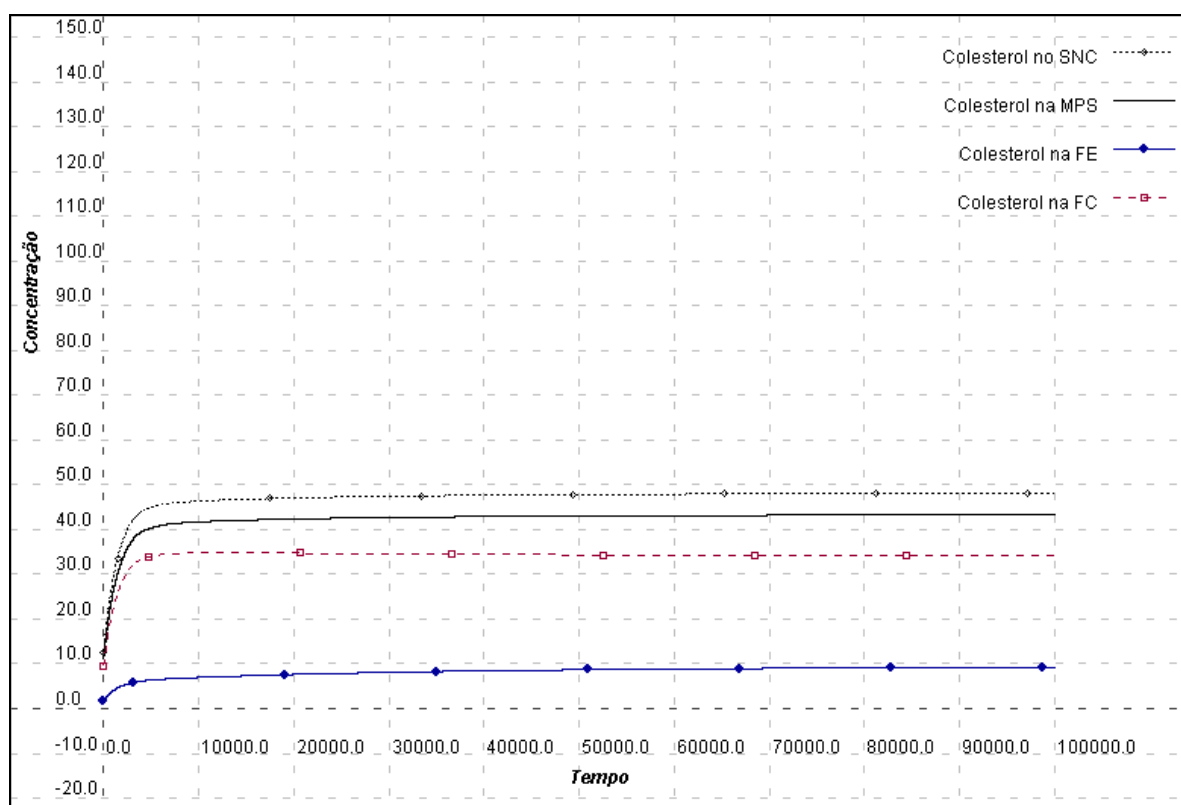


Figura IV.9: Alterações na MPS, para o $\epsilon 4$, com 600mg de colesterol e inibição da agregação do $A\beta$.

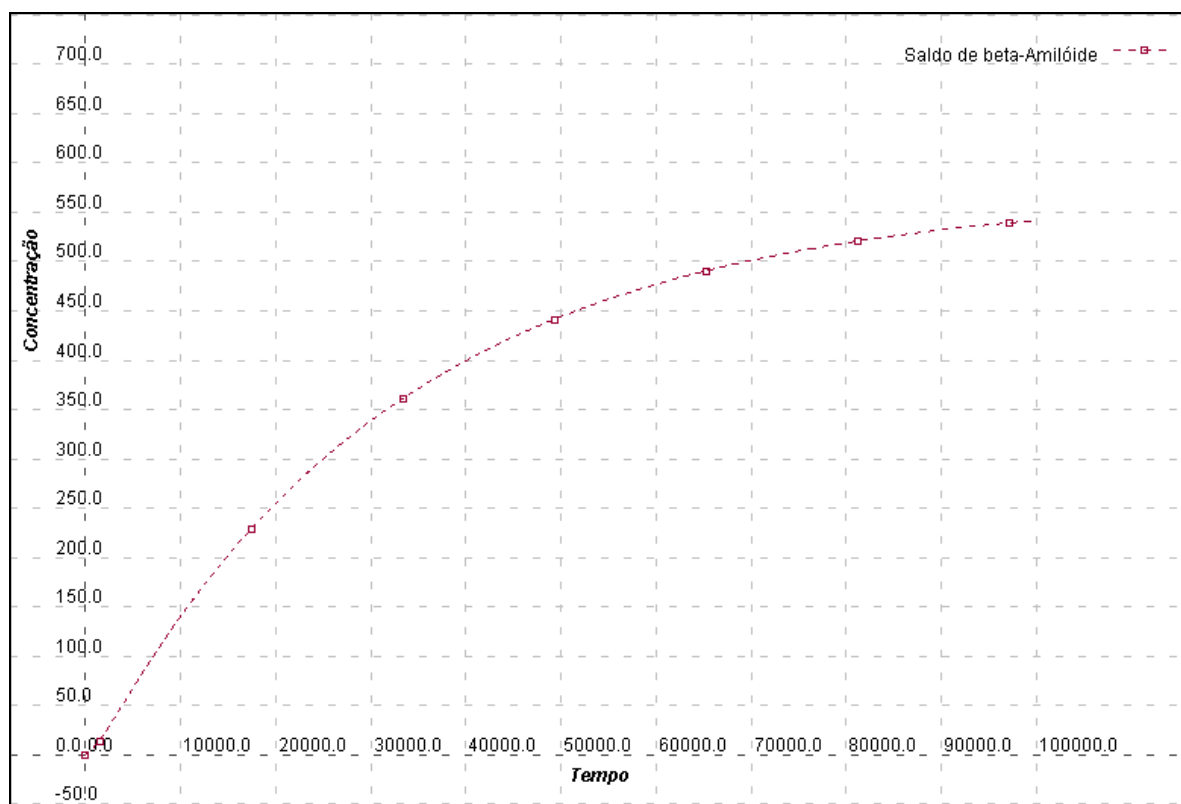


Figura IV.10: Níveis de $A\beta$, para o $\epsilon 4$, com 600mg de colesterol e inibição da agregação do $A\beta$.

IV.1.6 - Formação dos canais de cálcio

Na construção da equação que fornece o número de canais de cálcio (*equação 65*), a cada instante, o objetivo era representar a relação entre o teor de colesterol da MPS e o número de canais de cálcio, formados pela inserção do $A\beta$ polimerizado na membrana. Como explicado anteriormente, o número de canais irá aumentar proporcionalmente ao aumento do teor de colesterol da MPS. Porém, a partir de um certo valor, essa formação se estabiliza, pois a membrana se torna rígida, impedindo a formação de novos canais. Na *figura IV.11*, vemos a evolução do número de canais formados, em uma dieta de 600mg e herança do alelo $\epsilon 4$.

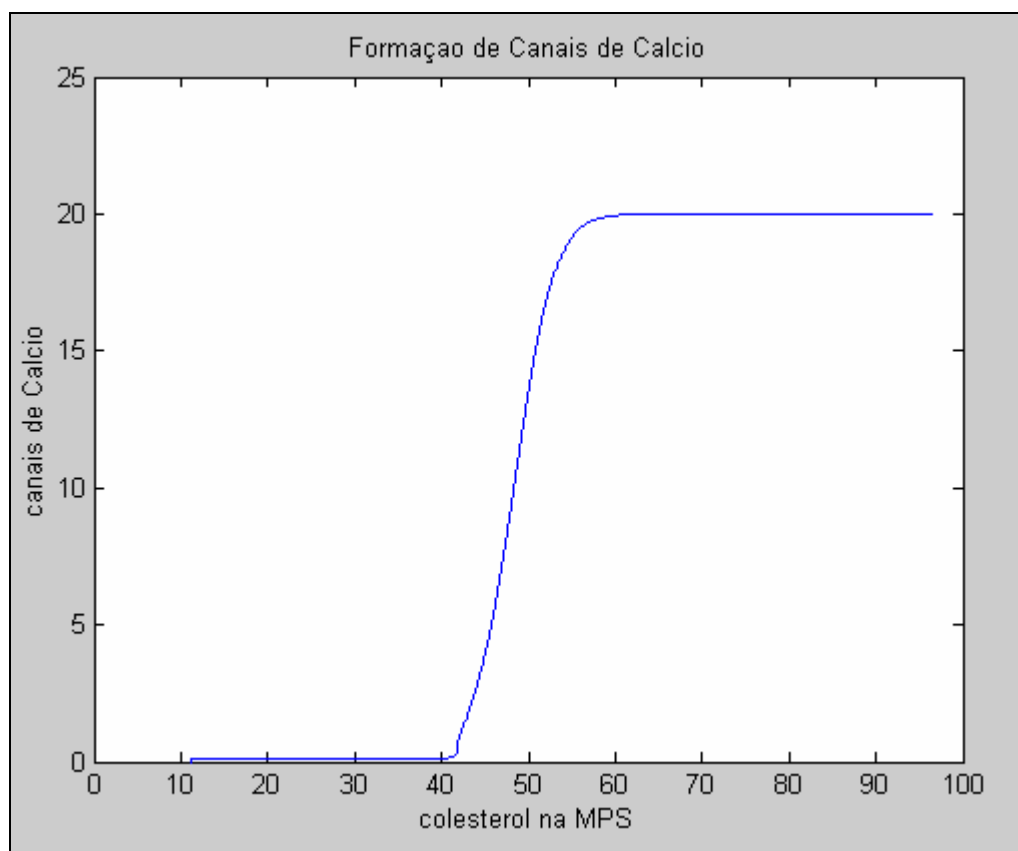


Figura IV.11: Formação de canais de cálcio em função do colesterol da MPS.

O resultado obtido na simulação apresenta uma grande semelhança no formato da curva obtida por uma experiência *in vitro* (JI, 2002) (*figura IV.12*), o que indica uma concordância qualitativa dos experimentos.

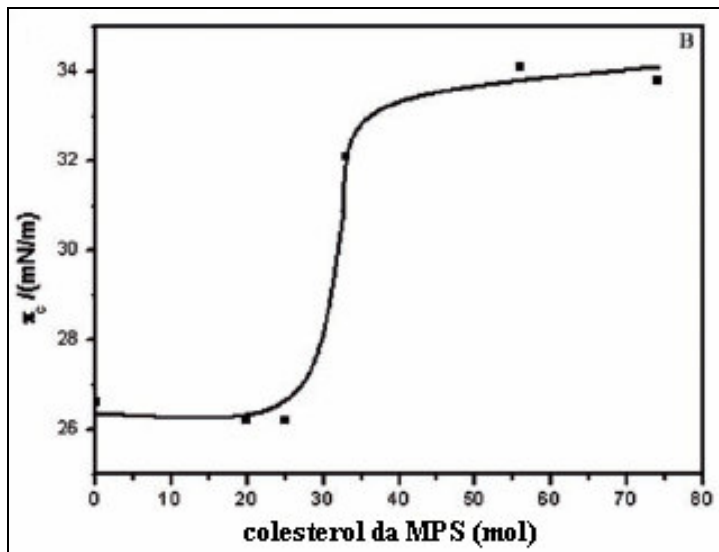


Figura IV.12: Taxa de inserção do A β na MPS, segundo JI (2002).

IV.1.7 - A influência do colesterol da dieta na formação de PNS's

Sabemos que o aumento do colesterol no plasma aumenta o risco da DA. Estudos *in vitro* verificaram que o risco associado ao $\epsilon 4$ pode ser mediado pelo colesterol plasmático. JARVIK (1995), em uma análise realizada com 482 pacientes do sexo masculino, observou que a relação entre o genótipo da apoE e a DA é, ao menos em parte, dependente do nível de colesterol total no plasma. Logo, a diferença percebida entre o total de PNS's e de EN's, quando da ocorrência dos diferentes genótipos do apoE, deve ser acentuada em dietas de alto colesterol.

Neste trabalho, os dois tipos de dieta foram simulados e pôde-se observar o mesmo fenômeno, como mostrado nas figuras de IV.13 e IV.14, a seguir.

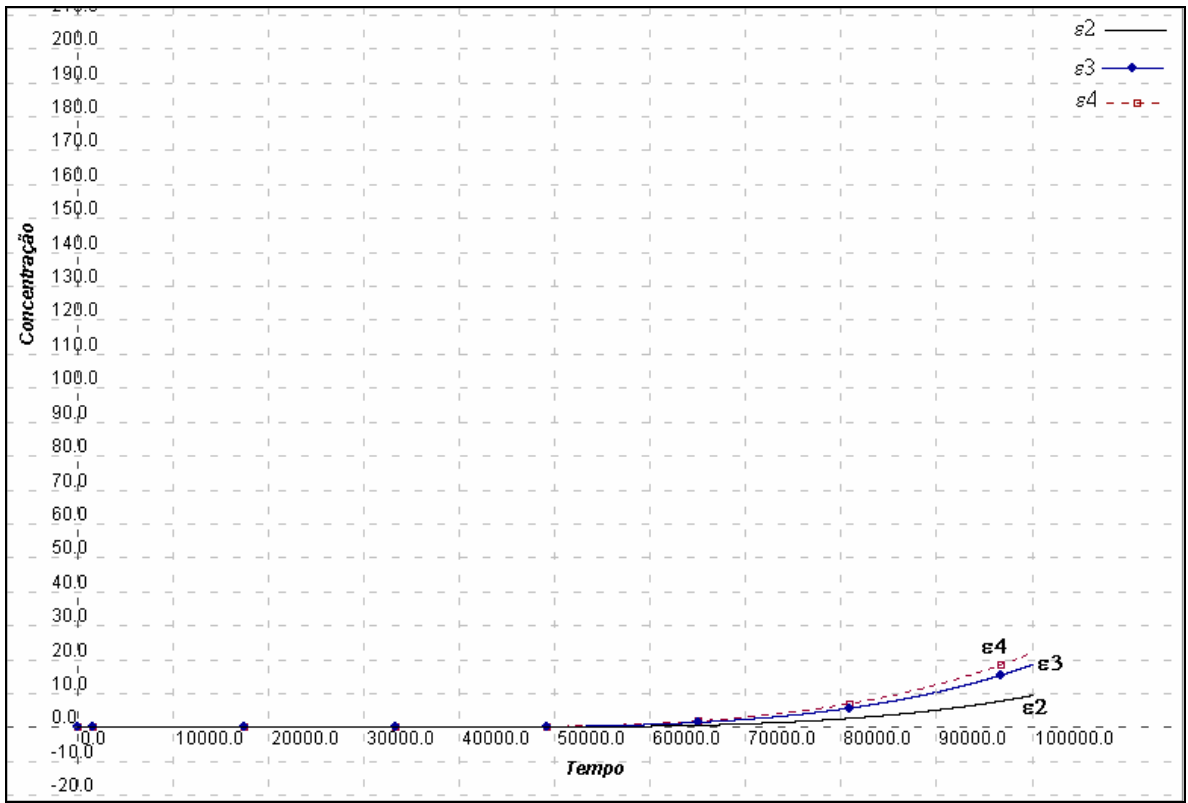


Figura IV.13: Formação de PNS's, para cada alelo da apoE, com dieta de 300mg de colesterol.

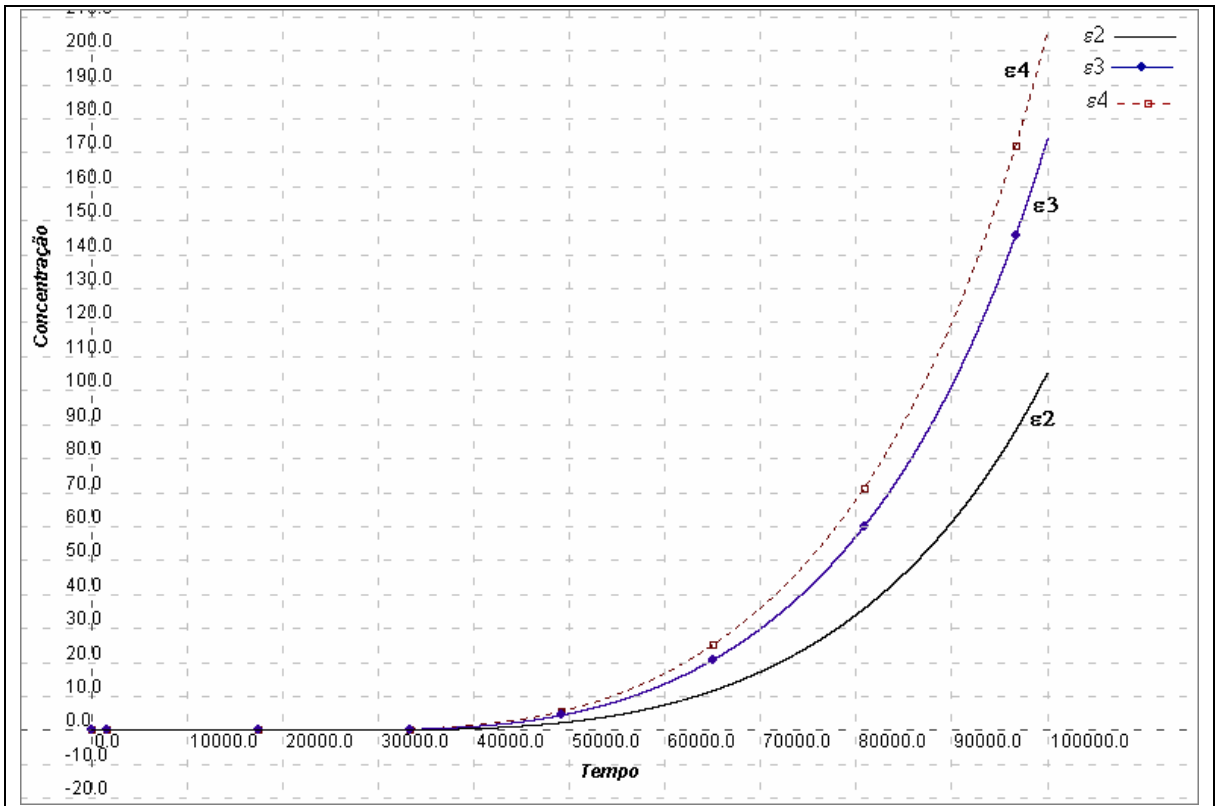


Figura IV.14: Formação de PNS's, para cada alelo da apoE, com dieta de 600mg de colesterol.

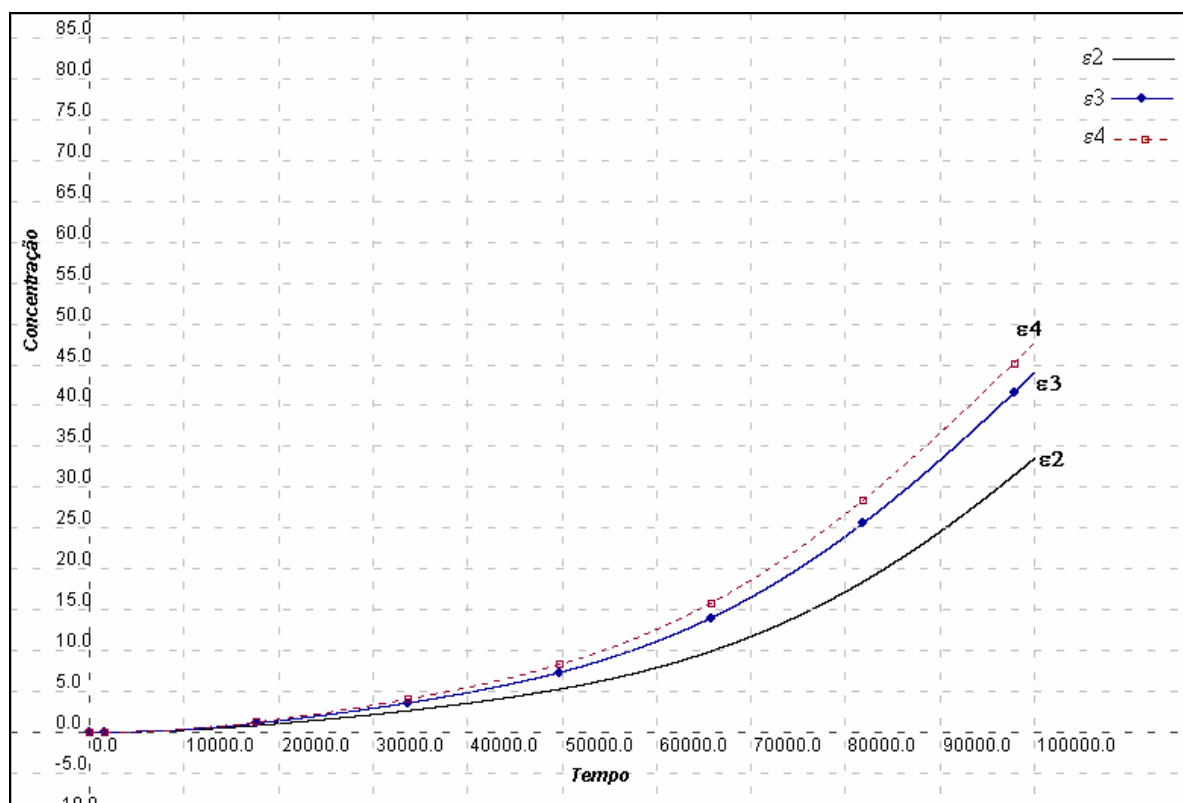


Figura IV.15: Formação de EN's, para cada alelo da apoE, com dieta de 300mg de colesterol.

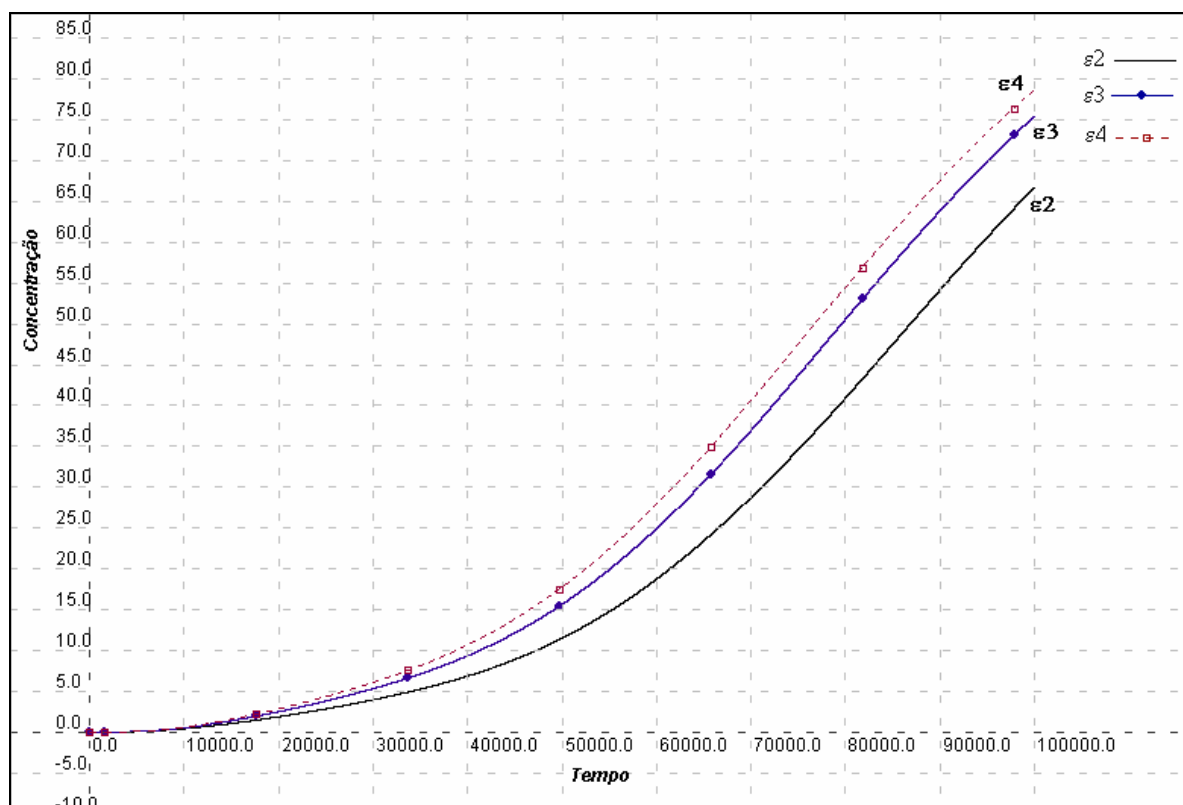


Figura IV.16: Formação de EN's, para cada alelo da apoE, com dieta de 600mg de colesterol.

Da análise das figuras anteriores, verificamos que a diferença entre as taxas de formação de PNS's, que ocorre entre os genótipos da apoE, acentua-se na dieta de hipercolesterolemia. Isso ocorreu porque a dieta rica em colesterol acelerou o processo de desenvolvimento da DA. Assim, como a produção de PNS's tem um comportamento exponencial, as diferenças se acentuam com o passar do tempo. Já com o processo de formação de EN's, apesar de haver também um aumento na quantidade de emaranhados formados, não se percebe um distanciamento entre as curvas de cada alelo, quando passamos da dieta normal para a dieta de hipercolesterolemia.

IV.1.8 - Configuração das MPS's

A distribuição do colesterol nas membranas plasmáticas varia com o genótipo da apoE. Experiências com animais mostraram que o nível de colesterol nas FE's que contêm apoE4 é duas vezes maior do que a encontrada nas mesmas estruturas quando estas contêm apoE3. A ocorrência da proteína apoE4 indicaria então que o transporte do colesterol e outros lipídeos estão alterados no SNC de um grupo de pacientes da DA (YANAGISAWA, 2002a). A análise comparativa entre a eficiência da apoE2 e da apoE4 na distribuição de colesterol pelas folhas da MPS, afetando a produção de A β , pode esclarecer a diferença no risco de ocorrência da DA na presença desses dois alelos (FREARS, 1999).

As simulações realizadas também mostraram a existência de diferenças na distribuição entre o colesterol das FC e FE, para cada alelo da apoE. Além disso, essa diferença pode ser acentuada em dietas de hipercolesterolemia, como se vê nas *figuras IV.15 a IV.20*.

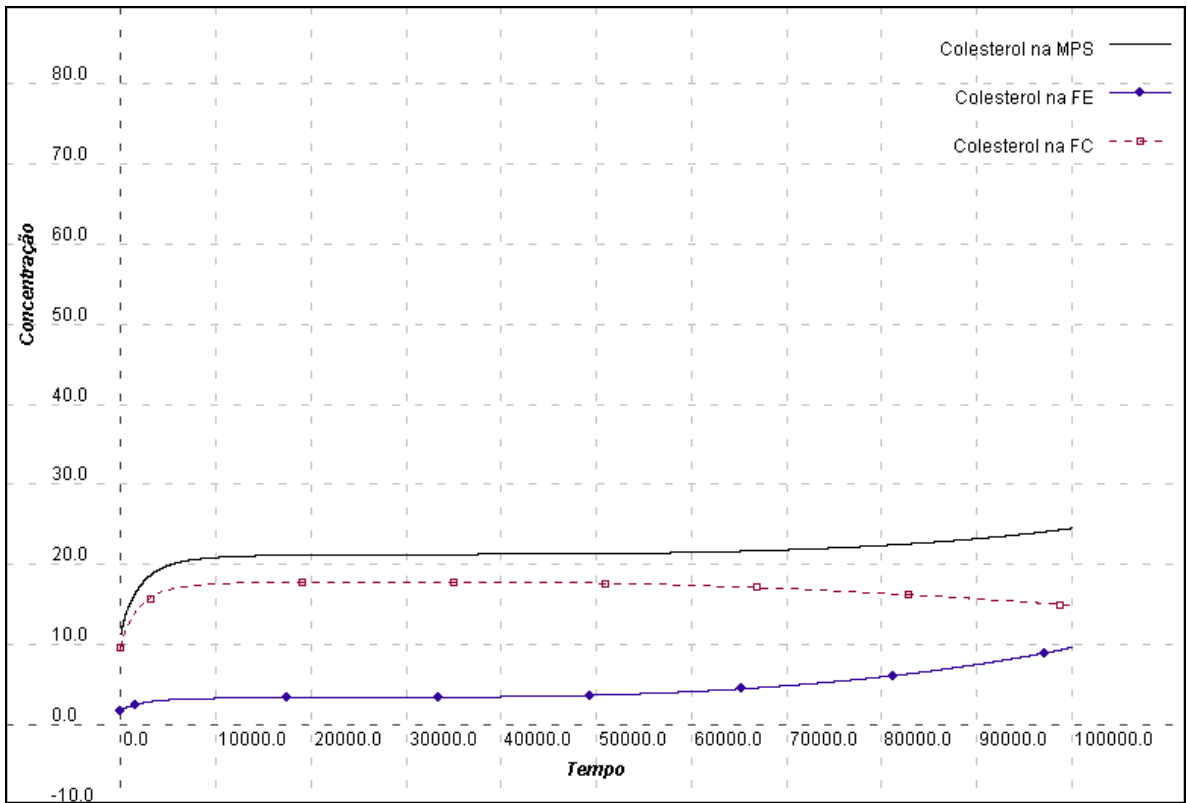


Figura IV.17: Alterações no colesterol da MPS, para o alelo $\epsilon 2$, com dieta de 300mg de colesterol diários.

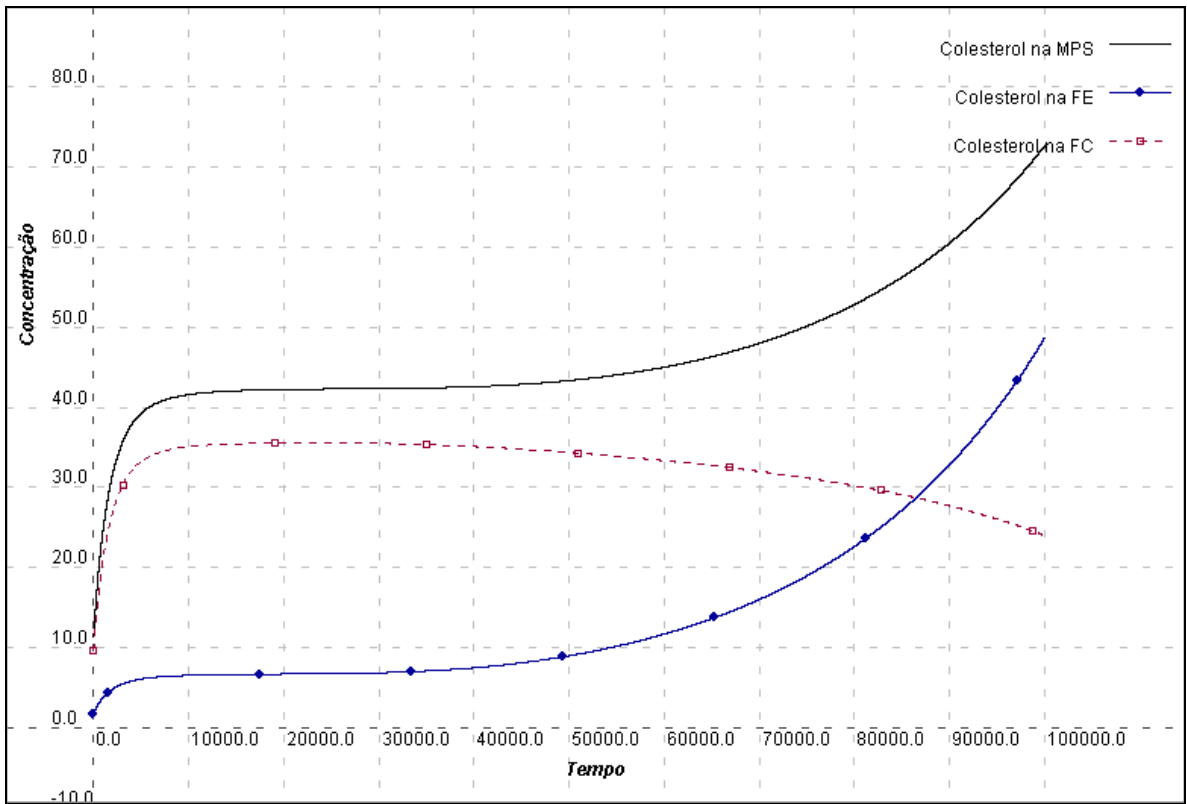


Figura IV.18: Alterações no colesterol da MPS, para o alelo $\epsilon 2$, com dieta de 600mg de colesterol diários.

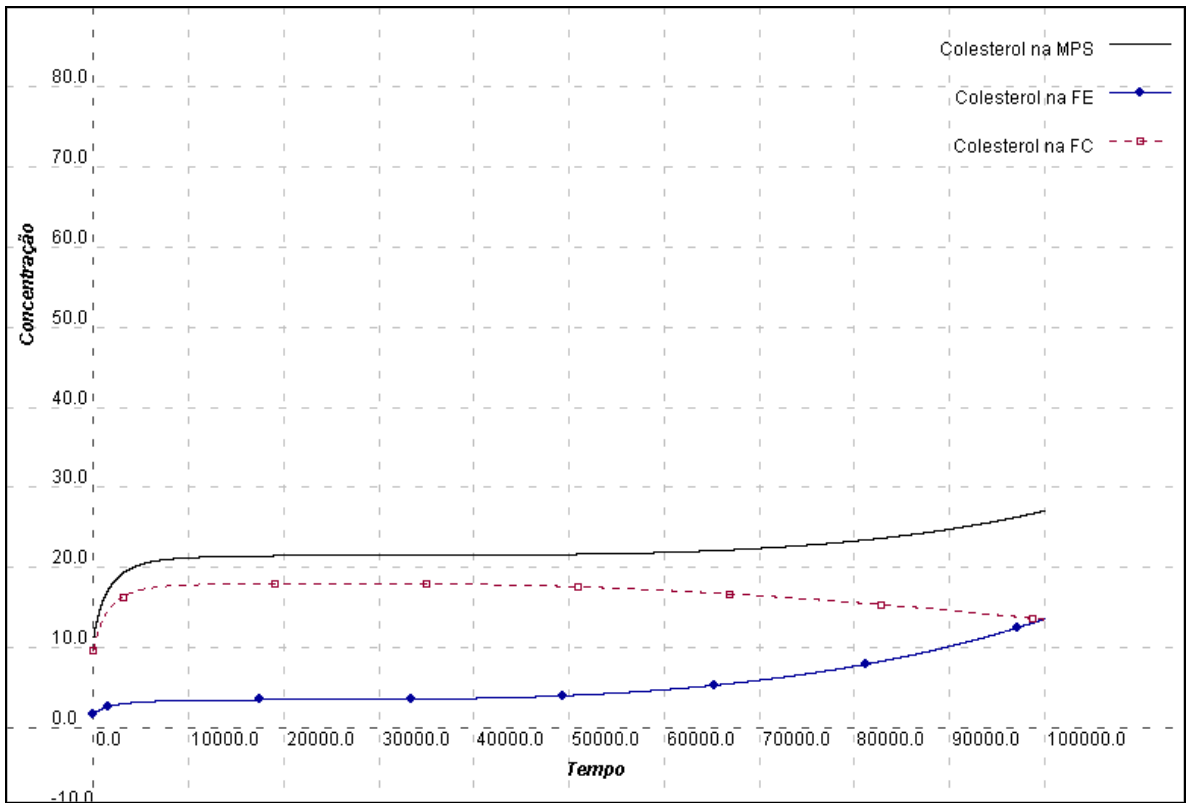


Figura IV.19: Alterações no colesterol da MPS, para o alelo $\epsilon 3$, com dieta de 300mg de colesterol diários.

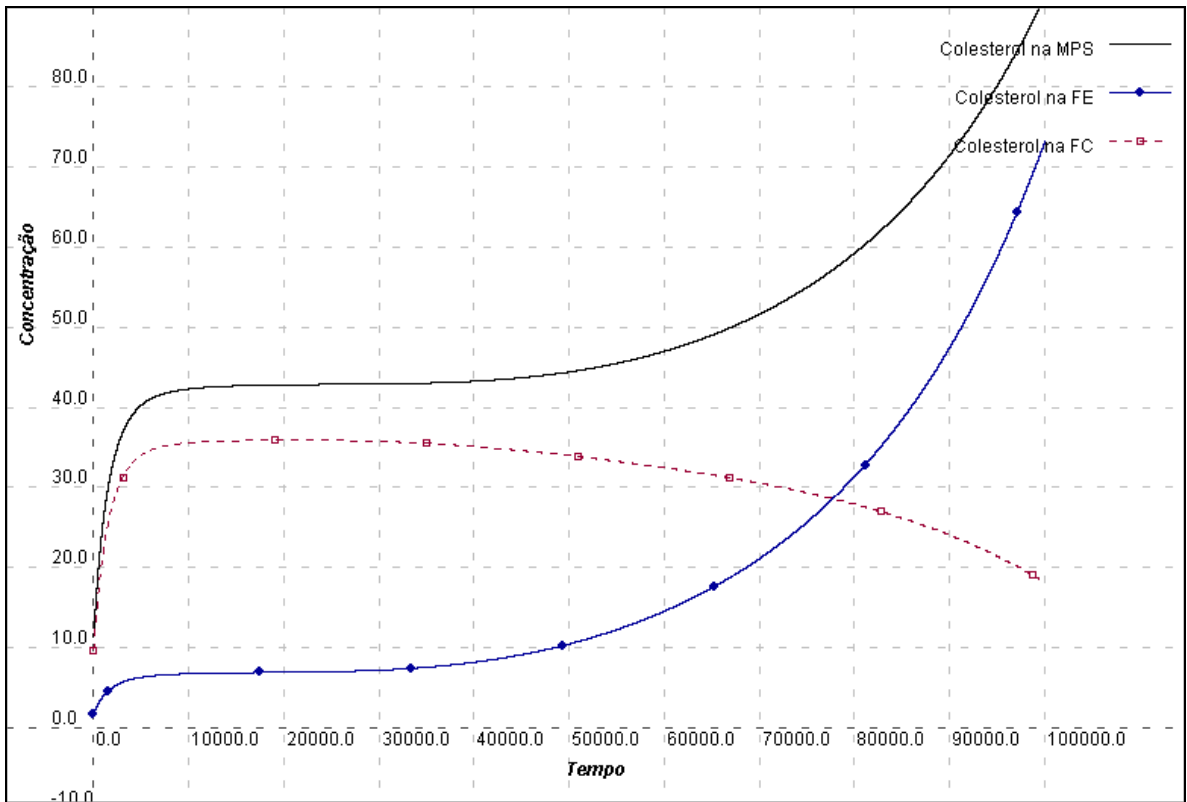


Figura IV.20: Alterações no colesterol da MPS, para o alelo $\epsilon 3$, com dieta de 600mg de colesterol diários.

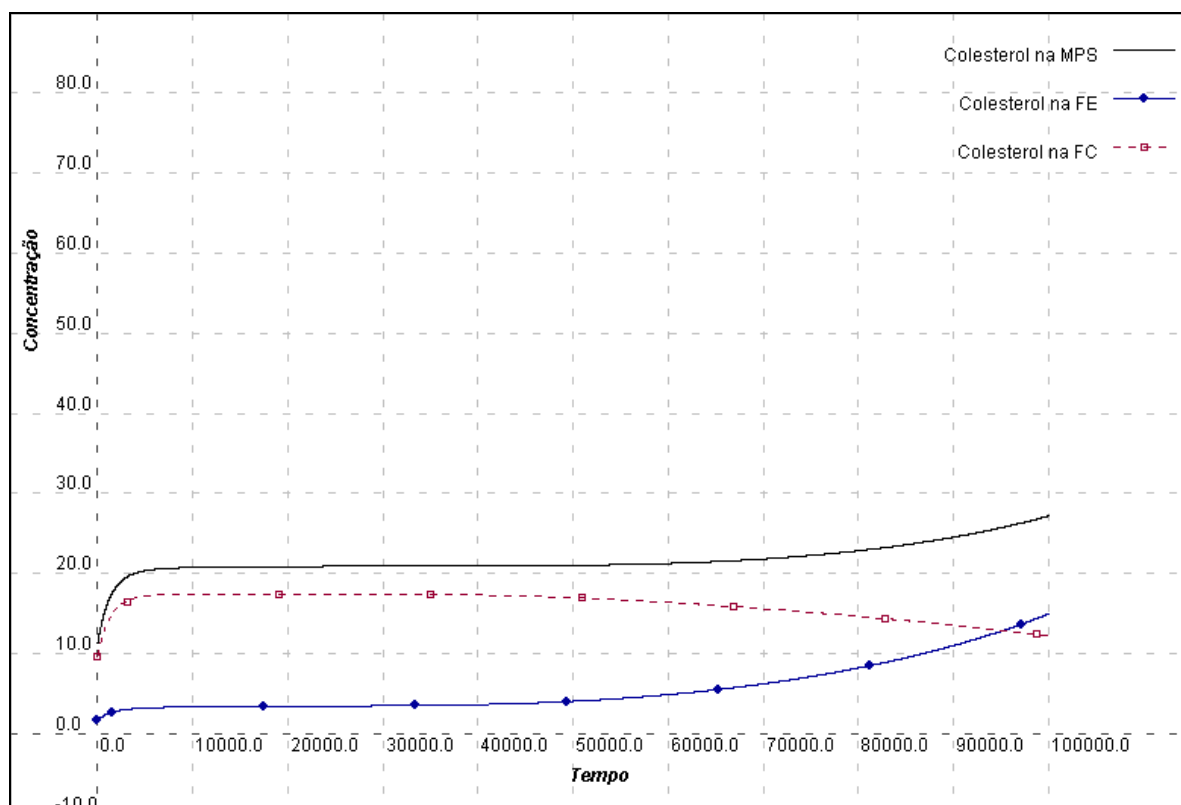


Figura IV.21: Alterações no colesterol da MPS, para o alelo ϵ_4 , com dieta de 300mg de colesterol diários.

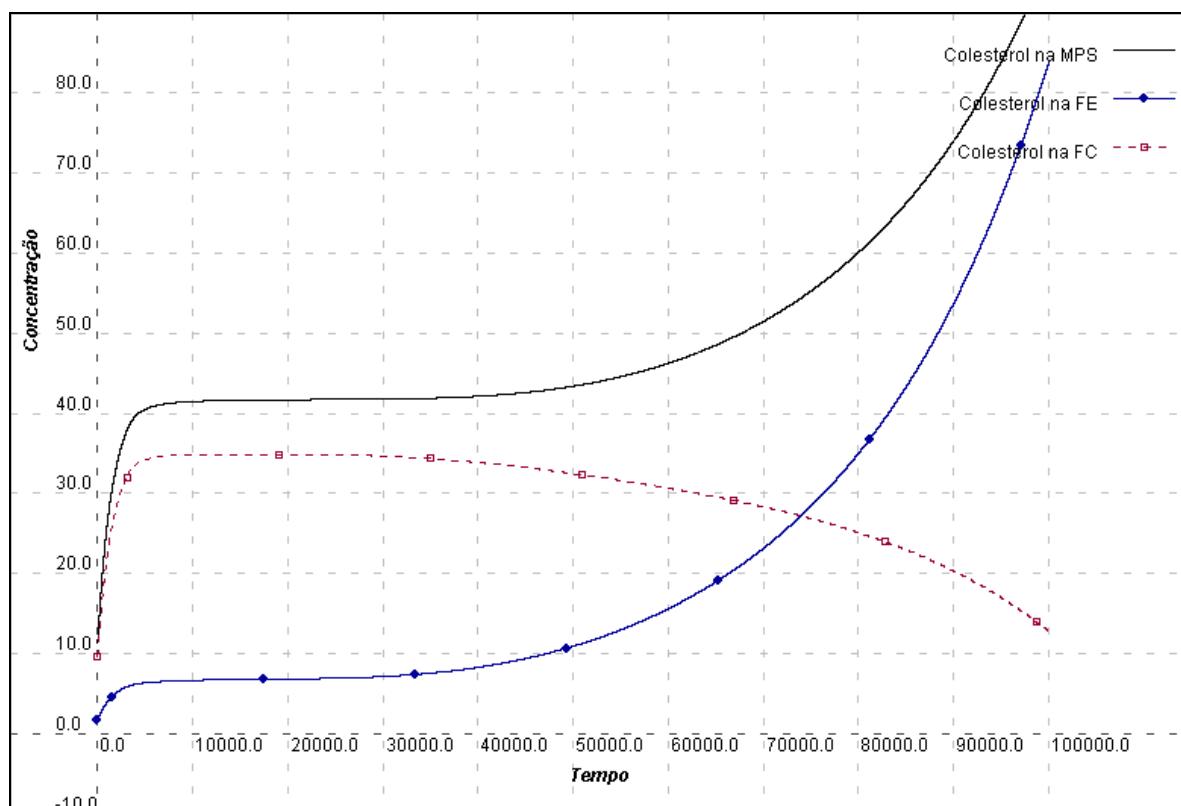


Figura IV.22: Alterações no colesterol da MPS, para o alelo ϵ_4 , com dieta de 600mg de colesterol diários.

Da análise das figuras anteriores, podemos observar que, além do aumento do total de colesterol na membrana neuronal, cada alelo da apoE produz uma velocidade diferente na alteração da distribuição do colesterol entre as folhas. Em média, verificamos uma diferença de 15 anos entre o ponto de inversão do percentual de colesterol entre a FC e FE do alelo $\epsilon 2$ para o $\epsilon 4$. Esse tempo cai para 10 anos entre o alelo $\epsilon 2$ e o $\epsilon 3$.

Das figuras acima podemos ainda perceber que, até a idade de cerca de 50 anos, não se observa praticamente nenhuma alteração no colesterol total da membrana neuronal e apenas uma leve alteração da distribuição desse esteróide entre as folhas da membrana.

IV.1.9 - Formação de EN's

Na Doença de Niemann-Pick, foram encontrados EN's idênticos aos da DA, apesar de não terem sido encontradas PNS's (LYNCH, 2000). Como os indivíduos dessa doença vêm a falecer em idade bem mais precoce do que os pacientes da DA⁵¹, podemos imaginar que os EN's ocorram antes das PNS's's. Nos testes realizados, observamos o mesmo fenômeno, conforme mostrado nas *figuras de IV.26 a IV.28*. Nessas simulações, podemos notar que a formação de EN's ocorre quase 35 anos antes dos PNS's, na ocorrência do $\epsilon 2$, e em torno de 25 anos, para os outros alelos.

⁵¹ O óbito em decorrência desta doença pode ocorrer até mesmo em crianças.

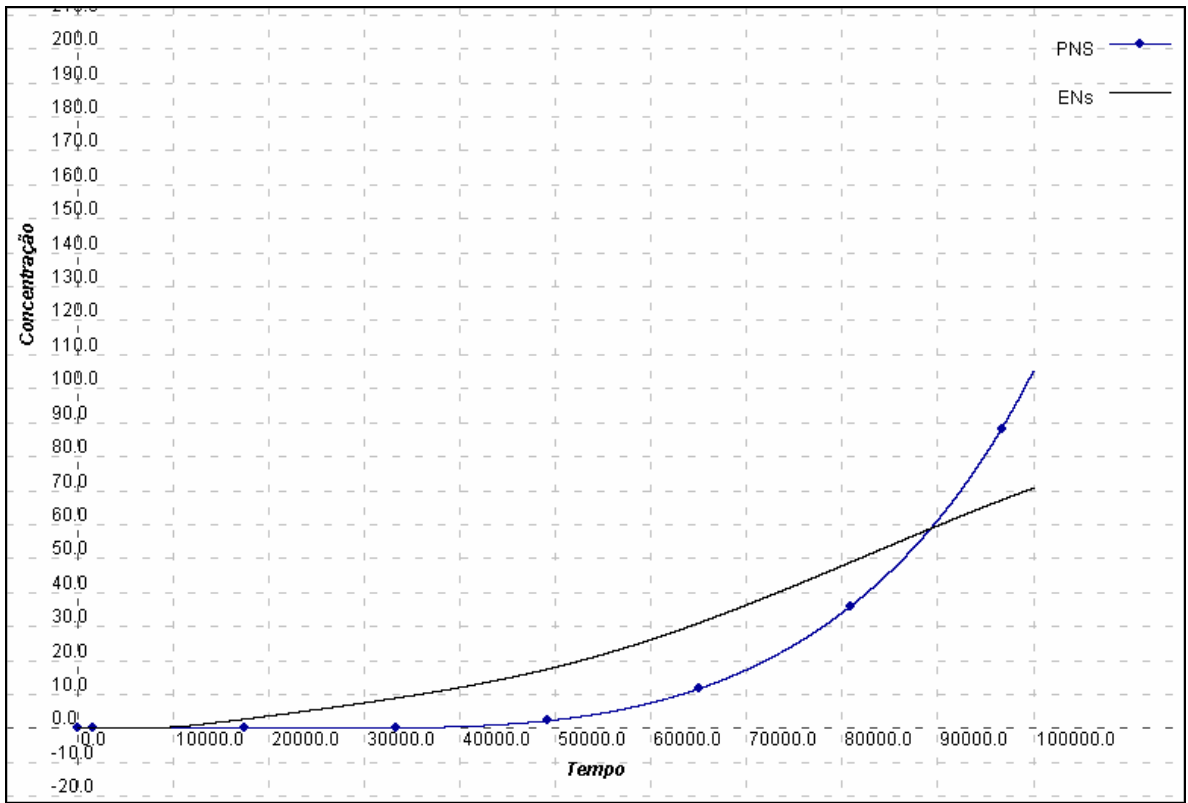


Figura IV.23: Formação de PNS's e EN's, para o ϵ_2 , com 600mg de colesterol diários.

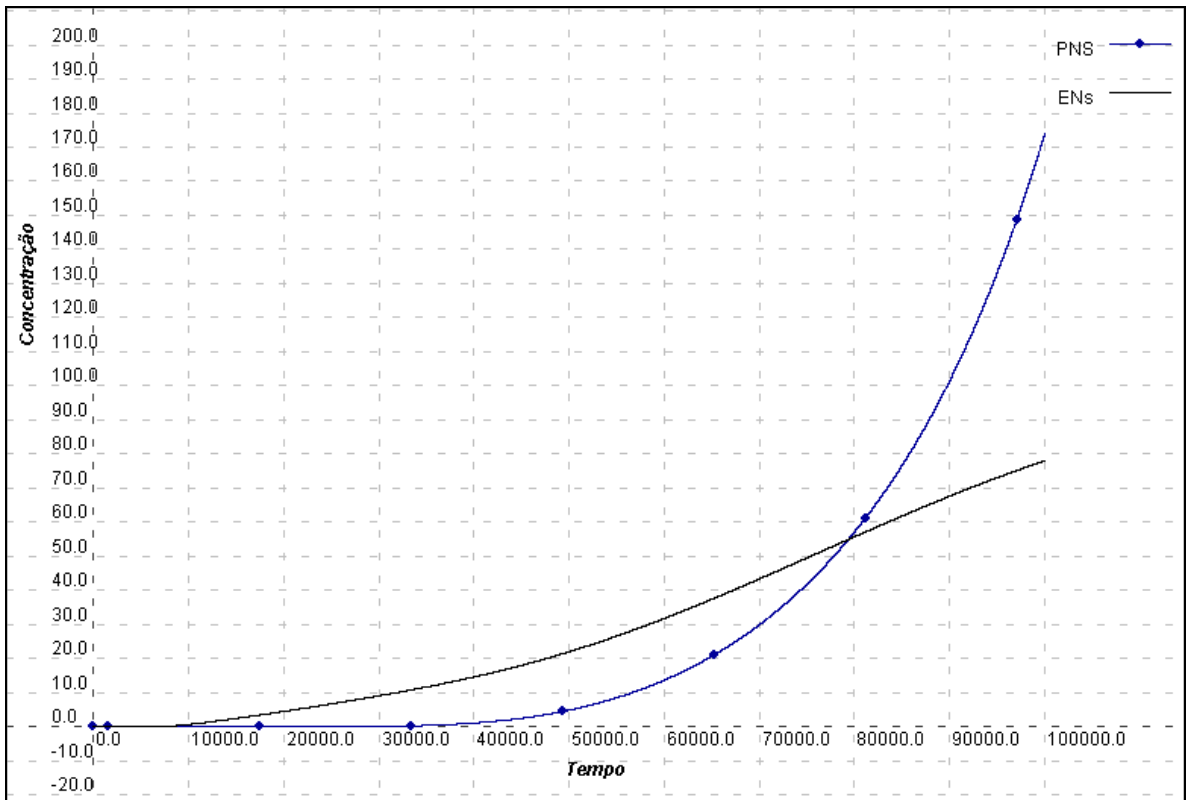


Figura IV.24: Formação de PNS's e EN's, para o ϵ_3 , com 600mg de colesterol diários.

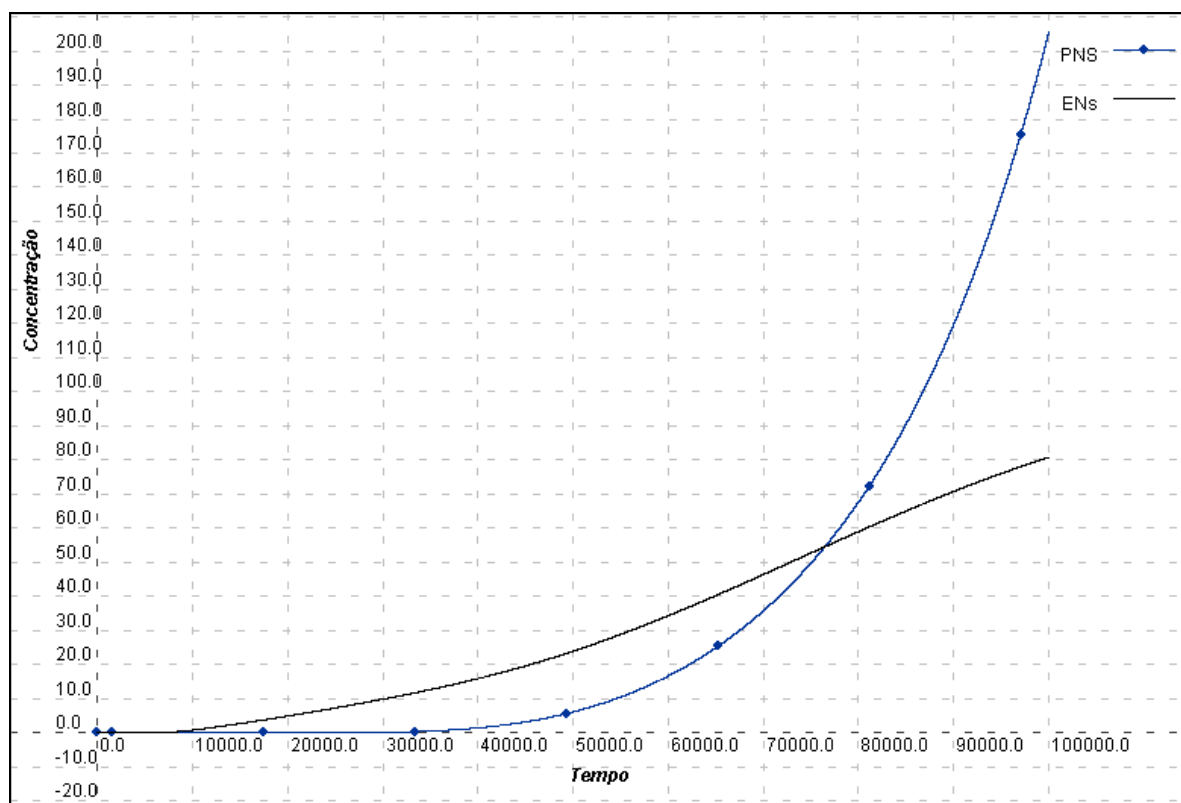


Figura IV.25: Formação de PNS's e EN's, para o ϵ_4 , com 600mg de colesterol diários.

IV.2 - TAXAS DE APOPTOSE

Nas simulações realizadas, concordando com a descrição clínica da doença, percebemos a importância do aspecto temporal da DA, pois os danos vão se acumulando, de forma geométrica, ao longo dos anos. Se, em uma simplificação, imaginarmos que o nível de apoptose tem relação com os índices de prevalência da doença, podemos comparar a curva de evolução da apoptose com a curva de prevalência da DA. Quando realizamos essa comparação com os dados gerados pela simulação, pudemos observar uma semelhança estreita no comportamento de ambas. Na *figura IV.29* (GAO, 1998), nota-se que a prevalência da doença é praticamente nula até a faixa de 60 anos quando, a partir daí, ele se acentua exponencialmente.

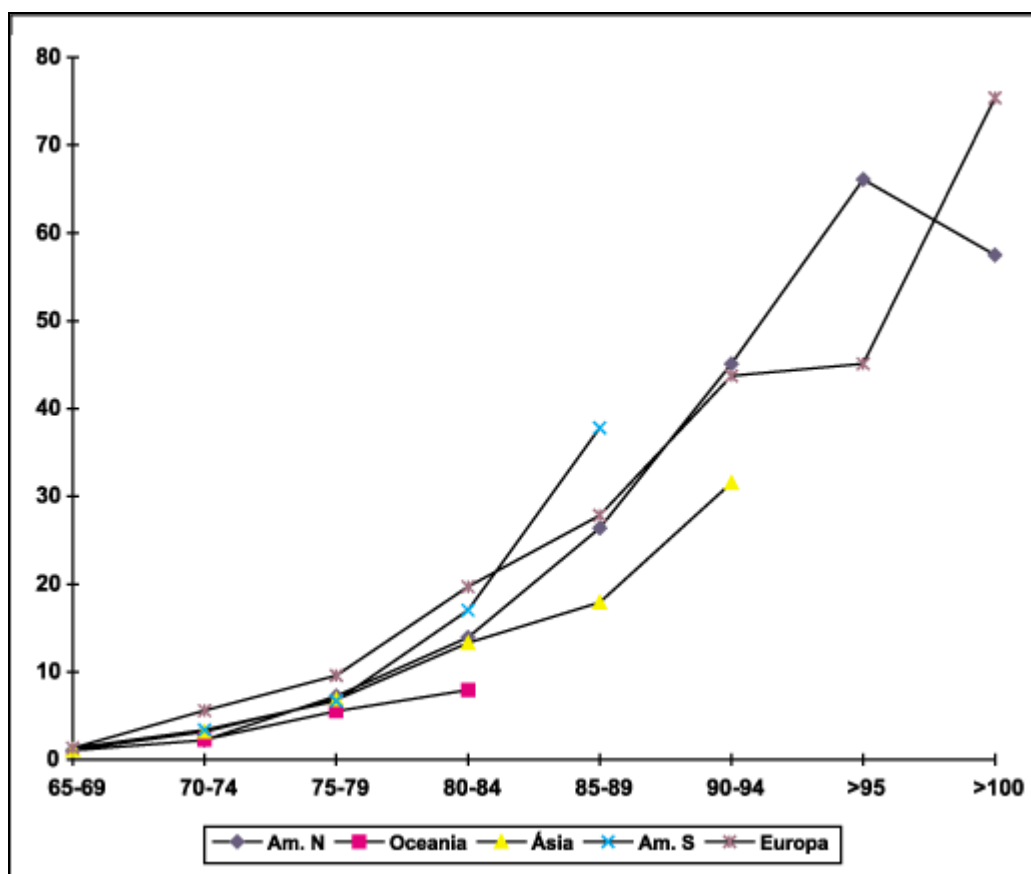


Figura IV.26: Taxas médias de prevalência de demência por região e faixa etária (LOPES, 2002).

Na simulação, notamos, novamente, que a dieta de hipercolesterolemia agrava a taxa de apoptose para todos os alelos da apoE (figuras IV.30 e IV.31).

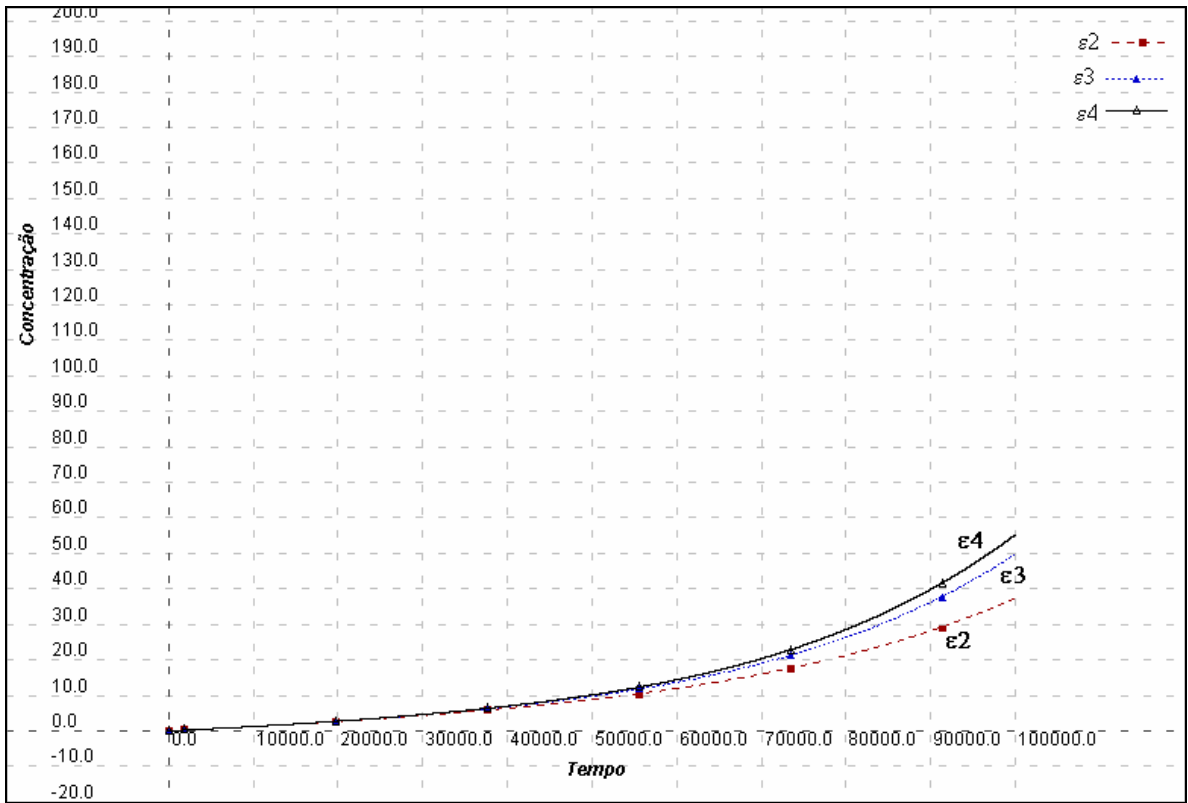


Figura IV.27: Apoptose, para cada alelo da apoE, com colesterol da dieta igual a 300mg diários.

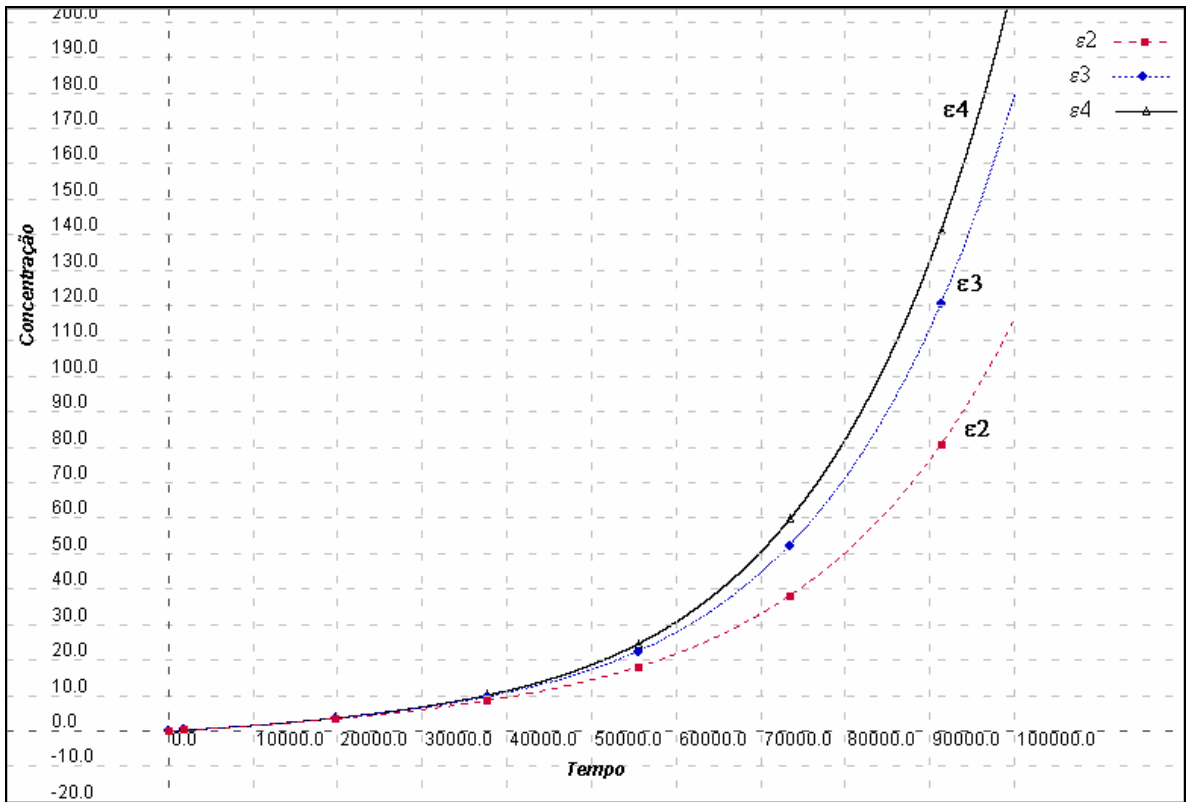


Figura IV.28: Apoptose, para cada alelo da apoE, com colesterol da dieta igual a 300mg diários.

O nível de apoptose encontrado na simulação, para os dois tipos de dieta estudados e os diferentes alelos da apoE, foram tabelados por faixa etária (*tabela IV.6*). Os valores médios de apoptose, para cada alelo, foram calculados e plotados na *figura IV.32*.

Tabela IV.6: Comparações entre as taxas de apoptose entre as dietas normal e de hipercolesterolemia.

idade	Colesterol da dieta = 300mg				Colesterol da dieta = 600mg			
	E2	E3	E4	médias	E2	E3	E4	Médias
10	1,1204	1,1332	1,1365	1,1300	1,3538	1,3817	1,3892	1,3749
20	2,6744	2,7521	2,777	2,7345	3,4556	3,6461	3,7109	3,6042
30	4,6188	4,8637	4,957	4,8132	6,3481	6,9581	7,2017	6,8360
40	7,0564	7,6395	7,884	7,5266	10,3622	11,8567	12,5249	11,5813
50	10,174	11,3984	11,9439	11,1721	16,1606	19,434	21,01	18,8682
60	14,2719	16,6477	17,7226	16,2141	24,8191	31,4358	34,7487	30,3345
70	19,7702	24,0851	26,1025	23,3193	37,8631	50,3367	56,693	48,2976
80	27,2138	34,6046	38,0688	33,2957	57,385	79,6284	91,0428	76,0187
90	37,2914	49,3361	54,9631	47,1969	86,3616	124,4847	144,1103	118,3189
100	50,8674	69,7253	78,4916	66,3614	129,24	192,9626	225,9084	182,7037

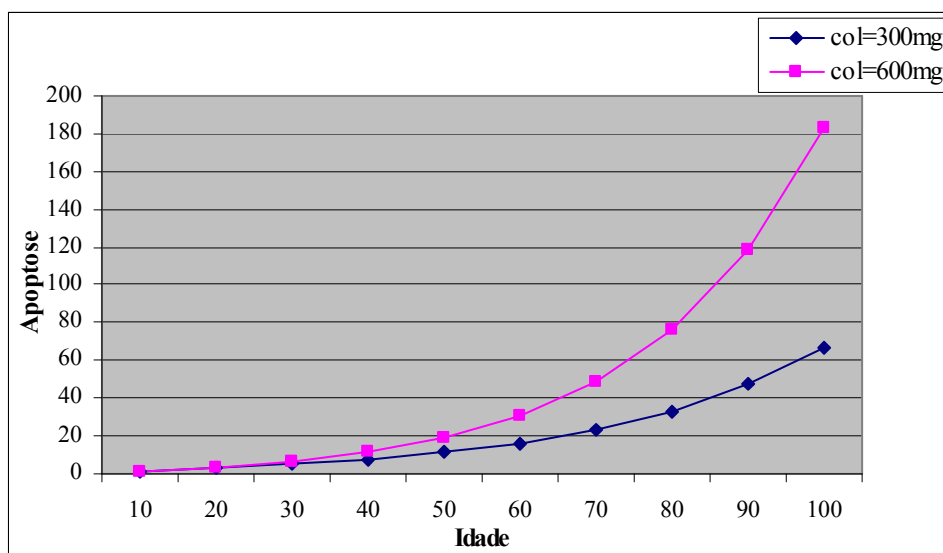


Figura IV.29: Média das taxas de apoptose dos diferentes alelos do apoE.

Adicionamos ao gráfico anterior as taxas de prevalência do trabalho de LOPES (2002) e obtivemos o gráfico da *figura IV.33*. Mais uma vez, percebe-se que os resultados do modelo obedecem ao comportamento registrado nos trabalhos consultados.

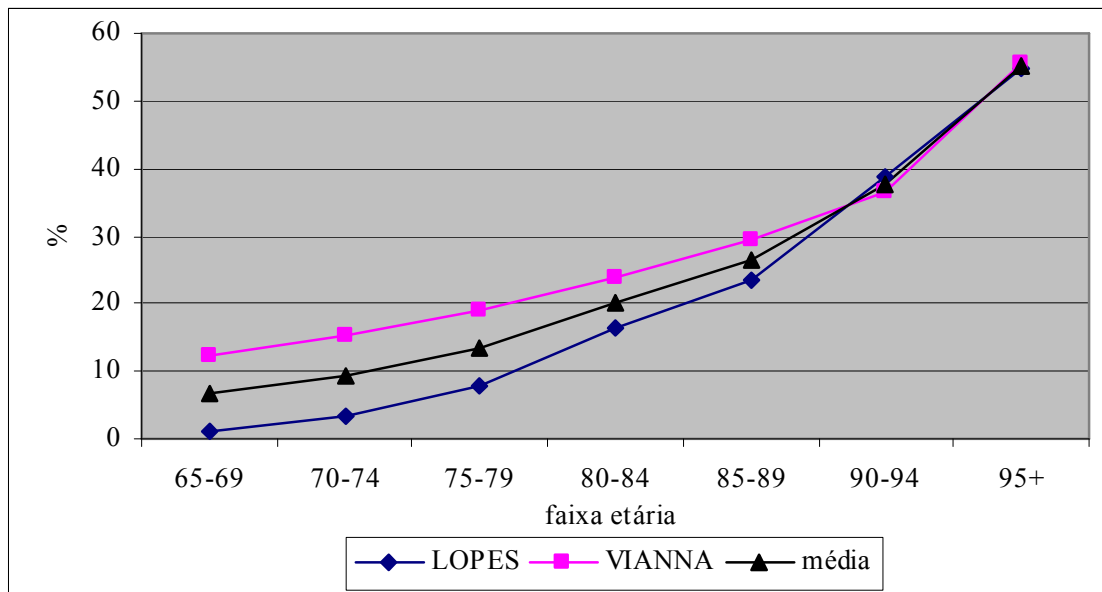


Figura IV.30: Média entre as taxas de incidência de demência e a taxa de apoptose para o alelo $\epsilon 4$.

IV.3 - EXPERIMENTOS DE TESTE DE HIPÓTESES

IV.3.1 - A influência da configuração das MPS no desenvolvimento das alterações histopatológicas da DA

O aumento do teor de colesterol da MPS, que irá modificar a composição de seus DL's pode ser um fator patofisiológico de outras doenças além da DA, como: alcoolismo, doença de Tangier e doença de Niemann-Pick, entre outras (WOOD, 2002).

Testamos o que ocorreria se a proporção do colesterol entre as folhas da membrana não se alterasse, mesmo com o aumento do teor de colesterol da MPS. Os resultados encontrados⁵²

⁵² Será mostrado apenas o comportamento do sistema para a herança do alelo $\epsilon 4$, com dieta de hipercolesterolemia, já que esse é o pior caso.

estão na *figura IV.21* e, quando comparados ao comportamento normal do sistema (*figura IV.22*), mostram que a evolução da doença seria muito mais lenta. A explicação para tal fenômeno é que, sem um aumento exagerado do colesterol nas FE's, ocorre redução na produção do $A\beta$ e, conseqüentemente, das alterações histopatológicas da DA.

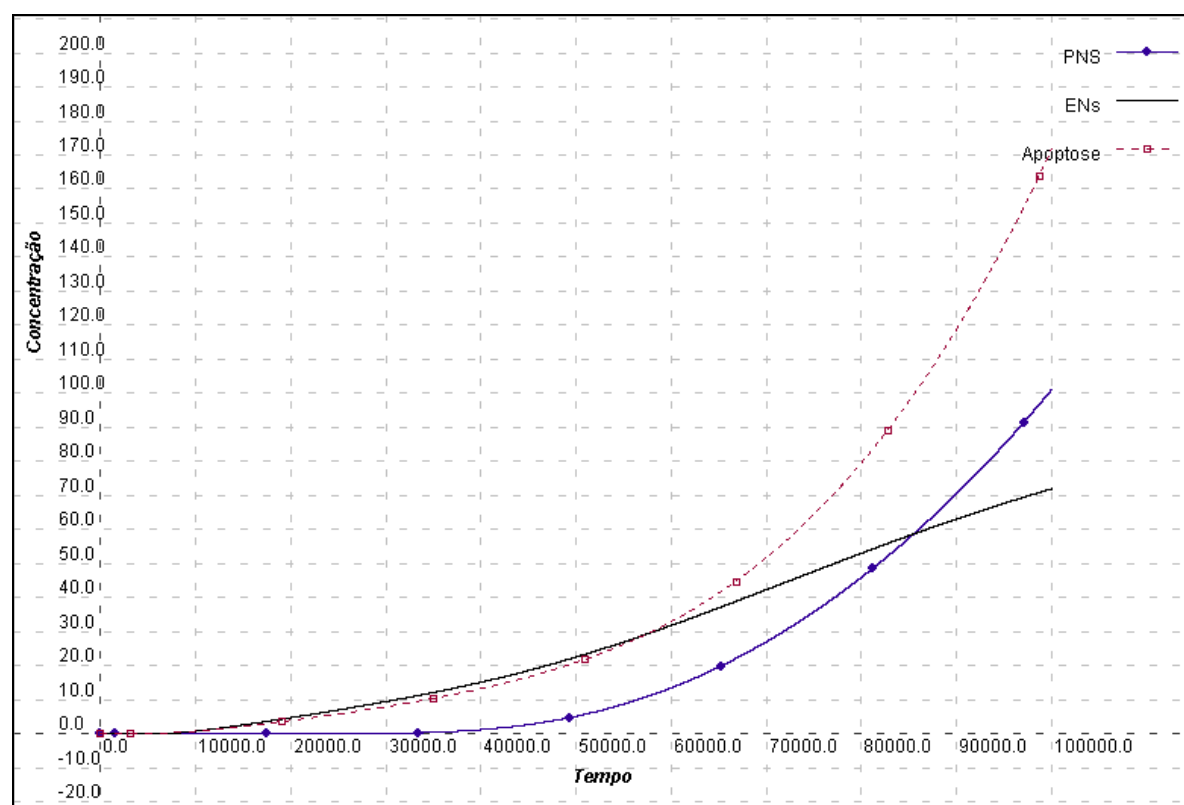


Figura IV.31: Alterações histopatológicas, para o $\epsilon 4$, com 600mg de colesterol e sem alterações na MPS.

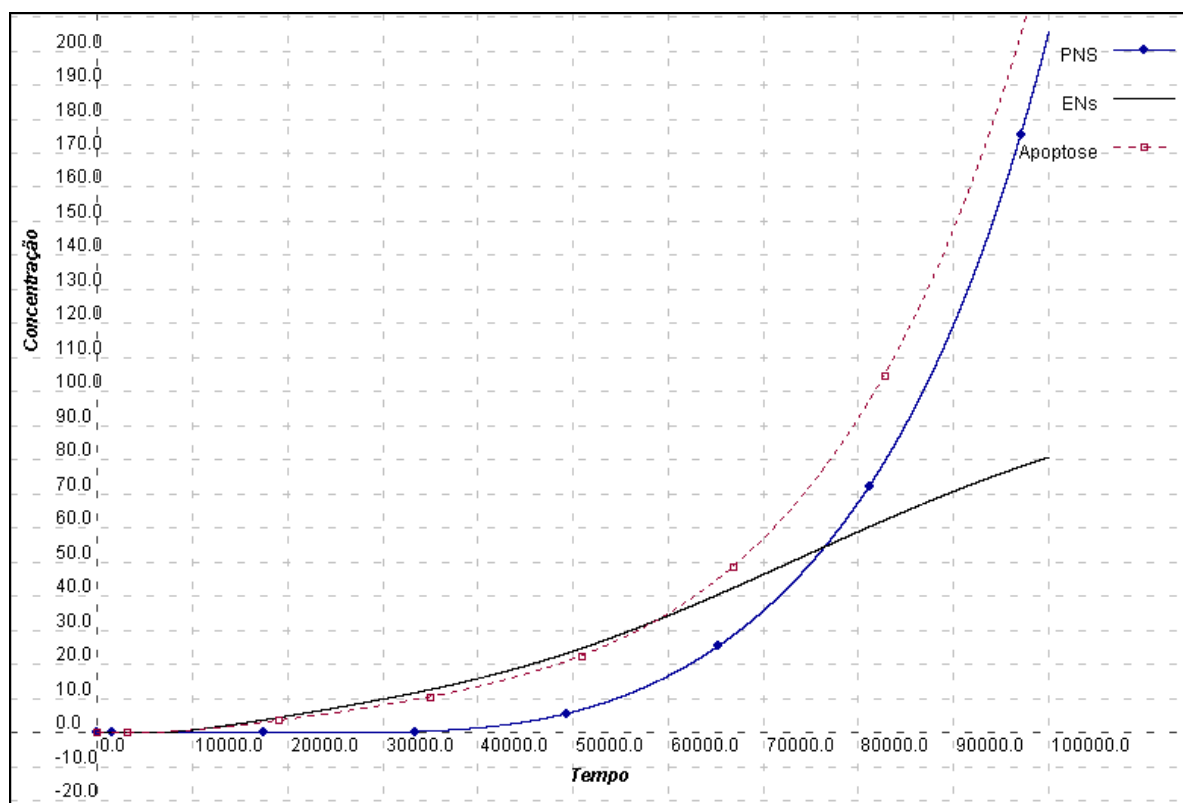


Figura IV.32: Alterações para o $\epsilon 4$, com 600mg de colesterol e alterações na MPS.

Outro teste realizado foi a suspensão do processamento da PPA, impedindo a geração do $A\beta$ solúvel. Com essa inibição foi possível notar que, mesmo permitindo novamente que a alteração do colesterol entre as folhas ocorresse, o mesmo não acontecia (*figura IV.23*).

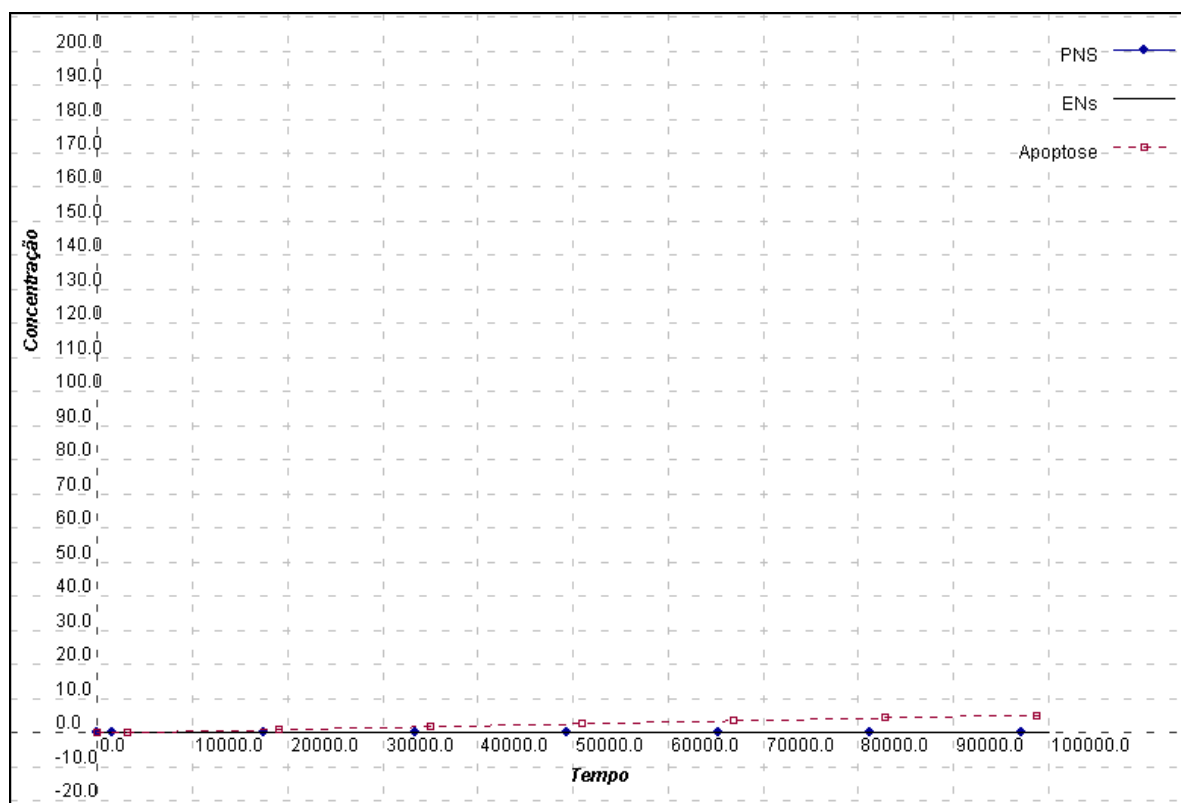


Figura IV.33: Alterações histopatológicas, para o $\epsilon 4$, com 600mg de colesterol e sem geração de $A\beta$.

IV.3.2 - Inflamação

É nas células gliais que ocorre a síntese tanto da PPA, quanto da apoE. Por outro lado, a glia é ativada pelo $A\beta$, sendo um componente importante das PNS's (EGENSPERGER, 1998). Logo, se a apoE é sintetizada pela glia, podemos supor que a sua ativação, acionada pelo $A\beta$, cessaria ou diminuiria a síntese da apoE.

Existem alguns *feedbacks* positivos no sistema que podem agravar a patologia da DA. Um exemplo é o que ocorre entre $A\beta$ e PNS's e o estresse oxidativo. Sabemos que o $A\beta$ e as PNS's iniciam um processo inflamatório no cérebro. Por outro lado, a inflamação agrava o desenvolvimento da DA e a ação dos radicais livres ocorre tanto na formação de PNS's, quanto na de EN's (EGENSPERGER, 1998).

Em outro teste realizado neste trabalho, inibimos a ocorrência de inflamação, através da remoção da conexão com o sistema do Metabolismo do Estresse Oxidativo (REIS, 2005). Notamos então uma redução acentuada no desenvolvimento das alterações histopatológicas, para dietas de 600mg de colesterol diário e alelo $\epsilon 4$, como podemos observar nas *figuras IV.24 e IV.25*.

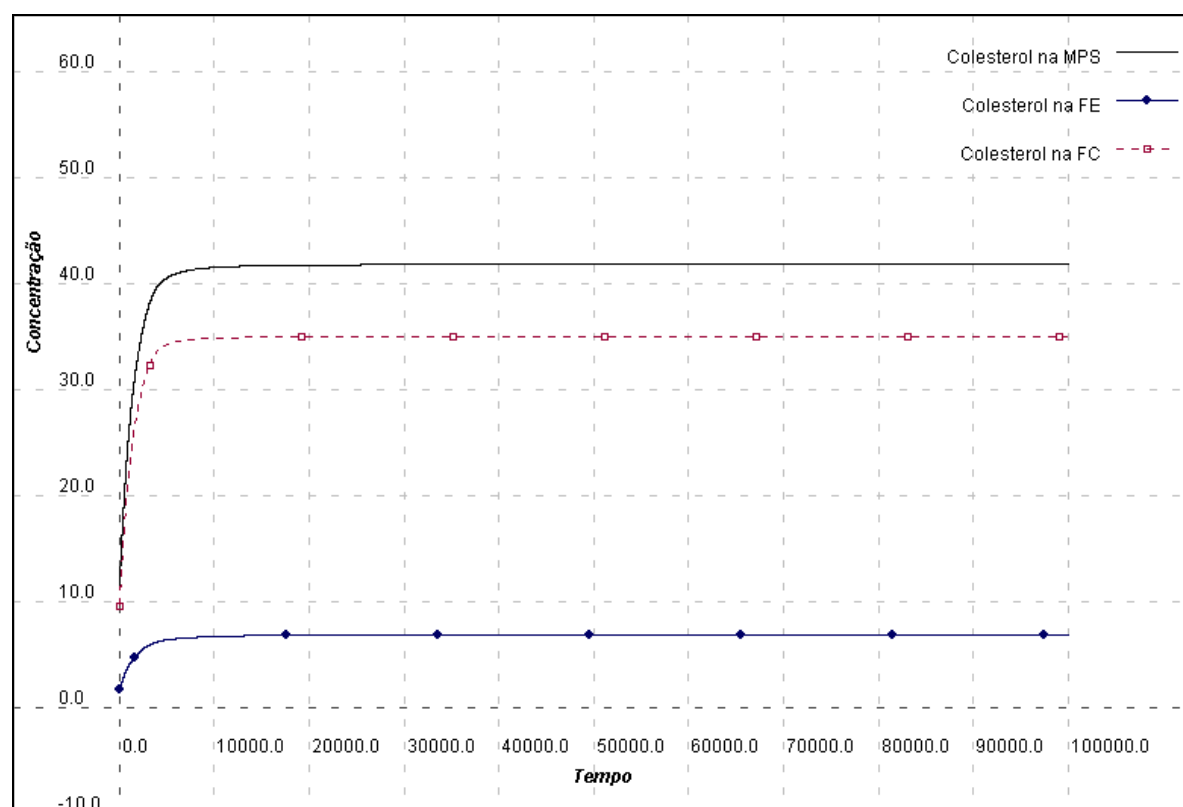


Figura IV.34: Alterações no colesterol da MPS, para o $\epsilon 4$, com 600mg de colesterol, sem inflamação.

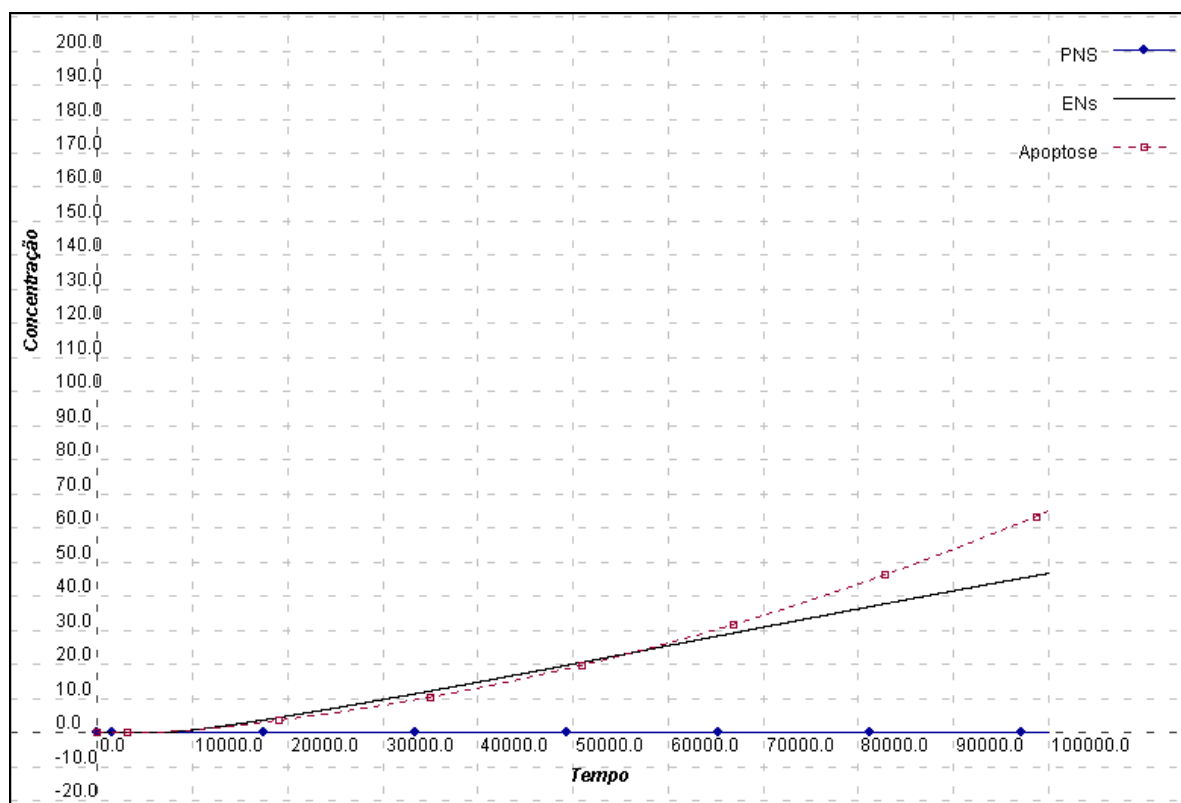


Figura IV.35: Alterações histopatológicas, para o $\epsilon 4$, com 600mg de colesterol e sem inflamação.

IV.3.3 - A influência de alterações da dieta no desenvolvimento da DA

Estudos realizados anteriormente evidenciaram a existência de uma correlação positiva entre a ocorrência de taxas altas de colesterol no plasma, em algum estágio da vida, e o desenvolvimento da DA (KUO, 1998). Para testar o comportamento do modelo desenvolvido em situações desse tipo, realizamos algumas simulações onde ocorria aumento do colesterol em alguma fase da vida. Esperava-se era obter um agravamento do processo degenerativo normal, que ocorre com dietas de baixo teor de colesterol. De fato, a simulação obteve respostas coerentes a essa afirmação.

Nas figuras IV.34 e IV.35, podemos comparar o comportamento do sistema para dietas de 300mg de colesterol, na presença de cada alelo da apoE, com o comportamento do sistema quando aumentamos esse teor de colesterol para 600mg diários, dos 30 aos 50 anos. Após

essa idade, o colesterol da dieta volta aos níveis ideais. As mesmas comparações foram realizadas para os alelos $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$, como é possível verificar nas *figuras IV.36 a IV.39*.

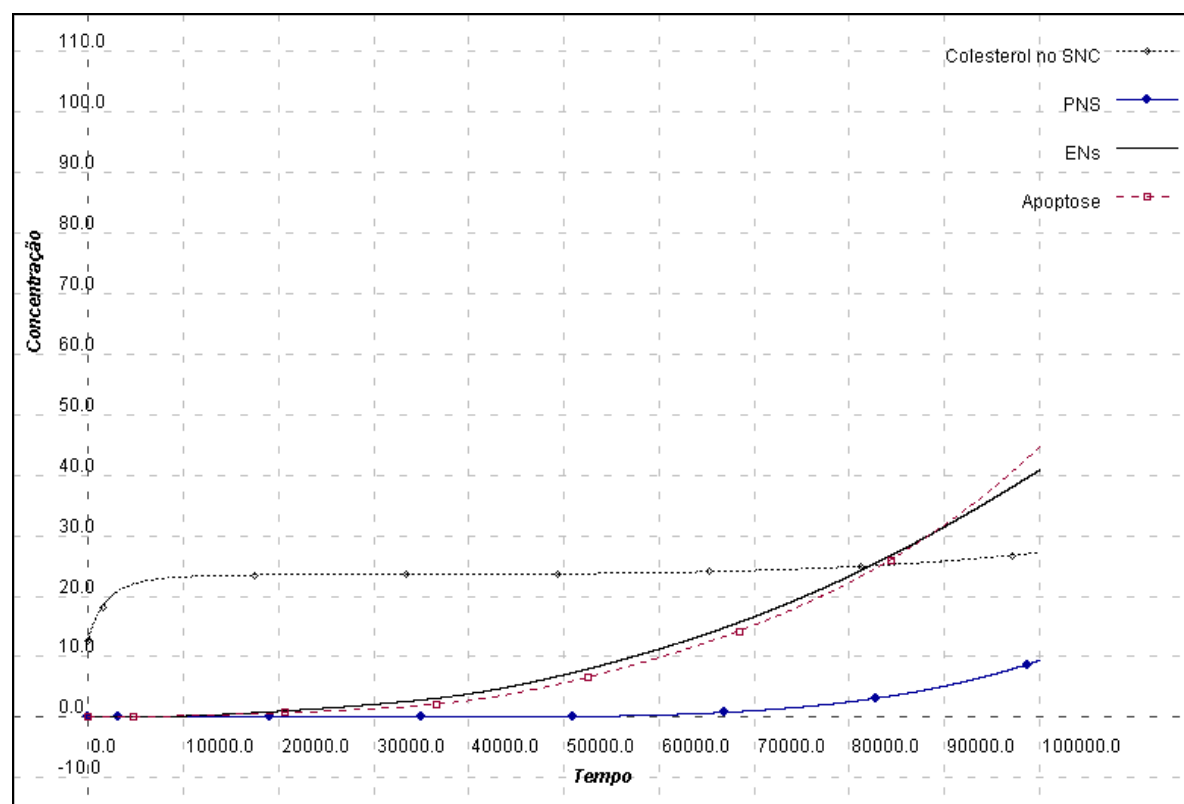


Figura IV.36: Alterações histopatológicas para o alelo $\epsilon 2$, na dieta de 300mg diários por toda a vida.

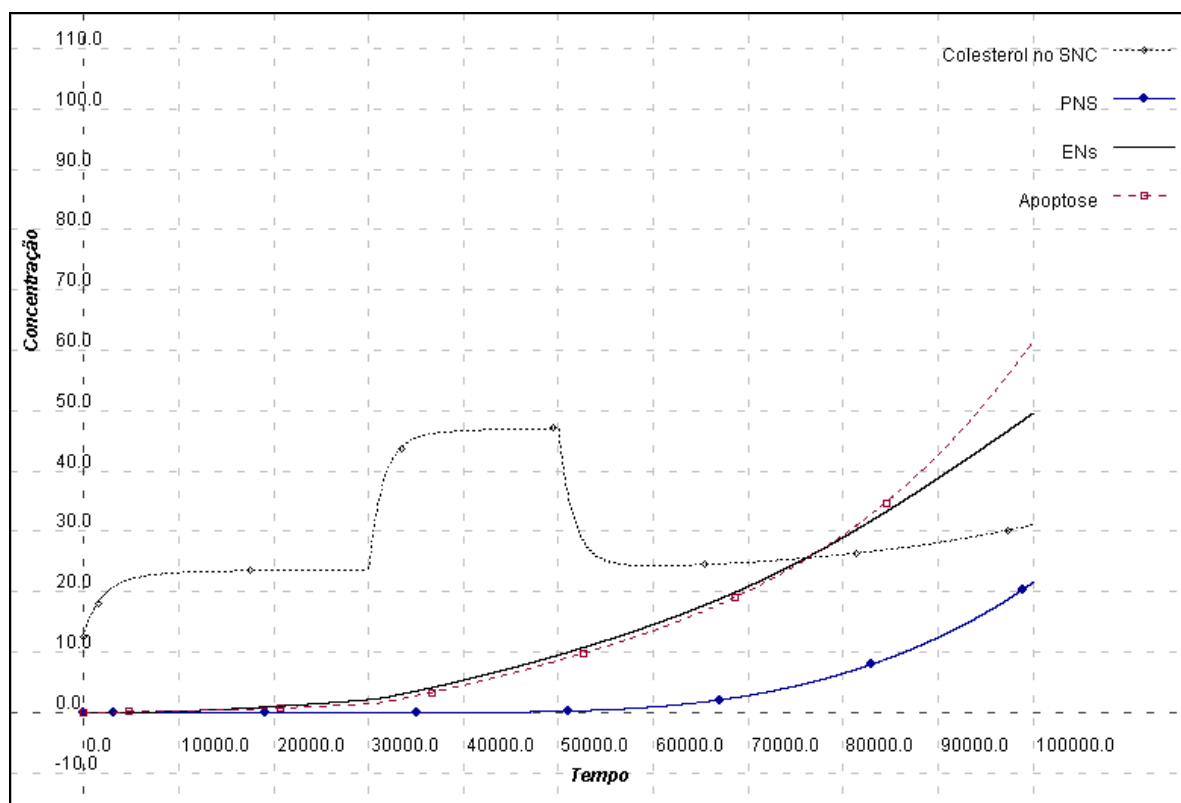


Figura IV.37: Alterações histopatológicas, com o ϵ_2 e 300mg de colesterol diários, acrescidos de 300mg dos 30 aos 50 anos.

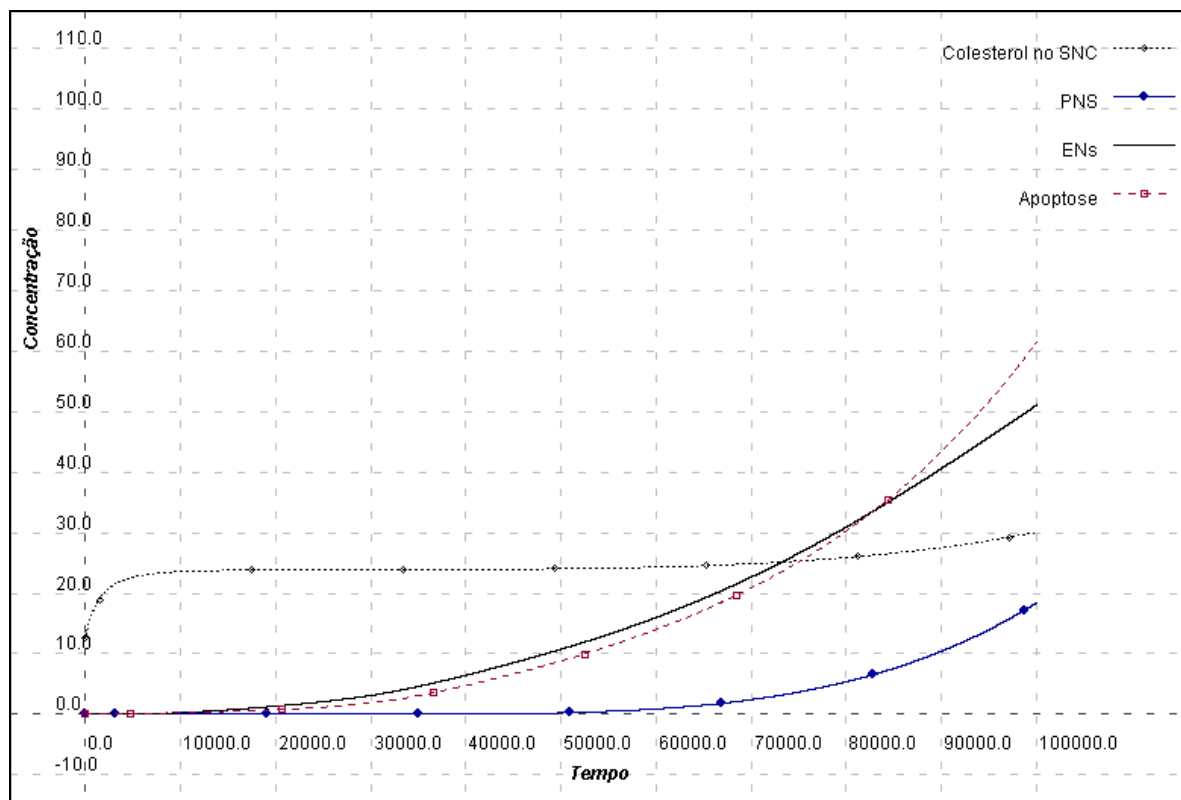


Figura IV.38: Alterações histopatológicas para o alelo ϵ_3 , na dieta de 300mg diários por toda a vida.

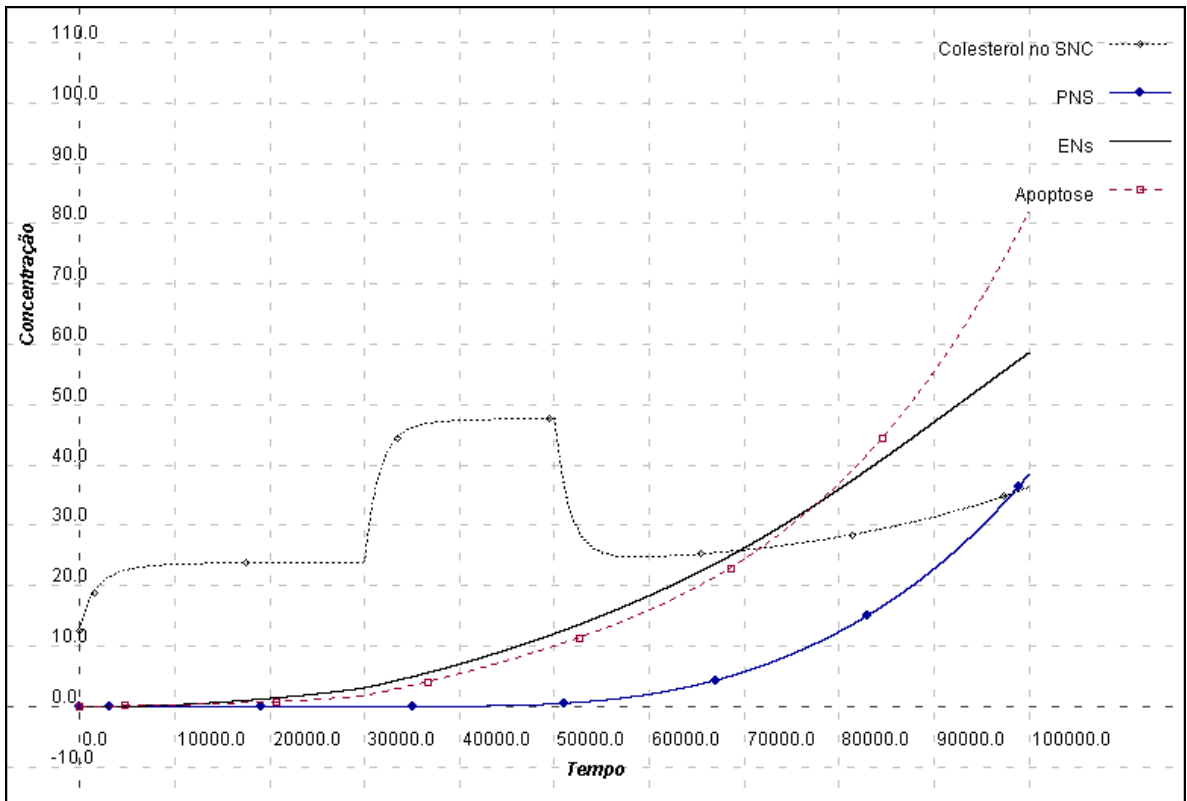


Figura IV.39: Alterações histopatológicas, com o ϵ_3 e 300mg de colesterol diários, acrescidos de 300mg dos 30 aos 50 anos.

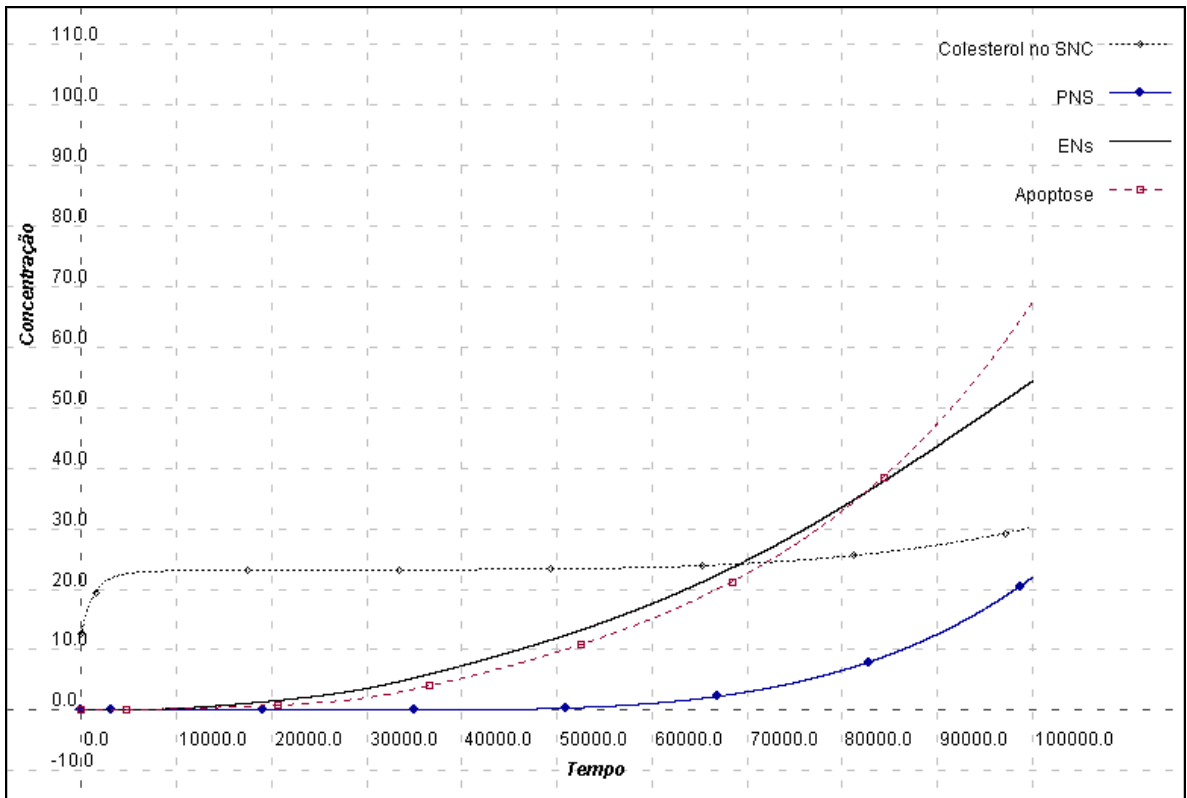


Figura IV.40: Alterações histopatológicas para o alelo ϵ_4 , na dieta de 300mg diários por toda a vida.

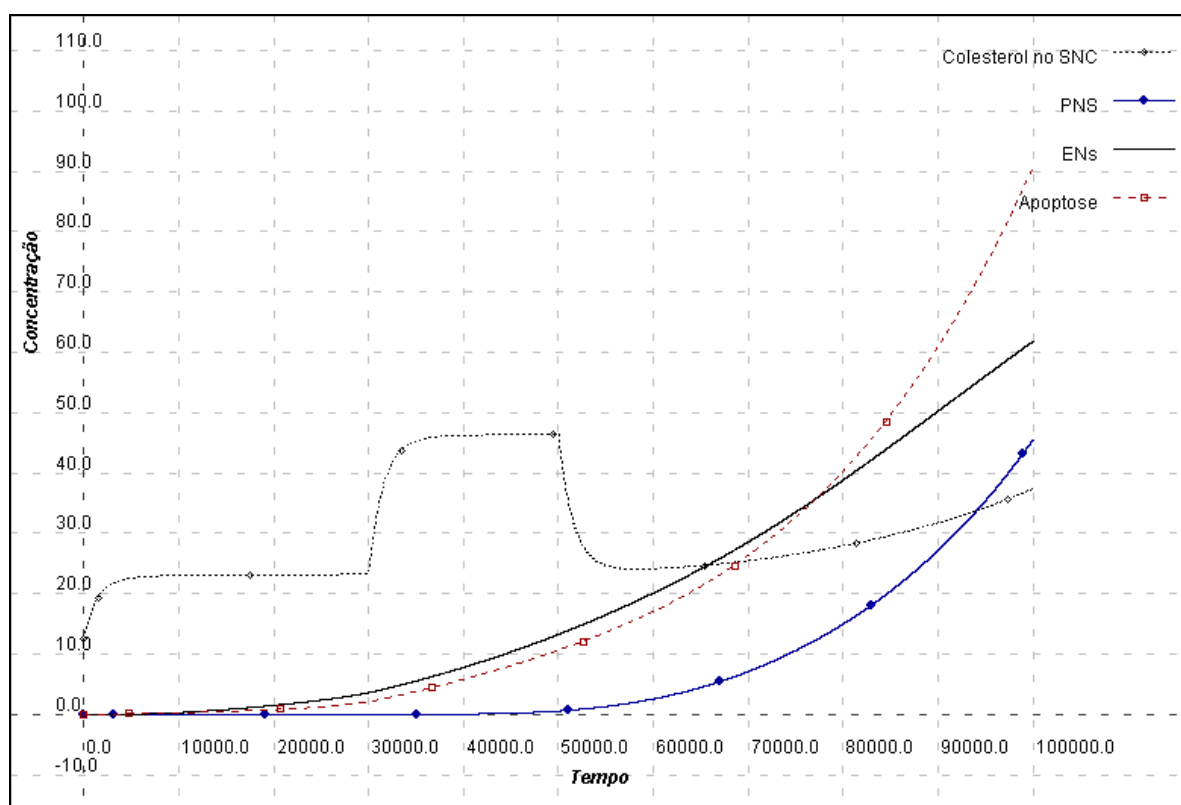


Figura IV.41: Alterações histopatológicas, com o $\epsilon 4$ e 300mg de colesterol diários, acrescidos de 300mg dos 30 aos 50 anos.

Outra simulação realizada comparou as diferenças que ocorrem quando se é submetido uma dieta de alto teor de colesterol durante toda a vida, em contraste com a redução desses valores a partir dos 50 anos. Os resultados, mostrados nas figuras a seguir, indicam que, apesar dos efeitos nocivos do excesso de colesterol serem irreversíveis, ainda é possível conseguir alguma redução na velocidade da progressão da doença, quando se controla a ingestão de colesterol a partir dos 50 anos.

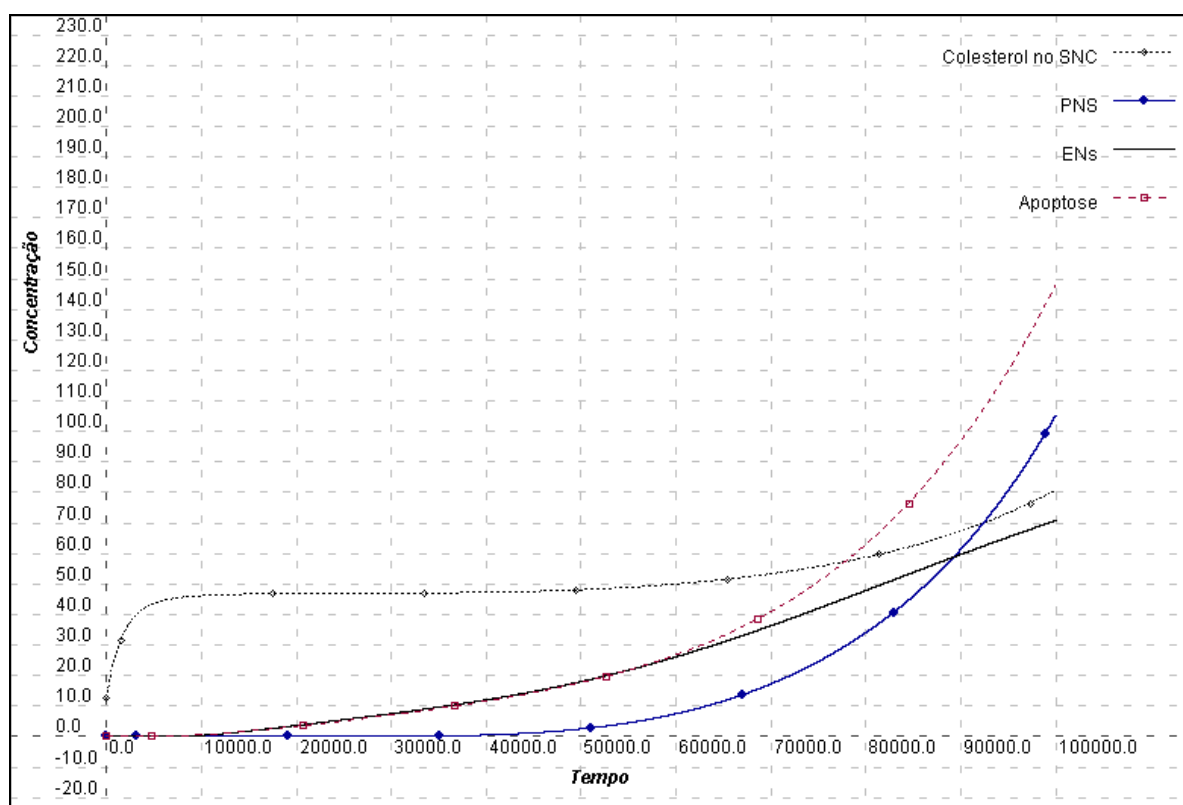


Figura IV.42: Alterações histopatológicas para o alelo $\epsilon 2$, na dieta de 600mg diários, durante toda a vida.

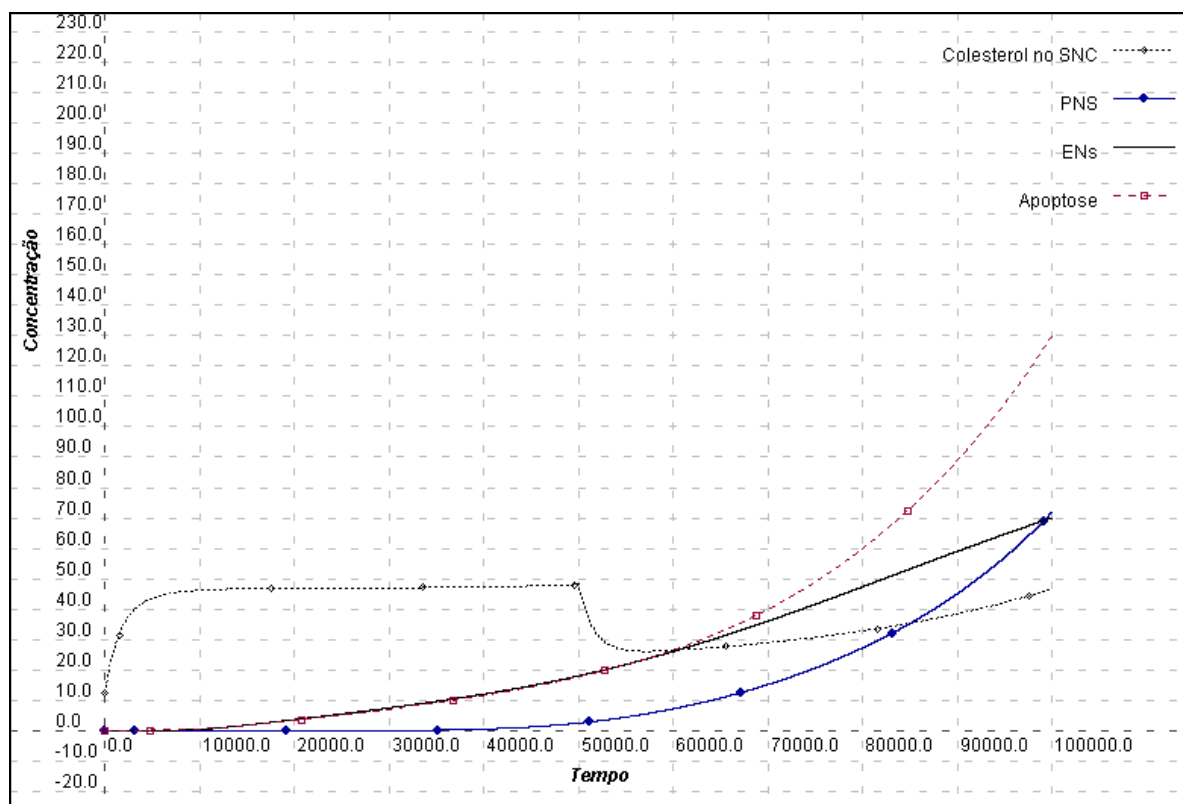


Figura IV.43: Alterações histopatológicas com o alelo $\epsilon 2$ e 600mg diários de colesterol, com redução de 300mg a partir dos 50 anos.

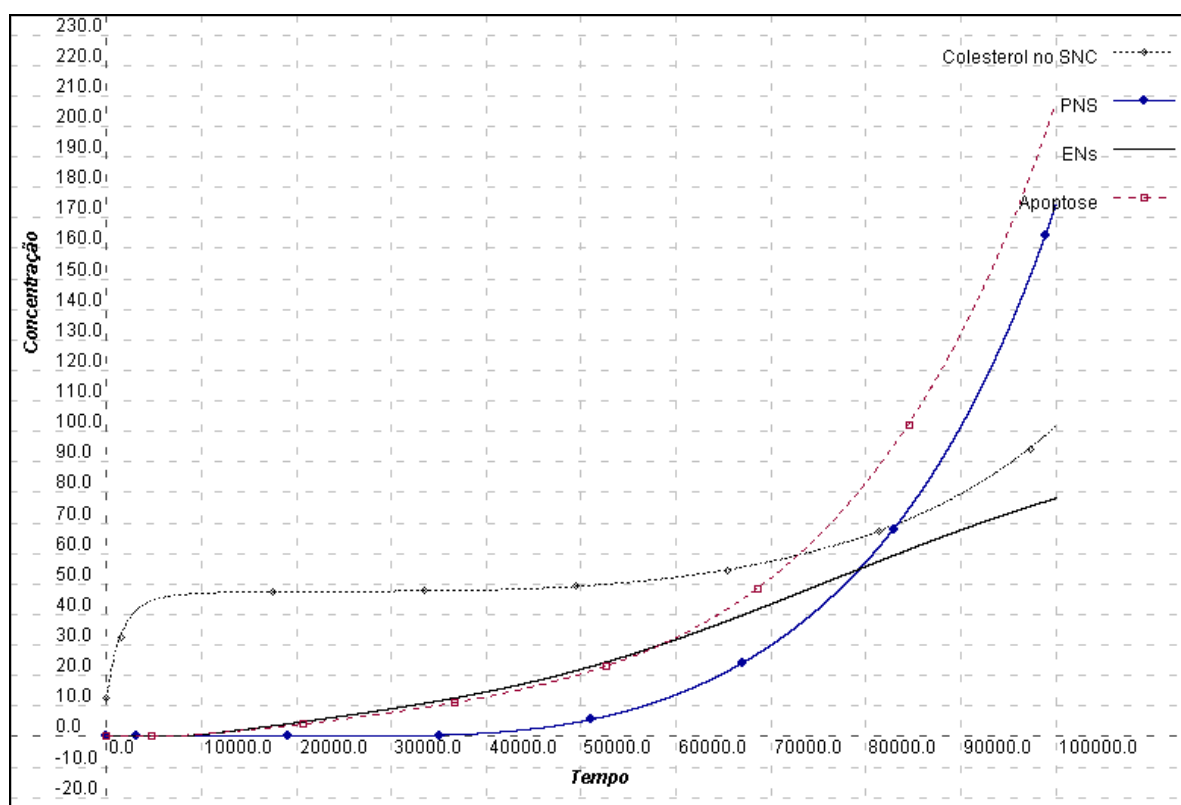


Figura IV.44: Alterações histopatológicas para o alelo $\epsilon 3$, na dieta de 600mg diários, durante toda a vida.

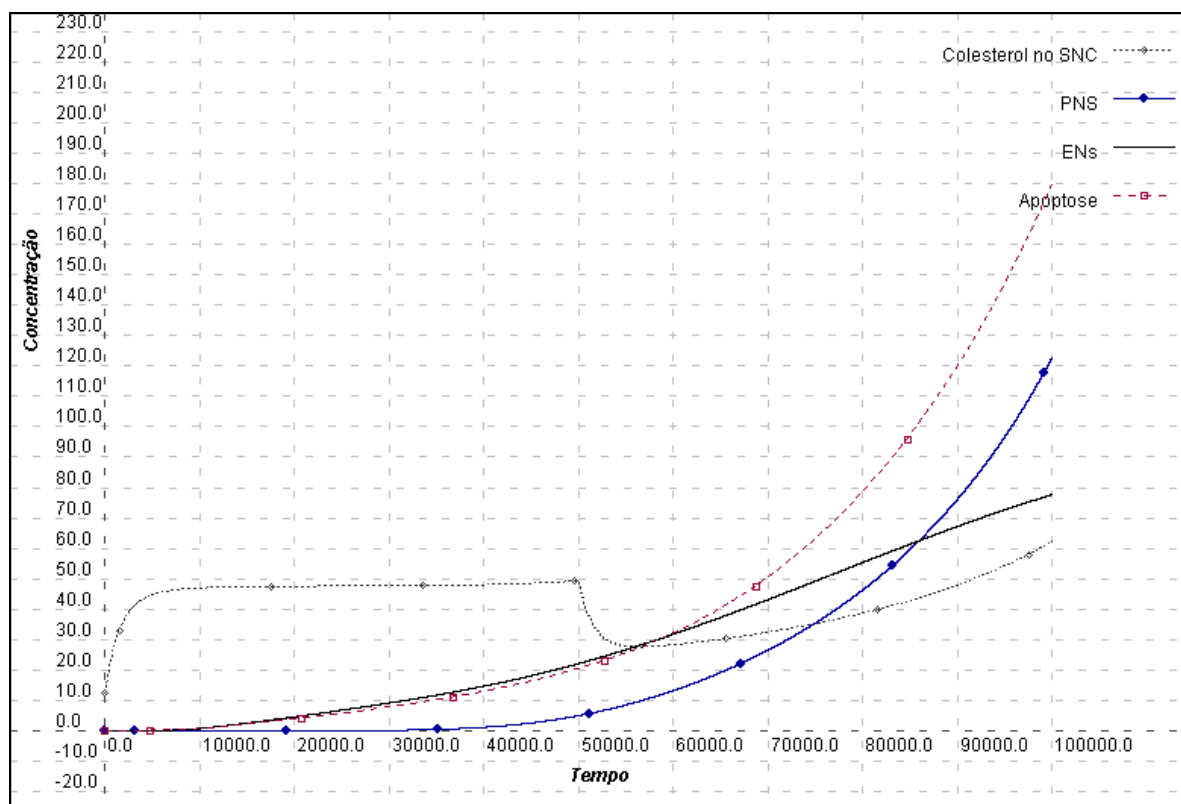


Figura IV.45: Alterações histopatológicas com o alelo $\epsilon 3$ e 600mg diários de colesterol, com redução de 300mg a partir dos 50 anos.

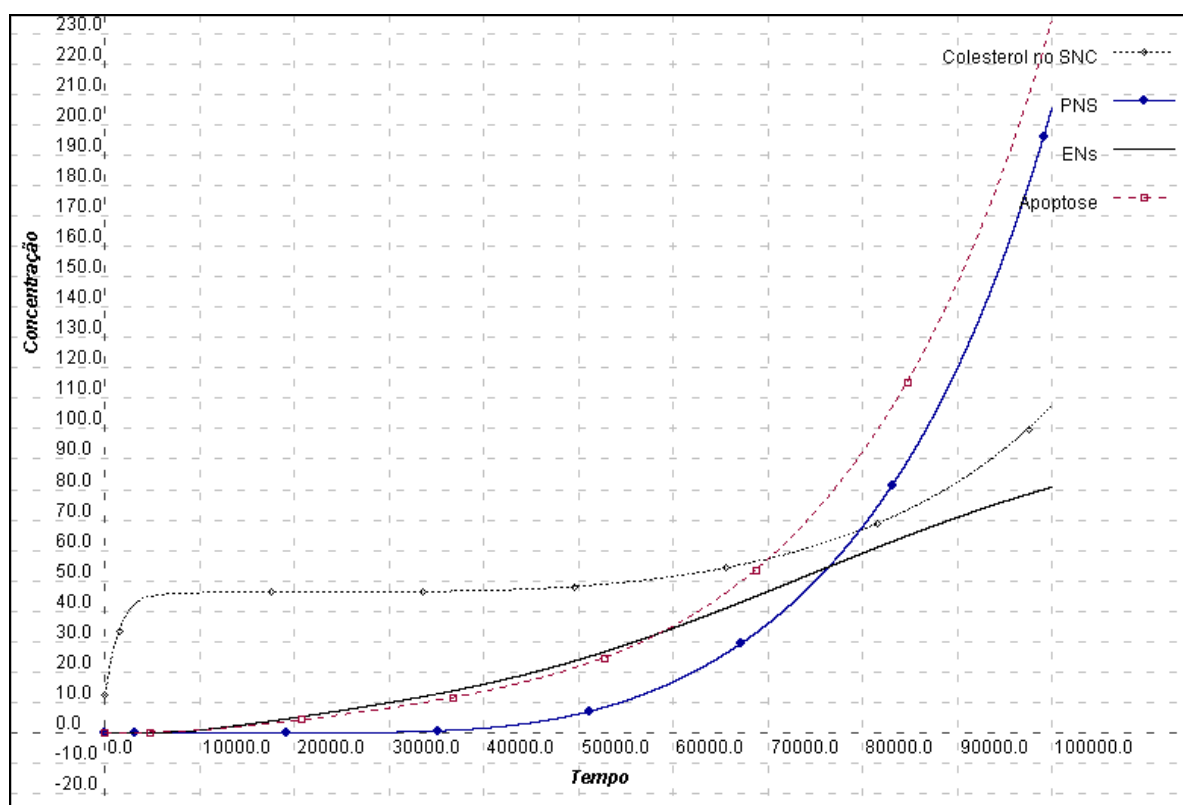


Figura IV.46: Alterações histopatológicas para o alelo $\epsilon 4$, na dieta de 600mg diários, durante toda a vida.

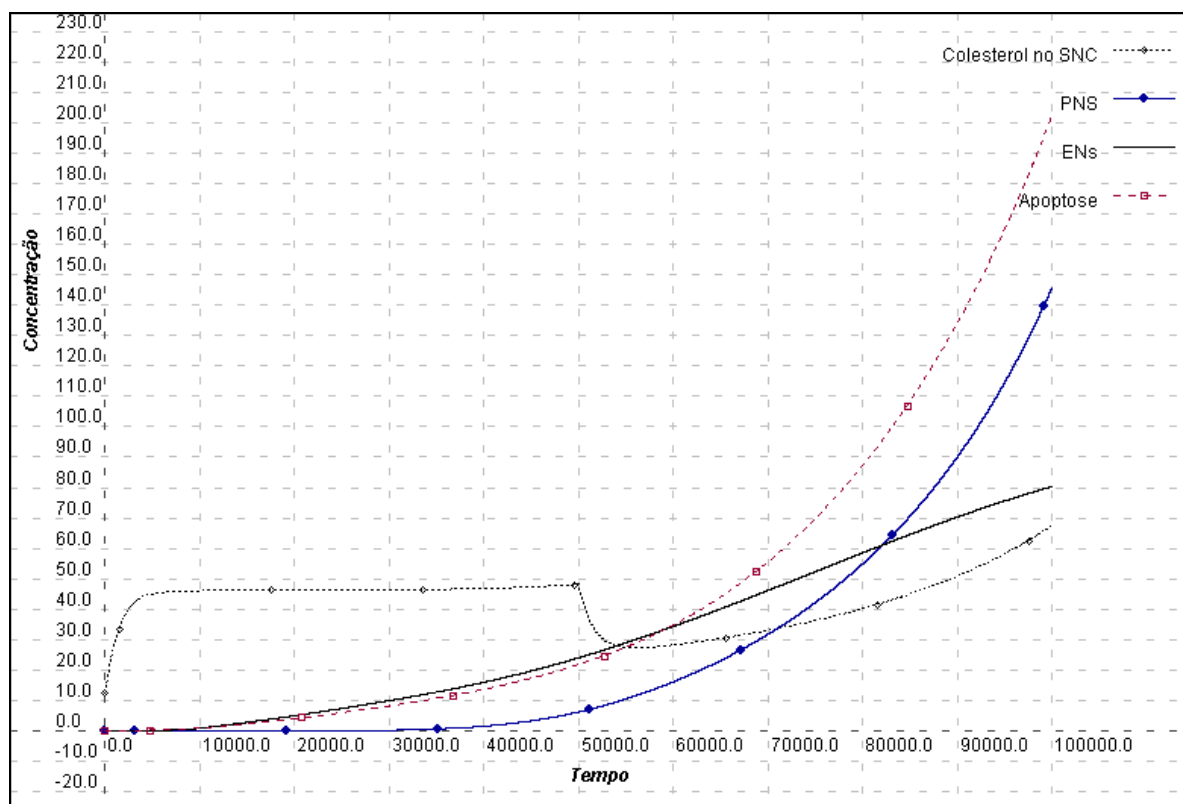


Figura IV.47: Alterações histopatológicas com o alelo $\epsilon 4$ e 600mg diários de colesterol, com redução de 300mg a partir dos 50 anos.

IV.4 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

EDELSTEIN-KESHET, 2002, em um trabalho sobre a influência do estresse oxidativo na DA, afirma que, quando a fibrilação do A β ocorre de forma rápida, a morte neuronal também é rápida. Em um evento ocorrendo dessa forma, a fonte de A β seria eliminada, favorecendo o não espalhamento das placas e danos. Assim, se aumentássemos a toxicidade do A β fibrilar, a doença seria controlada. Como essa toxicidade se deve à formação dos canais de cálcio pelo A β fibrilar, o teste dessa hipótese requer uma simulação onde seja possível identificar os neurônios afetados pelo aumento na formação de canais. Mas, para avaliar a afirmação anterior, seria necessário acrescentar um contador de neurônios, que precisaria ser atualizado, além da identificação de cada neurônio em particular. Em uma continuação desse trabalho, os neurônios poderiam ser identificados e, dessa maneira, a fonte de A β também. Essa identificação possibilitaria a eliminação exata dos neurônios que sofreram apoptose. Também poderíamos incluir dados dimensionais no modelo, para que pudessemos estudar a evolução espacial da doença.

Outra sugestão é redimensionar as variáveis do sistema para que as mesmas possam refletir, também quantitativamente, os processos da DA. Para tal, seria interessante agregar pesquisadores das áreas de biologia para que o sistema pudesse ser validado e aproveitado. Além disso, esperamos que, uma vez que o modelo produza dados quantitativos fiéis a realidade, essa simulação seja atualizada e alterada sempre que novos valores experimentais forem encontrados. Desta forma, seu poder representativo será melhorado constantemente.

IV.5 - CONCLUSÕES

Durante o processo de definição de modelagem dos processos da doença, optou-se por modelar explicitar apenas as partes chave da mesma, enquanto alguns detalhes químicos e genéticos foram ignorados. De fato, essa omissão traz a perda de alguns detalhes dinâmicos da doença. Porém, mesmo nesse sistema simplificado, o conjunto de parâmetros encontrado foi muito grande e seu ajuste uma tarefa árdua e por vezes monótona. Somando-se a isso, o cálculo de algumas concentrações dependia de um balanço entre efeitos competidores, tanto

de produção quanto de remoção de substâncias. Essas características, porém, não são exclusivas do sistema biológico modelado nesta tese e, por essas razões, a configuração de um conjunto de valores para os parâmetros biológicos é o primeiro grande desafio de modelagens *in silico* e costuma levar ao ceticismo sobre a validade dos resultados encontrados.

A natureza qualitativa de nossos resultados pode ser considerada robusta, uma vez que suportam várias observações experimentais *in vivo* ou *in vitro*, como demonstrado no capítulo anterior. Esse resultado foi alcançado mesmo não tendo sido possível obter valores reais e precisos de muitos parâmetros.

Os resultados, tanto da simulação, quanto dos artigos pesquisados, nos levaram a conclusão de que, apesar da resistência do cérebro às alterações da composição lipídica da dieta, o consumo crônico de colesterol pode alterar o funcionamento de certas proteínas cerebrais e mesmo a estrutura dos neurônios. Isso ocorre já que o colesterol altera a composição e certas propriedades da membrana neuronal.

Uma consequência dessas alterações é o aumento da produção e da agregação do A β , ao mesmo tempo em que se observa uma redução da sua taxa de degradação. Esses fatores irão contribuir para o aumento da formação tóxica do A β , favorecendo o surgimento das PNS's, o que irá gerar radicais livres, aumentando o estresse oxidativo. Esse último, por sua vez, oxidará a MPS, gerando um feedback positivo sobre a produção de A β . Finalmente, o estresse oxidativo e o A β insolúvel irão acionar a fosforização da proteína Tau e, como consequência, a estrutura neuronal se desestabilizará, gerando os EN's.

A inflamação também possui um papel fundamental no processo de desenvolvimento da DA. Corroborando essa afirmação, ao inibirmos a produção de radicais livres, observou-se que a velocidade de evolução da doença foi reduzida drasticamente. O desenvolvimento do trabalho de pesquisa de mestrado desenvolvido por REIS (2005), em paralelo ao desenvolvimento desta tese, foi essencial para que simulações sobre hipóteses importantes sobre o processo de evolução da doença pudessem ser realizadas.

A escolha da hipótese do colesterol para a criação do modelo de simulação da DA se mostrou acertada. A título de ilustração de seu potencial, podemos citar o fato de que as estatinas, que vêm a ser drogas redutoras do colesterol no plasma, estão sendo cada vez mais utilizadas no tratamento da DA. Mais ainda, pesquisas sobre a ação das estatinas no tratamento da DA estão sendo financiadas atualmente pelo laboratório Pfizer, pelo Institute for the Study of Aging (ISOA, NY) e pelo National Institute of Health (NIH, MD) e, provavelmente, outras indústrias farmacêuticas também o farão.

Como contribuição principal do trabalho, podemos dizer que o modelo construído facilita a compreensão de diversos aspectos do comportamento dinâmico de um sistema biológico complexo, em que muitos pormenores permanecem desconhecidos. Esperamos que o mesmo venha a ser utilizado por quem busque uma melhor compreensão da doença e que sirva de base para um intercâmbio entre pesquisadores de áreas diversas. Quando isso ocorrer o sistema poderá ser ajustado de maneira mais fina, possibilitando sua utilização em testes mais específicos sobre possíveis vias terapêuticas da DA. Em um futuro próximo, os sistemas *in silico* se tornarão, cada vez mais, ferramentas poderosas e imprescindíveis para a busca de novos tratamentos para doenças ainda pouco compreendidas, como é o caso da Doença de Alzheimer.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARISPE, N., Doh, M., 2002, "Plasma Membrane Cholesterol Controls the Cytotoxicity of Alzheimer's Disease A β P (1-40) and (1-42) Peptides". *The FASEB Journal*, vol. 16, p. 1526-1536, October.
- BANKS, W. et al., 1997, "Interactions of beta-amyloids with the blood-brain barrier". *Annals of the New York Academy of Science*, vol. 826, p.190-199, The N. Y. Acad. Of Science, New York, NY.
- BARRETO, F., 2005, *Um modelo matemático-computacional do papel do cálcio na doença de Alzheimer*, Tese de Mestrado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- BARROW, C. J.; Zagorski, M. G., 2002, "Solution structures of beta peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition". *Science* vol. 253, p. 179-182.
- BATTAINI, F., LUCCHI, L., BERGAMASCHI, S., et al., 1994, "Intracellular Signalling in the Aging Brain", *Annals of the New York Academy of Science*, vol. 719, pp. 271-284, The N. Y. Acad. Of Science, New York, NY.
- BEAR, M., CONNORS, B. W., PARADISO, 2000, M. A. *Neuroscience: Exploring the Brain*. Ed. Williams & Wilkins, 2nd Edition.
- BROADWELL, R. D., Sofroniew, M. V., 1993, "Serum Proteins Bypass the Blood-Brain Fluid Barriers for Extracellular Entry to the Central Nervous System". *Experimental Neurology*, vol. 120, p. 245-263.
- BURNS, M., Duff, K., 2002, "Cholesterol in Alzheimer's Disease and Tauopathy". *Annals of the New York Academy of Science*, vol. 977, p. 367-375, The N. Y. Acad. Of Science, New York, NY.
- CARAMELLI, P., BARBOSA, M. T., 2002, "Como diagnosticar as quatro causas mais frequentes de demência?", *Rev. Bras. Psiquiatr.*, vol.24, supl.1, p. 7-10, São Paulo.
- CARNEY, J. M., 2000, "Oxidative Stress Leading to Loss of Critical Proteases in Alzheimer's Disease – An Alternative View of the Etiology of AD". *Annals of the New York Academy of Science*, vol. 924, p. 160-163, The N. Y. Acad. Of Science, New York, NY.
- CID-10, 1993, *Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento da CID-10: Descrições Clínicas e Diretrizes Diagnósticas*. Coord. Organização Mundial Da Saúde. Ed. Artes Médicas, Porto Alegre.
- COOK, D. L. "The Cellular Biology of the Endocrine System: An Overview", p. 1139-1159. In: (PATTON).

- CUNHA, M. C. C., *Métodos Numéricos*, 2ª Edição, Editora da UNICAMP, Campinas, SP.
- DAVIES, P., 2000, “A Very Incomplete Comprehensive Theory of Alzheimer’s Disease”, *Annals of the New York Academy of Science*, vol. 924, p. 8-16, The N. Y. Acad. Of Science, New York, NY.
- DETWILER, P. B. “Sensory Transduction”, p. 98-129. In: (PATTON).
- DSM-IV-TR, 2000, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, Fourth Edition, American Psychiatric Association, Washington, DC.
- EDELSTEIN-KESHET, L., SPIROS, A., 2002, “Exploring the Formation of Alzheimer’s Disease Senile Plaques *in Silico*”, *Journal of Theoretical Biology*, 216, p.301-326, Elsevier Science Ltd.
- EDMOND, J. et al., 1991, “Dietary Cholesterol and the Origin of Cholesterol in the Brain of Developing Rats”. *Journal of Nutrition*, vol. 121, p. 1323-1330, American Institute of Nutrition.
- EGENSPERGER, R., et al., 1998, “Microglial Activation in Alzheimer Disease: Associations with APOE Genotype”. *Brain Pathology*, vol. 8, pg. 439-447.
- ENGELHARDT, E., LAKS, J., ROZENTHAL, M., et. Al., 1998, “Idosos Institucionalizados: Rastreamento Cognitivo”. *Ver. Psiqu. Clin.*, vol. 25, n. 2, pp.74-79.
- FASSBENDER, K. et al., 2001, “Simvastatin strongly reduces Alzheimer’s disease beta-amyloid₄₂ and beta-amyloid₄₀ levels in vitro and in vivo”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, p. 5856-5861.
- FORLENZA, O. V., Gattaz, W. F., 1998, “Influência de Mecanismos Colinérgicos nos Processos Neurodegenerativos Relacionados à Formação de Amiloide e à Fosforilação da Proteína Tau”. *Revista de Psiquiatria Clínica*, 25(3), p.114-117.
- FRANKS, R. G. E., *Modelling and Simulation in Chemical Engineering*, 1972, Wiley, NY.
- FREARS, E. et. al., 1999, “The Role of Cholesterol in the Biosynthesis of β -Amyloid”. *Neuroreport*, vol. 10, n.8, p. 1699-1705, Lippicott Williams & Wilkins.
- GAMBLIN, T. C. et al., 2003, “Caspase clivage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer’s Disease”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, p. 10032-10037.
- GAO, S., Hendrie, C., Hall, K. S., et al., 1998, “The Relationship Between Age, Sex, and the Incidence of Dementia and Alzheimer Disease”. *Archives of General Psychiatry*, vol. 55, issue 9, p.809-815.

- GANONG, W. F., 1993, *Review of Medical Physiology*, 16th Edition, Prentice-Hall International Inc., USA.
- GOLDE, T. E., Eckman, C. B., 2001, “Cholesterol Modulation as an Emerging Strategy for the Treatment of Alzheimer’s Disease”. *Drug Discovery Today*, vol. 6, no. 20, p.1049-1055, October.
- GUTERMAN, J., Levcovitz, E. C., 1998, “Impacto da doença de Alzheimer na família: a visão do familiar e as propostas de assistência psicológica”. *Informação Psiquiátrica*, 17 (supl.1): p.33-36.
- HALEY, R. W., DIETSCHY, J. M., 2000, “Is there a connection between the concentration of cholesterol circulating in the plasma and the rate of neuritic plaque formation in Alzheimer’s disease?”. *Arch.Neurology*, vol. 57, p.1410–1412 (in REFOLO, 2001)
- HALEY, R. W., 2002, “Is There a Connection between the Concentration of Cholesterol Circulating in Plasma and the Rate of Neuritic Plaque Formation in Alzheimer Disease?”, *Arch. Neurology* (Editorial), vol. 57, p. 1410-1412, October.
- HANSSON, M. J., et al., 2003, “Powerful cyclosporine inhibition of calcium-induced permeability transition in brain mitochondria”. *Brain Research*, no. 960, p. 99-111, Elsevier Science Inc.
- HARTMANN, T., 2001, “Cholesterol, Beta-Amyloid and Alzheimer’s Disease”. *Trends in Neurosciences* (Supplementum) 24:11, S 45-S 48.
- HERRERA Jr., E., CARAMELLI, P., NITRINI, R. 1998, “Estudo Epidemiológico Populacional de Demência na Cidade de Catanduva – Estado de SP – Brasil”. *Revista de Psiquiatria Clínica*, Edição Internet, vol. 25, n.2, p. 70-73, março/abril. Em: <http://www.hcnet.usp.br/ipq/revista/r252/arti252a.htm> (Página consultada em 28/06/2002).
- HILLE, B. “Voltage-Gated Channels and Electrical Excitability”, p. 80-97. In: PATTON, H. D., et al., 1989, *Textbook of Physiology – Excitable Cells and Neurophysiology*, 21st Edition, W. B. Saunders International Edition, vols. 1 e 2.
- HOPE(a), T. et al., 1997, “Behavior changes in dementia 1: point of entry data of a prospective study”. *Int. J. Geriat. Psychiatry*, vol. 12, p. 1062-1073, 1997. In: (MARINHO, 1998).
- HOPE(b), T., 1997, “Behavior changes in dementia 2: are there behavioral syndromes?”. *Int. J. Geriat. Psychiatry*, vol. 12, p. 1074-1078, 1997. In: (MARINHO, 1998).
- HOWLAND, D. et. al., 1998, “Modulation of Secreted β -Amyloid Precursor Protein and Amyloid β -Peptide in Brain by Cholesterol”. *The Journal of Biological Chemistry*,

vol. 273, n. 26, p. 16576-16582, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc..

IBGE, 2002, Diretoria de Pesquisas, Departamento de População e Indicadores Sociais, “Perfil dos Idosos Responsáveis pelos Domicílios no Brasil – 2000”, *Estudos e Pesquisas: Informação Demográfica e Sócio-Econômica*, vol. 9, Rio de Janeiro.

ILLENBERGER, S., et al., 1998, “The Endogenous and Cell Cycle-Dependent Phosphorylation of tau Protein in Living Cells: Implications for Alzheimer’s Disease”, *Molecular Biology of the Cell*, vol. 9, p.1495-1512, June.

JARVIK, G. P. et. al., 1995, “Interactions of apolipoprotein E genotype, total cholesterol level, age, and sex in prediction of Alzheimer’s disease: a case control study”. *Neurology*, n. 45, p. 1092-1096.

JI, S. R.; WU, Y.; SUI, S. F., 2001, “Cholesterol Is an Important Factor Affecting the Membrane Insertion of β -Amyloid Peptide ($A\beta$ -40), Which May Potentially Inhibit the Fibril Formation”. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 8, Issue of February 22, p. 6273-6279, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

JICK, H., et. al. “Statins and the risk of dementia”. *Lancet*, vol. 356, p.1627–1631, 2000 (in REFOLO, 2001).

JORM, A.F., KORTEN, A.E., HENDERSON, A.S., 1987, “The prevalence of dementia: a quantitative integration of the literature”. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, vol. 76, p.465-479 (in HERRERA, 1998).

KAKIO, A., Nishimoto, S., et al., 2002, “Interactions of Amyloid β -Protein with Various Gangliosides in Raft-Like Membranes: Importance of GM1 Ganglioside-Bound Form as an Endogenous Seed for Alzheimer Amyloid”. *Biochemistry*, vol. 41, p. 7385-7390, American Chemical Society.

KALMAN, J. et al., 2001, “High cholesterol diet down regulates the activity of activator protein-1 but not nuclear factor-kappa B in rabbit brain”. *Life Sciences*, n. 68, p.1495-1503, Elsevier Science Inc..

KANDEL, E. R., Schwartz, J. H., Jessel, T. M., 2000, *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill, 4th Edition, USA.

KIVIPELTO. M. et al., 2001, “Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment: a population based study”. *Neurology*, n. 56, p. 1683-1689.

KOUDINOV, A. R.; BEREZOV, T. T.; KOUDINOVA, N. V., 2001, “The levels of soluble amyloid beta in different high density lipoprotein subfractions distinguish

Alzheimer's and normal aging cerebrospinal fluid: implication for brain cholesterol pathology?". *Neuroscience Letters*, 314, p.115-118, Elsevier Science Ltd.

KUO, Y.M., et al., 1998, "Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain A_β1-42 levels". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 252, p.711-715.

LAKS, J. et al., 1998, "Se a doença de Alzheimer não tem cura, para que tratar? – Estratégias psicofarmacoterápicas para a doença de Alzheimer", *Informação Psiquiátrica*, 17 (supl.1), p.29-32.

LAUNER, L.J., et. al., 2001, "Cholesterol and neuropathologic markers of AD: a population-based autopsy study". *Neurology*, vol. 57, p.1447-1452.

LEIBING, A., 1998, "Doença de Alzheimer – (Um)a história". *Informação Psiquiátrica*, 17 (supl.1): p.4-9.

LOPES, M. A., BOTTINO, C. M. C., 2002, "Prevalência de Demência em Diversas Regiões do Mundo – Análises dos Estudos Epidemiológicos de 1994 a 2000", *Arq. Neuro-Psiquiatr.*, vol. 60, no. 1, p.61-69, Mar.

LYNCH, C., Mobley, W., 2000, "Comprehensive Theory of Alzheimer's Disease: The Effects of Cholesterol on Membrane Receptor Trafficking". *Annals of the New York Academy of Science*, vol. 924, p.104-111, The N. Y. Acad. Of Science, New York, NY.

MARINHO, V., Laks, L., Almeida, A. F. C., Engelhardt, E., 1998, "Sintomas não cognitivos das demências". *Informação Psiquiátrica*, 17 (supl.1): p.21-24.

MARTEL, C. L., 1997, "Isoform-Specific Effects of Apolipoproteins E2, E3, and E4 on Cerebral Capillary Sequestration and Blood-Brain Barrier Transport of Circulating Alzheimer's Amyloid β ". *Journal of Neurochemistry*, 69, p. 1995-2004, International Society for Neurochemistry.

MESULAM, M-M., 2000, "A Plasticity-Based Theory of the Pathogenesis of Alzheimer's Disease". *Annals of the New York Academy of Science*, vol. 924, p. 42-52, The N. Y. Acad. Of Science, New York, NY.

MURRAY, R. K., 1993, "The Biochemical Basis of Some Neuropsychiatry Disorders" in: MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., et al. *Harper's Biochemistry*, International Edition, 23 ed., Appleton & Longe, Prentice-Hall International Inc., pp. 750-752.

NEVE, R. L., McPhie, D. L., Chen, Y., 2000, "Alzheimer's Disease: A Dysfunction of the Amyloid Precursor Protein". *Brain Research*, no. 886, p.54-66, Elsevier Science Inc.

- NOTKOLA, I. L., Sulkava, R., Pekkanen, J., et al., 1998, "Serum Total Cholesterol, Apolipoprotein E Epsilon 4 Allele, and Alzheimer's Disease". *Neuroepidemiology* vol.17, p. 14-20.
- PAPPOLLA, M. A., Smith, M. A., et. al., 2002, "Cholesterol, Oxidative Stress, and Alzheimer's Disease: Expanding the Horizons of Pathogenesis". In: Smith, M. A.; Perry, G. (Ed) "Serial Review: Causes and Consequences of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease". *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 33, no. 2, p.173-181, Elsevier Science Inc.
- PATTON, H. D., et al., 1989, *Textbook of Physiology – Excitable Cells and Neurophysiology*, 21st Edition, W. B. Saunders International Edition, vols. 1 e 2.
- POIRIER, J., 2003, "Apolipoprotein E and Cholesterol Metabolism in the Pathogenesis and Treatment of Alzheimer's Disease". *Trends in Molecular Medicine* vol. 9:3, p. 94-101.
- REIS, A. E., 2005, *Um modelo matemático computacional do estresse oxidativo na doença de Alzheimer*, Tese de Mestrado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- REFOLO, L. M.; et. al., 2000, "Hypercholesterolemia Accelerates the Alzheimer's Amyloid Pathology in a Transgenic Mouse Model". *Neurobiology of Disease*, vol. 7, p.321-331, Academic Press.
- _____, L. M., et. al., 2001, "A Cholesterol-Lowering Drug Reduces β -Amyloid Pathology in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease". *Neurobiology of Disease*, Academic Press, vol. 8, p.890-899.
- RISSMAN, R. A., POON, W. W., JONES, M. B. et al., 2004, "Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology", *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 114, n.1, pp.121-130, July.
- ROZENTHAL, M.; Laks, J., Engelhardt, E., 1998, "Minha avó está esquecida e se perdeu na rua: a neuropsicologia da doença de Alzheimer". *Informação Psiquiátrica*, 17 (supl.1): p.25-28.
- SADAVOY, J., LAZARUS, L. W., JARVIK, L. F., GROSSBERG, G. T., 1996, *Comprehensive Review of Geriatric Psychiatry – II*, 2nd ed., American Psychiatric press, Inc., Washington DC.
- SPARKS, D. L., et al., 1994, "Induction of Alzheimer-like Beta-Amyloid Immunoreactivity in the Brains of Rabbits with Dietary Cholesterol". *Experimental Neurology* vol. 126, p. 88-94.
- SPARKS, D. L., Hunsaker III, J. C., Scheff, S. W., et al., 1990, *Neurobiology of Aging* vol. 11, p .601.

- SELKOE, D. J., 2000, "Toward a Comprehensive Theory for Alzheimer's Disease. Hypothesis: Alzheimer's Disease is Caused by the Cerebral Accumulation and Cytotoxicity of Amyloid β -Protein". *Annals of the New York Academy of Science*, vol. 924, p.17-25, The N. Y. Acad. Of Science, New York, NY.
- SIEGELBAUM, S. A., KOESTER, J., 2000, "Propagated Signaling: The Action Potential". In: KANDEL, E. R., Schwartz, J. H., Jessel, T. M., 2000, *Principles of Neural Science*, p. 175-186, McGraw-Hill, 4th Edition, USA.
- SOUZA, D. R. S., et al., 1998, "Polimorfismo da Apolipoproteína E na Doença de Alzheimer Tipo Tardio: Resultados Preliminares". *Revista de Psiquiatria Clínica*, 25(2), p.98-103.
- TANG, M. X., MAESTRE, G., TSAI, W. Y., LIU, X. H., et al., 2000, "Effect of age, ethnicity, and head injury on the association between APOE genotypes and Alzheimer's disease", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 802, Issue 1, pp. 6-15, The N. Y. Acad. Of Science, New York, NY.
- TRIEU, V. N.; UCKUN, F. M., 2000, "Apolipoprotein E and Apolipoprotein D Expression in a Murine Model of Singlet Oxygen-Induced Cerebral Stroke". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268, p.835-841, Academic Press.
- U.S. Department of Health and Human Services "Dietary Guidelines for Americans", 2005, Em: www.health.gov/dietaryguidelines/dga2005/document/pdf/dga2005.pdf (página consultada em 07/04/2005).
- VORBRODT, ^a W.; et. al., 1994, "A quantitative immunocytochemical study of the osmotic opening of the blood-brain barrier to endogenous albumin". *Journal of Neurocytology*, vol. 23, p. 792-800.
- WELLER, et. al., 2002, "Cerebrovascular Disease is a Major Factor in the Failure of Elimination of A β from Aging Human Brain". *Annals of the New York Academy of Science*, vol. 977, p. 162-168, The N. Y. Acad. Of Science, New York, NY.
- WISNIEWSKI, H. M.; KOZLOWSKI, P. B., 1982, "Evidence for Blood-Brain Barrier Changes in Senile Dementia of the Alzheimer Type (SDAT)". *Annals of the New York Academy of Science*, vol. 396, p. 119-129.
- WOLOZIN, B., et al., 2000, "Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3- methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors". *Arch Neurology*, v. 57, p.1439–1443 (in YANAGISAWA, 2002).
- WOOD, W. G.; Eckert, G. P.; Igbavboa, U.; Müller, W. E., 2003, "Amyloid beta-protein interactions with membranes and cholesterol: causes or causalities of Alzheimer's Disease". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1610, p. 281-290.

- WOOD, W. G.; et. al., 2002, "Brain Membrane Cholesterol Domains, Aging and Amyloid Beta-Peptides". *Neurobiology of Aging*, n. 23, p.685-694, Elsevier Science Inc.
- YAGAMI, T. et. al., 2002, "Gas6 rescues cortical neurons from amyloid β protein-induced apoptosis". *Neuropharmacology*, no. 43, p. 1289-1296, Pergamon.
- YANAGISAWA, K., 2002a, "Cholesterol and Pathological Processes in Alzheimer's Disease" – Mini-Review. *Journal of Neuroscience Research*, n. 70, p.361-366, Wiley-Liss, Inc.
- YANAGISAWA, K.; Matsuzaki, K., 2002b, "Cholesterol-Dependent Aggregation of Amyloid β -Protein". *Annals of the New York Academy of Science*, vol. 977, p. 384-386, The N. Y. Acad. Of Science, New York, NY.
- ZAROW, C. et. al., 1997, "Vascular Basement Membrane Pathology and Alzheimer's Disease". *Annals of the New York Academy of Science*, vol. 826, p.147-160, The N. Y. Acad. Of Science, New York, NY.
- ZIGMAN, W., et al., 1995, "Epidemiology of Alzheimer Disease in Mental Retardation - Results and Recommendations from an International Conference". *Report of the AAMR-IASSID Workgroup on Epidemiology and Alzheimer Disease*. American Association on Mental Retardation, AATN: Alzheimer Disease Group, December.

VI. ANEXO I

CONSTANTES	VALOR
a ₁₁	5×10^{-5}
b ₁₁	2×10^{-4}
a ₁₂	6×10^{-4}
a ₁₃	1×10^{-4}
b ₁₃	5×10^{-5}
c ₁₃	3×10^{-5}
d ₁₃	5×10^{-6}
a ₁₄	0,9
b ₁₄	2×10^{-4}
c ₁₄	1×10^{-4}
d ₁₄	6×10^{-5}
e ₁₄	0,3
f ₁₄	5×10^{-3}
g ₁₄	0,08
a ₂₁	0,03
b ₂₁	5×10^{-7}
a ₂₂	5×10^{-4}
b ₂₂	1×10^{-4}
c ₂₂	5×10^{-6}
d ₂₂	1×10^{-6}
e ₂₂	5×10^{-6}
a ₂₃	2×10^{-3}
b ₂₃	20
c ₂₃	1×10^{-4}
d ₂₃	5×10^4
a ₂₄	3×10^{-6}
a ₂₅	5×10^{-8}
a ₅₁	2×10^{-8}
b ₅₁	2×10^{-7}
a ₅₂	5×10^{-7}
b ₅₂	5×10^{-6}
a ₅₃	1×10^{-3}
b ₅₃	5×10^{-7}
a ₅₄	4×10^{-4}
b ₅₄	1×10^{-6}
c ₅₄	1×10^{-7}
b ₅₅	0,1
a ₅₇	0,01
a ₆₁	$1,5 \times 10^{-4}$
b ₆₁	4×10^{-4}
c ₆₁	1×10^{-5}
d ₆₁	4×10^{-5}
e ₆₁	2×10^{-3}

VII. ANEXO II

VARIÁVEL	DESCRIÇÃO	VALOR INICIAL
colSNC	Teor de colesterol no SNC	12,5 mg/dl
colMPS	Teor de colesterol na MPS	11,25 mg/dl
colFE	Teor de colesterol na FE	1,6875 mg/dl
colFC	Teor de colesterol no FC	9,5625 mg/dl
colIN	Colesterol entrando no SNC	colDieta · 5x10 ⁻⁵ mg/dl
colOUT	Colesterol saindo do SNC	0,0 mg/dl
C24S	24s-hidroxicolesterol	0,0 mg/dl
apoE2	Nível de proteína apoE2	0,0 µM
apoE3	Nível de proteína apoE3	0,0 µM
apoE4	Nível de proteína apoE4	0,0 µM
Aβ	Nível de Aβ	0,0 µM
Aβprod	Aβ produzido	0,0 µM
Aβpol	Aβ polimerizado	0,0 µM
Aβdegrad	Aβ degradado	0,0 µM
Aβout	Aβ exportado do SNC	0,0 µM
PNS	Placas neuríticas senis	0,0 µM
colDieta	Teor de colesterol da dieta	300 ou 600
Mit	Número de neurônios em tentativa de mitose	0,0 unidades
MorteN	Morte neuronal	0,0 unidades
Tau	Tau integral	100,0 µM
fTau	Tau filamentosa	0,0 µM
PTau	Tau fosforizada	0,0 µM
descTau	Tau desconectada dos microtúbulos	0,0 µM
EN	Emaranhados Neurofibrilares	0,0 µM
ε2	Número de alelos ε2 da proteína apoE	0, 1 ou 2
ε3	Número de alelos ε3 da proteína apoE	0, 1 ou 2
ε4	Número de alelos ε4 da proteína apoE	0, 1 ou 2
EO	Nível de radicais livres	0,0 µM
canais de Ca ²⁺	Número de novos canais de Ca ²⁺ formados	0,0 unidades
ΔTau	Tau fragmentada	0,0 µM