

ALTERAÇÕES ENCONTRADAS EM CÉREBROS DE INDIVÍDUOS ACIMA DOS 65 ANOS E SUA CORRELAÇÃO COM DEMÊNCIA DE ALZHEIMER

LIANA LISBOA FERNANDEZ* ; LÍGIA M. BARBOSA-COUTINHO**

RESUMO - Foram estudadas 12 amostras de cérebros de indivíduos acima de 65 anos. Estas amostras foram submetidas a três técnicas com o objetivo de se detectar placas senis ricas em β -amilóide: imuno-histoquímica para β -amilóide; técnica de Gleees; técnica da hematoxilina-eosina. Foram detectadas diferenças significativas entre o número de placas encontradas nas diferentes técnicas, o que salienta a possibilidade de diagnósticos falsos-negativos na doença de Alzheimer. A técnica de imuno-histoquímica mostrou-se mais eficiente. Foram submetidos a teste estatístico o número de placas encontradas no córtex e no hipocampo e comparadas, assim como o número de placas encontradas num hemisfério e no outro, sem diferenças significativas. Segue-se revisão da literatura quanto aos achados neuropatológicos da doença de Alzheimer, assim como da significância do β -amilóide.

PALAVRAS-CHAVE: doença de Alzheimer, placas senis, β -amilóide.

Changes found in the brain of people over 65 years old and their correlation with Alzheimer disease

ABSTRACT - Twelve brains of individuals with more than sixty-five years were studied. These samples were submitted to three techniques, with the objective to detect senile plaques which the major component was the β -amyloid: β -amyloid immunohistochemistry; Gleees technique; and haematoxilin-eosin technique. We detected significant differences between the number of senile plaques found in different techniques. β -amyloid immunohistochemistry was more efficient. This is very important because we can underdiagnosis Alzheimer's disease when the most adequate technique is not used. The statistical analysis showed no significant differences neither between the number of cortical plaques and the hippocampal plaques, nor between the number of plaques in both hemispheres. A literature review about neuropathological findings and β -amyloid importance was done.

KEY WORDS: Alzheimer disease, senile plaques, β -amyloid.

Demência é um estado confusional crônico e progressivo, que é geralmente causado por doenças degenerativas do cérebro ou por múltiplos acidentes vasculares^{1,6,22}. Nos Estados Unidos, 4 a 5% dos indivíduos acima dos 65 anos são acometidos por demência. Destes, cerca de 50 a 60% são portadores de doença de Alzheimer (DA)^{11,22}, sendo esta a quarta maior causa de morte.²⁷ O diagnóstico definitivo de DA só é feito através de anormalidades histopatológicas observadas no tecido cerebral cortical, obtido tanto em biópsia quanto em autópsia, acompanhadas de avaliação clínica e laboratorial compatíveis.^{1,27} A primeira descrição das estruturas neuropatológicas encontradas nesta forma de demência foi feita por Alois Alzheimer, em 1907². As alterações neuropatológicas mais frequentemente encontradas na DA são os enveloados neurofibrilares e as placas senis, ricas em β -amilóide^{7,12,13,21,25}. Atualmente, o significado dos achados histopatológicos desta doença está sendo rediscutido, porque essas estruturas podem também ser encontradas em pacientes idosos sem demência^{5,11,16,17}.

*Médica neurologista; **Neuropatologista, Professor titular de Anatomia Patológica da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA). Aceite: 24-janeiro-1997.

Para tanto, faz-se necessário um estudo que comprove quais são as técnicas fidedignas na detecção destas anormalidades. Este é o objetivo principal do presente estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 12 cérebros de indivíduos entre 65 e 87 anos, coletados em necrópsias realizadas no IML (Instituto Médico Legal) de Porto Alegre, RS, no período de maio a agosto-1994.

Após período de fixação de 7 dias o lobo temporal foi seccionado e incluído em parafina. Foram feitas lâminas seriadas de córtex temporal, hipocampo, tanto do lado direito (D), como do esquerdo (E). Em dois cérebros só foi possível aproveitar o córtex temporal E. Essas lâminas foram submetidas a três tipos de técnicas de coloração: 1. técnica de rotina com hematoxilina-cosina; 2. técnica para evidenciar neurofibrilas de Gleees (prata); e 3. técnica de imuno-histoquímica para detectar β -amilóide, pela avidina-biotina-peroxidase, potencializada com ácido fórmico e microondas.

Fez-se a contagem do número de placas senis encontrado em 7 campos microscópicos, num aumento de 200x, nas diferentes técnicas, e calculou-se a média de cada grupo e para cada área estudada. Comparou-se também o número de placas encontrado no hipocampo e córtex temporal e, entre hemisfério E e D, através da técnica de imuno-histoquímica para β -amilóide.

Aplicou-se o teste estatístico de Wilcoxon para os três achados, por ser este teste adequado para estudo de duas amostras relacionadas e levar em consideração a diferença obtida entre os pares de informações, atribuindo maior ponderação à diferença de maior valor.

RESULTADOS

Dos 12 cérebros estudados, 4 eram de indivíduos que estavam entre 60-69 anos, 3 entre 70-79 anos e 5 entre 80-89 anos. Quatro indivíduos eram do sexo feminino e 8 do masculino.

Na Tabela 1, compara-se a média do número de placas senis de 12 lâminas da mesma área, coradas pela técnica de Gleees e imuno-histoquímica. O teste de Wilcoxon mostrou diferença significativa entre as duas técnicas, podendo-se afirmar que a técnica do β -amilóide é mais eficiente que a de Gleees com 99,5% de confiança.

Em relação à técnica de hematoxilina-cosina, não se conseguiu detectar qualquer placa senil em todas as lâminas, no aumento de 200x, mesmo conhecendo-se o lugar onde elas se encontravam pela técnica de imuno-histoquímica. Portanto, esta técnica não foi considerada adequada para pesquisa de placas senis.

Tabela 1. Número médio de placas senis encontrado em 12 lâminas de uma mesma área temporal.

Caso	Coloração Gleees	Coloração β -amilóide
1	1,3	12,0
2	0,3	2,3
3	2,6	2,8
4	3,0	9,5
5	3,0	19,8
6	4,3	17,0
7	5,0	8,8
8	6,3	8,9
9	3,6	31,8
10	0,7	6,8
11	0,3	6,5
12	3,0	4,7

Segundo o *National Institute on Aging* (NIA) existe um número mínimo de placas senis, para diferentes grupos etários, para considerar-se neuropatologicamente o diagnóstico de DA¹: até 50 anos é necessário mais de 2-5 placas e para idade maior ou igual a 50 anos, mais de 8; maior ou igual a 60 anos, mais de 10; maior ou igual a 76 anos, mais de 15 placas.

Segundo a Tabela 2, observamos que, pela técnica de Gleees, nenhum indivíduo alcança o número mínimo de placas senis por faixa etária, que permita constatar anatomopatologicamente o diagnóstico de DA. Já, pela técnica de imuno-histoquímica, 3 indivíduos seriam considerados portadores de DA pelo número elevado de placas senis, caso conhecêssemos sua história clínica e ela fosse compatível.

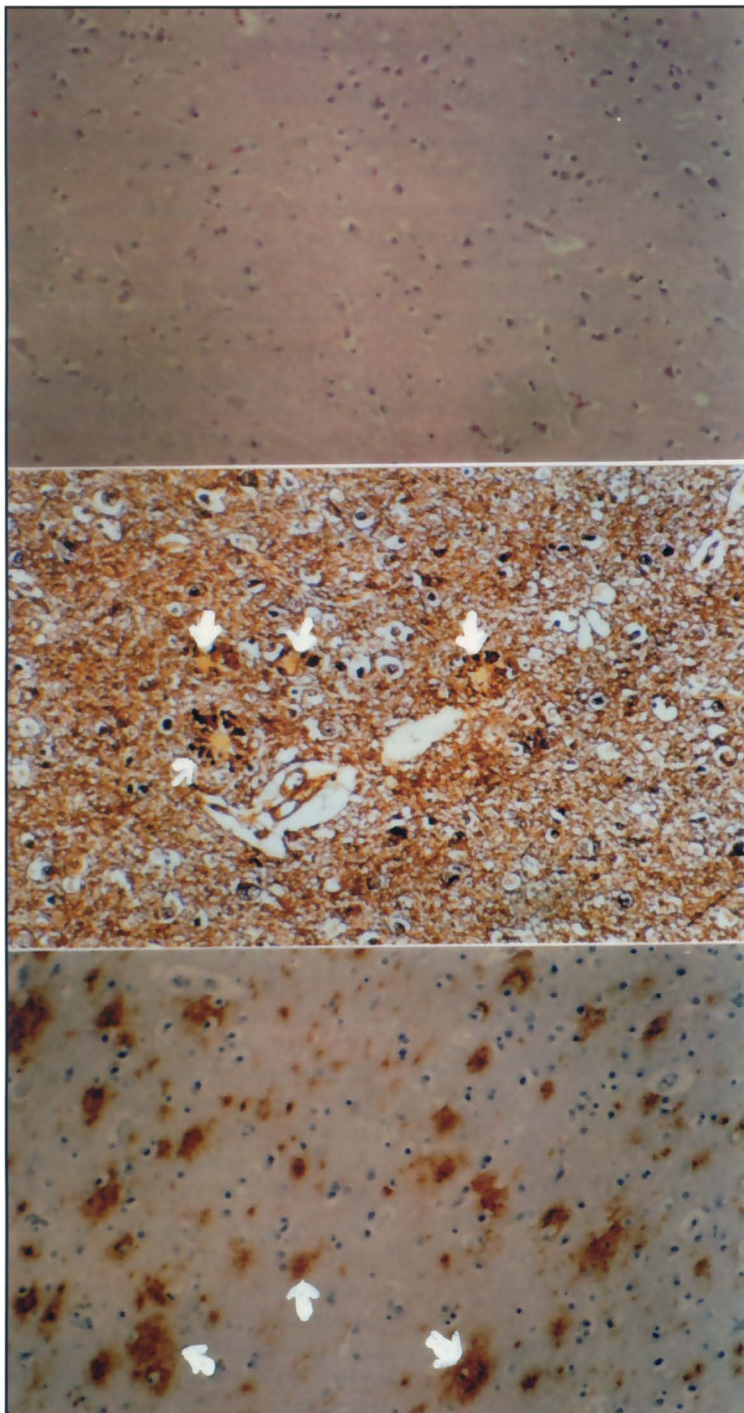


Figura 1. Em cima, Técnica H-E, objetiva 20x; no meio, Técnica de Glees, objetiva 20x; em baixo, Técnica de Imuno-histoquímica β -amilóide, objetiva de 20x.

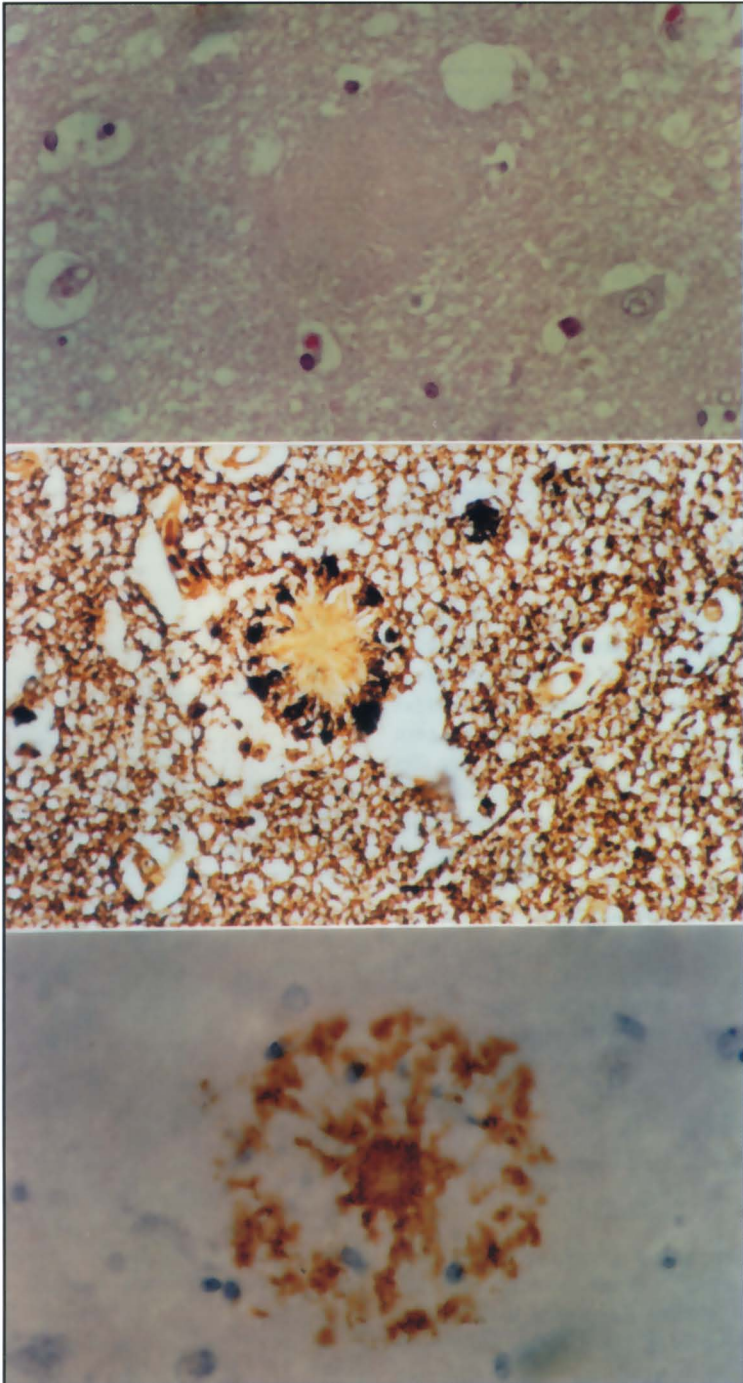


Figura 2. em cima, Técnica H-E: placa senil, objetiva 63x; no meio, Técnica de Glees: placa senil, objetiva 63x; em baixo, Técnica de imuno-histoquímica β -amilóide: placa senil, objetiva 63x.

Tabela 2. Relação entre o número médio de placas senis e a idade dos pacientes.

Caso	Idade	Nº placas técnica Glees	Nº placas técnica β-amilóide
1	81	1,3	12,0
2	80	0,3	2,3
3	74	2,6	2,8
4	66	3,0	9,5
5	68	3,0	19,8*
6	79	4,3	17,0*
7	87	5,0	8,8
8	65	6,3	8,9
9	83	3,6	31,8*
10	86	0,7	6,8
11	73	0,3	6,5
12	65	3,0	4,7

*Casos em que o número de placas ultrapassa aquele estabelecido pelo NIA e que seriam considerados como portadores de doença de Alzheimer.

A Tabela 3 nos mostra o número de placas senis encontrado em lâminas do hipocampo comparado com lâminas do córtex temporal ipsilateral. Ambas as lâminas foram coradas pela mesma técnica: imuno-histoquímica para β-amilóide. Dois casos ficaram fora por não termos hipocampo nem córtex contralateral. Aplicando-se o teste de Wilcoxon não houve diferença significativa entre o número de placas encontrado no hipocampo e córtex temporal.

Na Tabela 4, comparamos o número de placas senis encontrado no hemisfério E e D, respectivamente (hipocampo D com hipocampo E, córtex D com córtex E). Dois casos ficaram fora por falta de material. Não houve diferença estatística significativa pelo teste de Wilcoxon, apesar de haver tendência de maior número de placas no hemisfério D.

As Figuras 1 e 2 ilustram os achados.

DISCUSSÃO

A diferença do número de placas senis encontrada entre a técnica de imuno-histoquímica para β-amilóide e a técnica de Glees é de extrema importância, pois a DA pode estar sendo subdiagnosticada quando se utiliza a técnica da prata. Por outro lado, o número de placas senis em indivíduos idosos normais pode ser muito maior.

Tabela 3. Relação entre o número médio de placas senis encontrado pela técnica imuno-histoquímica para β-amilóide no córtex e hipocampo.

Nº	Hipocampo	Córtex
1	12,0	8,2
2	9,1	10,0
3	8,7	8,7
4	9,5	6,2
5	19,8	22,4
6	14,3	16,7
7	17,0	7,2
8	11,7	4,1
9	7,2	7,0
10	8,8	9,0
11	5,9	6,2
12	8,9	11,8
13	13,2	8,2
14	31,8	22,2
15	6,1	4,8
16	6,8	4,0
17	1,4	6,1
18	6,5	3,4
19	4,4	7,4
20	4,7	4,4

Tabela 4. Relação entre o número médio de placas senis encontrado pela técnica imuno-histoquímica para β-amilóide no hemisfério cerebral E e D.

Nº	Esquerdo	Direito
1	12,0	9,1
2	8,2	10,0
3	9,5	8,7
4	6,2	8,7
5	14,3	19,8
6	16,7	22,4
7	11,7	17,0
8	4,1	7,2
9	7,2	8,8
10	7,0	9,0
11	8,9	5,9
12	11,8	6,2
13	13,2	31,8
14	8,2	22,2
15	6,8	6,1
16	4,0	4,8
17	1,4	6,5
18	6,1	3,4
19	4,7	4,4
20	4,4	7,4

Hauw e col. registram relação linear entre o estado intelectual do indivíduo e o número de placas senis encontrado¹¹. É necessário salientar que nesse estudo a pesquisa das placas senis foi realizada basicamente utilizando coloração pela prata⁵. O uso de técnica mais sensível poderá alterar esta relação.

Kemper relata que placas senis ocorrem em pequeno número no córtex cerebral de indivíduos idosos. Naqueles com DA, elas ocorrem tanto no córtex quanto no hipocampo, amígdala e espalhadas em localizações subcorticais¹⁶. Em nosso estudo não se detectou diferença significativa entre o número de placas senis encontrado no hipocampo e no córtex temporal, utilizando-se a técnica de imunohistoquímica para o β -amilóide.

Não temos a história clínica dos indivíduos que compõem nossa amostra, mas salientamos a importância de que novos estudos sejam realizados em indivíduos idosos normais e com DA clínica, utilizando-se a técnica de imuno-histoquímica para β -amilóide na pesquisa de placas neuríticas, para melhor correlação clínico-patológica desses casos.

Kemper não encontra diferenças estatísticas do número de placas senis nos hemisférios D e E, tanto em indivíduos normais quanto com DA¹⁶. O presente estudo demonstrou também que não houve diferença estatística do número de placas encontradas em ambos hemisférios.

Revisando a literatura, encontramos diversos estudos^{3,4,9,10,14,15,18-20,23,24,26} realizados e em andamento, buscando desvendar os possíveis e múltiplos caminhos que desencadeiam a DA. A maioria deles parte do princípio que o β -amilóide depositado seria direta ou indiretamente tóxico levando os neurônios a morte. Tenta-se explicar a deposição acelerada do β -amilóide no cérebro, através de mutações genéticas^{8,29}. Especial atenção tem sido dedicada ao gen APOE, que se relaciona com a maioria dos casos de DA (casos esporádicos e familiares de início tardio)²⁸.

Outro aspecto interessante no estudo da DA é a pesquisa de proteínas proteases ,responsáveis por diferentes clivagens da proteína precursora do amilóide, originando o A₄-amilóide, através de cultura de células^{3,9,15,19,23,24}. A partir desses estudos, drogas poderão ser desenvolvidas evitando a progressão da doença.

Este estudo permitiu, ainda, padronizar a técnica de imuno-histoquímica para β -amilóide e comprovar sua eficiência em relação à técnica de Gleees. A nosso ver, a técnica de imuno-histoquímica é a mais indicada para pesquisa deste peptídeo.

REFERÊNCIAS

- Almeida OP, Nitrini R (eds). Demência. São Paulo: Bik 1995:13-136.
- Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Allg A Psychiat Psych Gerictl Med 1907;64:146-148.
- Blom N, Linnemann D. Alzheimer's dementia and amyloid precursor-protein. Ugestr-Laeger (Denmark) 1992;154:1010-1015.
- Cotman CW, Pike CJ. Beta-amyloid and its contributions to neurodegenerations in Alzheimer disease. In Terry RD, Katzman R., Bick KL (eds). Alzheimer disease. New York: Raven Press, 1994:305-315.
- Davies P. Neuronal abnormalities, not amyloid, are the cause of dementia in Alzheimer disease. In Terry RD, Katzman R., Bick KL (eds). Alzheimer disease. New York: Raven Press 1994:327-333.
- Fernandez RJ, Samuels MA. Disfunção intelectual: retardo mental e demência. Manual de neurologia. Rio de Janeiro: Medsi 1992:41-43.
- Golaz J, Boures C, Hof PR. Motor cortex involvement in presenile dementia: report of a case. J Geriatr Psychiatry Neurol 1992;5:85-92.
- Goldgaber D; Schmechel DE. Expression of the amyloid beta-protein precursor gene. In Wurtman RJ et al. (eds). Advances in neurology: Alzheimer disease. New York: Raven Press 1990,51.
- Hausz C, Hung AY, Citron M, Teplow DB, Selkoe DJ. Beta-amyloid, protein processing and Alzheimer's disease. Arzneimittel Forschung Drug Res 1995;45:398-402.
- Hardy J. An anatomical cascade hypothesis for Alzheimer's disease. TINS 1992;15:200-201.
- Hauw JJ, Duyckaerts C, Delaere P. Alzheimer's disease. In Duckett S (ed). The pathology of the aging human nervous system. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991:113-147.
- Hof PR, Perl DP, Loerzel AJ, Morrison JH. Neurofibrillary tangle: distribution in the cerebral cortex of parkinsonism dementia cases from Guam: differences with Alzheimer disease. Brain Res (Netherlands) 1991;564:306-313.

13. Ince P, Irving D, Macartur F, Perry RH. Quantitative neuropathological study of Alzheimer-type pathology in the hippocampus: comparison of senile dementia of Alzheimer type, senile dementia of Lewy body type, Parkinson's disease and non-demented elderly control patients. *Neurol Sci (Netherlands)* 1991;106:42-52.
14. Jarret JT, Berger EP, Lansbury PT. Carboxyterminus of beta-amyloid protein is critical for seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biochem* 1993;32:4693-4697.
15. Joachim CL, Selkoe DJ. The potential role of beta-amyloid in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1992;6:7-34.
16. Kemper RL. Neuroanatomical and neuropathological changes during aging and dementia. In Albert ML, Knoefel JE. (eds). *Clinical neurology of aging*. New York: Oxford Univ Press, 1994:3-67.
17. Koukolik F. Relation of dementia, Alzheimer's disease and aging. *Oddeleni patologie, Fakultni Tomayerovy Nemocnice, Praha, Ceskpat (Czechoslovakia)*1992;28:14-20.
18. Lansbury PT Jr. Consequences of the molecular mechanism of amyloid formation for the understanding of the pathogenesis of Alzheimer's disease and the development of therapeutic strategies. *Arzneimittel Forschung Drug Res* 1995;45:432-434.
19. Masters CL, Beyreuther K. Molecular neuropathology of Alzheimer's disease. *Arzneimittel Forschung Drug Res* 1995;45:410-412.
20. Masters CL, Beyreuther K. Protein abnormalities in neurofibrillary tangles: their relation to the extracellular amyloid deposits of the A4 protein in Alzheimer's disease. In Wintman R et al. (eds). *Advances in neurology*. New York: Raven Press 1990,51:151-161.
21. Maury CPJ. Molecular pathogenesis of beta-amyloid in Alzheimer's disease and other cerebral amyloidoses. *Laborat Invest* 1995;71:4-16.
22. Merritt's text book of neurology. Ed. 7 Rowland LP (ed). Philadelphia: Lea & Febinger, 1994:508-514.
23. Nitsch RM, Wurtman RJ, Growdon JH. Regulation of proteolytic processing of the amyloid beta-protein precursor by first messengers: a novel potential approach for the treatment of Alzheimer's disease. *Arzneimittel Forschung Drug Res* 1995;45:435-438.
24. Robakis NK. Beta-amyloid and amyloid precursor protein chemistry molecular biology and neuropathology. In Terry RD, Katzman R, Bick KL (eds). *Alzheimer disease*. New York: Raven Press, 1994:317-326.
25. Schorderet M. Alzheimer's disease: fundamental and therapeutic aspects. *Experientia* 1995;51:99-105.
26. Sisodia SS, Price DL. Role of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *FASEB* 1995;9:366-370.
27. Strittmatter WJ, Apol SM. Alzheimer's disease. *Curr Neurol* 1990;10:357-379.
28. Strittmatter WJ, Roses AD. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4725-4727.
29. Van Broeckhoven CL. Molecular genetics of Alzheimer disease: identification of genes and gene mutations. *Eur Neurol* 1995;35:8-19.