

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

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA
DA GLIOSE REATIVA NA DOENÇA DE ALZHEIMER**

MELISSA PAPALÉO ROCHA DE LIMA

RECIFE 2011

MELISSA PAPALÉO ROCHA DE LIMA

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA
DA GLIOSE REATIVA NA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Patologia da Universidade Federal
de Pernambuco, para obtenção do
título de Mestre em Patologia na
área de concentração em Patologia
das Doenças Neoplásicas e do
Desenvolvimento

Orientador: Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Luciano Tavares Montenegro

RECIFE 2011

Lima, Melissa Papaléo Rocha de
Análise morfométrica e imuno-histoquímica da
gliose reativa na doença de Alzheimer / Melissa
Papaléo Rocha de Lima. – Recife: O Autor, 2011.
47 folhas: il., fig., quadro. ; 30 cm

Orientador: Nicodemos Teles de Pontes Filho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CCS. Patologia, 2011.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Doença de Alzheimer. 2. Gliose. 3.
Antígeno Ki-67. 4. Imunohistoquímica. I. Pontes
Filho, Nicodemos Teles de. II. Título.

616.831 CDD (20.ed.) CCS2011-071 UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio-Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE

Prof. José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof. Adriana Maria da Silva Telles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Hilton Justino da Silva

RECIFE

2011



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Patologia

Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE
Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo
Fone/Fax: (81) 2126.8529
<http://www.pgmop@ufpe.br> <http://www.pospat.ufpe.br>



DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
PATOLOGIA.

AUTORA: MELISSA PAPALÉO ROCHA DE LIMA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA

NOME DA DISSERTAÇÃO: "ANÁLISE MORFOMÉTRICA E IMUNO-
HISTOQUÍMICA DA GLIOSE REATIVA NA DOENÇA DE ALZHEIMER".

ORIENTADOR: PROF. DR. NICODEMOS TELES DE PONTES FILHO

CO - ORIENTADOR: PROF. DR. LUCIANO TAVARES MONTENEGRO

DATA DA DEFESA: 18 DE FEVEREIRO DE 2011.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Roberto José Vieira de Mello

Prof. Dr. Luciano Tavares Montenegro

Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença

Aos meus pais, Regina e Waldir, aos meus irmãos, Bruno, Laís e Victor, às minhas amigas queridas e ao meu namorado, Tiago, por serem fundamentais na minha vida e para as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Regina, por ser essa mãe maravilhosa e sempre presente, que me apóia em todas as minhas decisões e me incentiva a ir em busca dos meus sonhos; Ao meu pai, Waldir, por acreditar em mim e por me incentivar acima de tudo; Aos meus irmãos, Bruno, Laís e Victor, por torcerem por mim e por, apesar da distância física, estarem sempre do meu lado. Amo muito vocês.

Às minhas amigas-irmãs, Natália Lima, Luíza Menezes, Marina Fazio, Mariana Albuquerque, Katarina Gouveia, Paula Schimidt, Ana Elizabete Cahú, Marina Mações, Carina Milet, Maria Isabel Lima, Natália Wanderley e Marília Lima, por estarem SEMPRE do meu lado, compartilhando junto comigo todas as minhas conquistas, as minhas alegrias e também as minhas angústias. Vocês são parte de mim, amo muito!

Ao meu namorado, Tiago Valença, pelo amor, carinho e dedicação. Por saber ter paciência durante os momentos ruins e por aproveitar junto comigo os momentos bons. Por ser essa pessoa única que você é. Te amo.

Ao meu orientador, Prof. Nicodemos Filho, por ter me aceitado e acreditado no meu trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Luciano Montenegro, por ter estado ao meu lado durante toda a realização desse trabalho. Por ter se disponibilizado a ajudar

sempre que precisei, por ser essa companhia divertida e agradável e por ter me ensinado tudo o que precisei saber para realizar este trabalho. Esse trabalho é nosso!

Ao Prof. Roberto Vieira de Melo, por ter salvado a minha pele quando alguns imprevistos aconteceram, por ter me passado parte de seu grande conhecimento e por ter me ajudado em grande parte desse trabalho.

Ao amigo, Breno Sampaio, por ter me dado uma enorme força na análise estatística dos meus dados, parte importantíssima do meu trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Patologia do LIKA, especialmente Carmelita e Marina, por terem me orientado nos procedimentos que realizei lá.

À coordenação, professores, alunos, funcionários e todos que formam a Pós-Graduação em Patologia da UFPE.

À Pró-reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ) pela concessão da bolsa de estudo que tanto me ajudou durante esses dois anos.

Ao Laboratório BIOGEN, por ter doado o anticorpo necessário para a realização da imunohistoquímica.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa e para o meu crescimento pessoal e profissional.

“A alegria do triunfo jamais poderia ser experimentada se não existisse a luta, que é a que determina a oportunidade de vencer”.

(González Pecotche)

RESUMO

A doença de Alzheimer é uma doença crônica degenerativa, considerada como a forma mais comum de demência na senilidade. Sua histopatologia é bem definida, com marcas características que incluem a presença de placas senis, novos neurofibrilares, perda neuronal e gliose reativa em regiões específicas do cérebro, como o hipocampo. A gliose é um evento que ocorre no sistema nervoso central em consequência a qualquer dano tecidual, e pode ser definida como um crescimento anormal, por hiperplasia e/ou hipertrofia, de astrócitos, microglia, e, talvez numa extensão qualitativamente diferente, oligodendrócitos. Para um melhor entendimento do mecanismo da gliose reativa, realizou-se uma análise imuno-histoquímica no hipocampo, utilizando o marcador de proliferação celular Ki-67, e investigou-se a quantidade proporcional de neurônios e células gliais na mesma área em 16 necropsias de pacientes com a doença de Alzheimer e 5 controles sem demência. Não foi encontrada nenhuma célula Ki-67-positiva no hipocampo do cérebro com doença de Alzheimer. Um decréscimo no número de neurônios e oligodendrócitos e um aumento no número de astrócitos e microglia foram observados no hipocampo com a doença, em comparação com o grupo controle. Os resultados desse estudo sugerem que a gliose reativa que acontece na doença de Alzheimer não ocorre através de hiperplasia, mas de hipertrofia de astrócitos e microglia ou pela migração dessas células para a área de neurodegeneração, como uma resposta compensatória à morte neuronal.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, Gliose, Antígeno Ki-67, Imunohistoquímica

ABSTRACT

Alzheimer disease (AD) is a chronic degenerative disorder of the brain, which accounts for the most common form of dementia in the elderly. Its histopathology is well established, with hallmarks including senile plaque, neuritic tangles, loss of neurons and reactive gliosis in specific regions of the brain. Gliosis is a universal event in the central nervous system following tissue damage of any kind, and may be defined as abnormally increased growth, by hypertrophy and/or hyperplasia, of microglia, astrocytes, and, perhaps in a qualitatively different extent, oligodendrocytes. To better understand the reactive gliosis mechanism, we performed a quantitative immunohistochemical inventory on the hippocampus, using the proliferation marker Ki-67, and also investigated the proportional quantity of neurons and glial cells on the same area of 16 AD samples and 5 nondemented controls. No Ki-67-positive cells were found on the hippocampus of AD brain. A decrease of neurons and oligodendrocytes and an increase of astrocytes and microglia were observed in AD brain, compared to the control group. The results of this study suggest that reactive gliosis on AD doesn't occur by hyperplasia of astrocytes and microglia, but hypertrophy or a migration of these cells to the degeneration area as a compensative response.

Key words: Alzheimer disease, Gliosis, Ki-67 Antigen, Immunohistochemistry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADROS

Quadro 1. Resultados da revisão sistemática	18
--	-----------

FIGURAS

Figura 1. Análise imuno-histoquímica	31
---	-----------

Figura 2. Comparação da quantidade de neurônios entre o hipocampo com a doença de Alzheimer e sem demência	32
---	-----------

Figura 3. Comparação da quantidade de oligodendrócitos entre o hipocampo com a doença de Alzheimer e sem demência	32
--	-----------

Figura 4. Comparação do tamanho e número de astrócitos entre o hipocampo com a doença de Alzheimer e sem demência	32
--	-----------

Figura 5. Média do número de neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e microglia no hipocampo com a doença de Alzheimer e sem demência	33
---	-----------

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Teste t entre o número de neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e micróglia no hipocampo com a doença de Alzheimer e no grupo controle.

LISTA DE ABREVIATURAS

DA.....	Doença de Alzheimer
A β	Peptídeo β -amilóide
SNC.....	Sistema Nervoso Central
OLGs.....	Oligodendrócitos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. ARTIGO DE REVISÃO – Gliose reativa na doença de Alzheimer: uma revisão sistemática	16
Resumo	16
Abstract	17
1. Introdução	17
2. Métodos	18
3. Resultados	18
4. Discussão	20
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4. MÉTODOS	24
4.1 Área e população	24
4.2 Período de referência	24
4.3 Delineamento da pesquisa	24
4.4 Seleção da amostra	24
4.5 Processamento dos tecidos para corte histológico	24
4.6 Análise imuno-histoquímica	25
4.6.1 Silanização das lâminas	25
4.6.2 Obtenção dos cortes histológicos	25
4.6.3 Recuperação antigênica	25
4.6.4 Bloqueio da peroxidase endógena	25
4.6.5 Incubação com o anticorpo Anti-Ki-67	25
4.6.6 Revelação	26
4.7 Análise morfométrica	26

4.7.1	Obtenção dos cortes histológicos	26
4.7.2	Coloração com hematoxilina e eosina	26
4.7.3	Delimitação dos campos	26
4.7.4	Contagem de células	26
4.8	Método de análise	26
5.	ARTIGO ORIGINAL – Immunohistochemical and Morphometric Analysis of Reactive Gliosis in Alzheimer Disease	27
	Abstract	27
	1. Introduction	28
	2. Methods	29
	2.1 Immunohistochemistry and morphometry	29
	2.2 Statistical analysis	30
	3. Results	30
	3.1 Immunohistochemical analysis	30
	3.2 Morphometric analysis	31
	4. Discussion	34
6.	CONCLUSÃO	37
7.	REFERÊNCIAS	38
8.	ANEXO	47

1 INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA), caracterizada pelo psiquiatra alemão Alois Alzheimer em 1907, é uma afecção neurodegenerativa progressiva e irreversível de aparecimento insidioso, que acarreta perda da memória e diversos distúrbios cognitivos (Harman, 1996). É a causa mais comum de demência senil e pré-senil e raramente apresenta os sintomas antes dos 50 anos de idade (Hueb, 2008). Acomete 5% a 10% dos indivíduos acima de 65 anos e 20% a 40% daqueles acima de 85 anos (Dubinski, 2000; Barnes, 2005). O aumento progressivo da incidência da doença nas décadas sucessivas originou grandes problemas médicos, sociais e econômicos em países com uma proporção crescente de pessoas idosas. A maioria dos casos é de apresentação isolada, todavia, em 5% a 10% dos casos tem ocorrência familiar (Hueb, 2008).

A histopatologia da DA é bem definida, com marcas características que incluem a presença de placas senis (complexo de proteínas agregadas contendo o peptídeo β -amidólido [A β]), novos neurofibrilares (remanescentes de neurônios contendo a proteína Tau hiperfosforilada), perda neuronal, conexões sinápticas danificadas e gliose reativa em regiões específicas do cérebro (Giulian, 1999; Price, 1986; Jellinger, 1990). Neuropatologicamente, o hipocampo é uma das primeiras e mais afetadas estruturas acometidas na DA (Braak, Braak, 1991).

A gliose reativa pode ser definida como o crescimento anormal, por hipertrofia e/ou hiperplasia, da microglia, a qual ataca as placas senis, de astrócitos, que circundam o complexo de placas como um empacotamento de proteção, e, de uma maneira mais limitada e talvez qualitativamente diferente, de oligodendrócitos (Giulian, 1999; Polito, Reynolds, 2005).

A gliose é um evento universal no sistema nervoso central (SNC), que se segue a qualquer tipo de dano tecidual (Nathaniel, Nathaniel, 1981; Lindsay, 1991; Hatten et al., 1991). É caracterizada pela presença de grande número de astrócitos reativos, distinguidos dos astrócitos normais pelo seu maior tamanho, pelos seus prolongamentos mais longos e grossos, e pela maior quantidade de manchas nos filamentos gliais (Eng et al., 1971; Bignami et al., 1972; Eng, 1985).

No SNC, os neurônios ultrapassam em número as células gliais de suporte, que participam de papéis essenciais nas funções diárias e nas respostas a qualquer forma de insulto ao SNC, como isquemia, infecção ou doença degenerativa. A perda da função do SNC após lesão ou doença é por fim devido à disfunção ou morte de neurônios. Não obstante, células gliais, como os primeiros respondedores a insultos do SNC, estão numa posição de serem chaves determinantes do resultado clínico. Realizar um melhor entendimento do papel das células da glia durante as complexas interações multicelulares que desvelam após insultos do SNC é uma meta importante para o desenvolvimento de novas idéias para intervenções terapêuticas potenciais (Sofroniew, 2005).

O presente estudo focou na região hipocampal, localizada na parte basal-medial do lobo temporal. Essa região é uma das primeiras a desenvolverem os sinais neuropatológicos da DA e, em casos avançados, é a região mais profundamente acometida (Braak, Braak, 1991; Ball Mar, 1988)

Para discutir se mudanças proliferativas relacionadas às células gliais são de fato significantes em portadores de DA, nós estudamos um corte de casos de DA bem definido e realizamos uma análise imuno-histoquímica quantitativa no hipocampo, utilizando o marcador de proliferação celular Ki-67, que é uma proteína expressa no núcleo durante todo o ciclo celular, com a exceção da fase GO (repouso) e a primeira etapa da fase G1.

Nesse estudo, também foi investigada a quantidade proporcional de neurônios e células gliais no hipocampo de pacientes com DA e nos controles sem demência.

PRESENÇA DE GLIOSE REATIVA NA DOENÇA DE ALZHEIMER: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

GLIOSIS FINDINGS IN ALZHEIMER'S DISEASE: A SYSTEMATIC REVIEW

Melissa Papaléo Rocha de Lima¹ Nicodemos Teles de Pontes Filho²

RESUMO

Objetivo: apresentar, em forma de uma revisão sistemática, relatos de casos de doença de Alzheimer com achados de gliose reativa. **Métodos:** foram pesquisadas as bases de dados “on line” PUBMED, LILACS, SCIELO BRASIL, MEDLINE (1997 – 2009) e MEDLINE OLD (1966 – 1997). Foram selecionados artigos que preenchiam os seguintes critérios: ser um relato de caso, ter estudado a Doença de Alzheimer e ter identificado a presença de gliose reativa. Foram excluídas as duplicidades e os artigos sem resumo. Um total de 12 artigos foi selecionado atendendo a esses critérios. **Resultados:** a gliose reacional foi observada em todos os relatos de casos analisados, os quais utilizaram basicamente a histopatologia para a sua identificação. **Conclusão:** estas observações parecem carecer de dados numéricos comprobatórios, seja através de estudo morfométrico das células gliais quanto ao tamanho e espessura, seja em relação a uma possível análise do índice proliferativo dessas células.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Alzheimer; Gliose; Astrocitose; Relatos de casos.

ABSTRACT

Purpose: to present a systematic review about case reports of Alzheimer's disease with reactive gliosis findings. **Methods:** the literature was reviewed using the PUBMED, LILACS, SCIELO BRAZIL, MEDLINE (1997 – 2009) and MEDLINE OLD (1966 – 1997) databases. Articles that fulfilled the following criteria were selected: to be a case reports study, to have studied the Alzheimer's disease identifying reactive gliosis. Duplicates and articles without summary were excluded. A total of 12 articles fulfilling these criteria were selected. **Results:** All of the cases analysed showed reactive gliosis by histopathological methods. **Conclusion:** These findings seems to need some numerical data to verify the occurrence of gliosis, perhaps by the morphometric study of the glial cells or by a possible evaluation of the proliferation index of those cells.

KEYWORDS: Alzheimer disease; Gliosis; Astrocytosis; Case reports.

INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é a patologia neurodegenerativa mais freqüentemente associada à idade, cujas manifestações cognitivas e neuropsiquiátricas resultam em deficiência progressiva e incapacitação (Janus, Westaway, 2001; Zhao, Tang, 2002). A doença afeta aproximadamente 10% dos indivíduos com idade superior a 65 anos e 40% acima de 80 anos. A doença de Alzheimer caracteriza-se, histopatologicamente, pela maciça perda sináptica e pela morte neuronal observada nas regiões cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas, incluindo o córtex cerebral, o hipocampo, o córtex entorrinal e o estriado ventral (Selkoe, 2001).

A perda neuronal, na DA, decorrente do processo degenerativo, é freqüentemente acompanhada por gliose reativa (Meyerhoff et al., 1994). A gliose reativa, como resposta do Sistema Nervoso Central à lesão, é o instrumento para isolar o tecido lesionado, promover a integridade do tecido, restringir a inflamação e a morte neuronal (Okada et al., 2006; Sofroniew,

2005). A gliose pode ser definida como o crescimento anormal, por meio de hipertrofia e/ou hiperplasia de astrócitos, microglia e, numa extensão mais limitada e talvez qualitativamente diferente, oligodendrócitos (Polito, Reynolds, 2005).

O objetivo do presente estudo foi realizar uma revisão sistemática de relatos de casos de doença de Alzheimer com achados de gliose reativa.

MÉTODOS

Para realização desta revisão foram selecionados, no período de 1966 a 2009, artigos publicados a partir de periódicos indexados nas bases de dados LILACS, SCIELO BRASIL, PUBMED, MEDLINE (1997 – 2009) E MEDLINE OLD (1966 - 1997), mediante o uso dos seguintes descritores: Doença de Alzheimer [DeCS] ou Alzheimer disease [MeSH Terms], Demência [Text word] ou Dementia [MeSH Terms], Demência senil [Text word] ou Senile dementia [Text word], Demência tipo Alzheimer [Text word] ou Alzheimer dementia [Text word], Gliose [DeCS] ou Gliosis [MeSH Terms], Astrocitose [Text word] ou Astrocytosis [Text word], Proliferação glial [Text word] ou Glial proliferation [Text word]. A consulta às bases de dados identificou 6.538 publicações.

Após a leitura dos títulos, resumos e, quando indicado, dos textos completos, procedeu-se à seleção dos artigos utilizando-se 3 critérios de inclusão: 1- Tipo de publicação: relato de caso; 2- Doença de Alzheimer; 3- Identificação de gliose reativa. Com esses três critérios básicos definiu-se o conjunto de trabalhos da revisão. Não houve restrição quanto ao ano e idioma da publicação.

Os 6.538 estudos identificados pela estratégia de revisão foram analisados de forma criteriosa e independente por dois pesquisadores e a seleção dos artigos ocorreu quando havia concordância e/ou desempate por um terceiro pesquisador, com base nos critérios de inclusão, totalizando 12 artigos.

RESULTADOS

Os resultados da revisão sistemática encontram-se no quadro 1.

Quadro 1. Resultados da revisão sistemática

Autor, ano da publicação	Paciente		Presença de outras complicações	Presença de Gliose	Região cerebral analisada	Metodologia utilizada
	Idade	Sexo				
Yokoyama et al, 2002, Japão	68	F	Doença de Parkinson	Sim	Hipocampo	Histopatologia
Osoegawa et al, 2001, Japão	60	M	Doença dos neurônios motores	Sim	Lobo frontal Lobo temporal	Histopatologia
Kanazawa et al, 2001, Japão	84	F	Não	Sim	Hipocampo	Histopatologia
Li F et al, 2000, Austrália	76	M	Não	Sim	Lobo frontal Lobo temporal	Histopatologia
Lanska et al, 1998, Holanda	>60	-	Não	Sim	Lobo frontal Lobo temporal	Histopatologia
Kobayashi et al, 1998, Holanda	76	M	Atrofias olivopontoce-rebelares	Sim	Núcleo basal de Meynert Ponte	Histopatologia
Gálvez et al, 1990, Chile	53	M	Doença de Creutzfeldt-Jakob	Sim	-	Histopatologia
Mandybur, TI., 1989, EUA	-	-	Não	Sim	Córtex pré-frontal	Histopatologia com imunohistoquímica para Proteína Ácida Fibrilar da Glia.
Ceccaldi et al, 1995, França	-	-	Não	Sim	Lobo parietal	Histopatologia
Hedera et al, 1995, EUA.	71	M	Doença de Parkinson, Doença por corpos de	Sim	Cordão espinhal	Histopatologia

			Lewy difuso e Esclerose lateral amiotrófica			
McGeer et al, 1986, Canadá.	-	-	Não	Sim	-	Histopatologia
Milder et al, 1984, Austrália.	66	M	Paralisia supranuclear progressiva	Sim	Mesencéfalo Ponte Cerebelo Globo pálido	Histopatologia

DISCUSSÃO

O presente estudo mostra que a maior quantidade de relatos de casos da doença de Alzheimer encontra-se no Japão. Poucos estudos revelam a prevalência da doença de Alzheimer levando-se em consideração a população mundial, porém, sabe-se que há uma relação com o nível de desenvolvimento dos países, pois a maioria das pessoas com demência vive em países desenvolvidos (cerca de 60%) (Ferri et al., 2006). Tal estudo demonstra que os índices de aumento não são uniformes; o número de casos em países desenvolvidos tende a aumentar em 100% entre 2001 e 2040, com um aumento de cerca de 300% na Índia, China e seus vizinhos do sul asiático.

Observa-se também, a partir dos resultados obtidos, que o estudo mais recente encontrado data do ano de 2002, o que mostra que há uma carência de relatos de casos atuais da doença. Tal carência vai de encontro aos números da atualidade, que demonstram o aumento da taxa de incidência de casos da doença de Alzheimer no mundo.

Outro ponto a ser observado é a faixa etária dos pacientes acometidos pela doença. Estudos (Dufouil, Alperovitch, 2005; Rocca, Amaducci, Schoenberg, 2004) demonstram uma taxa de incidência anual da DA de 2,4 casos por 100.000 habitantes com idade entre 40 e 60 anos e de 127 casos por 100.000 habitantes após os 60 anos de idade e afirmam que essas taxas provavelmente irão aumentar nos próximos 20 anos em consequência das

tendências demográficas atuais. De fato, os resultados do presente estudo vão ao encontro das taxas de incidência encontradas na literatura, evidenciando a faixa etária mais acometida pela doença, que é entre 60 e 85 anos. Vale chamar a atenção para 3 estudos (Ceccaldi et al., 1995; Mandybur, 1989; Mcgeer et al., 1986) que não identificaram a idade do paciente analisado, o que prejudica em parte a avaliação dos resultados.

Dentre os estudos selecionados, 6 relataram o caso de um paciente do sexo masculino (Gálvez et al., 1990; Hedera et al., 1998; Kobayashi et al., 1998; Li et al., 2000; Milder, Elliott, Evans, 1984; Osoegawa et al., 2001), 2 do sexo feminino (Kanazawa et al., 2001; Yokoyama et al., 2002) e 4 não informaram o sexo do paciente (Ceccaldi et al., 1995; Lanska et al., 1998; Mandybur, 1989; Mcgeer et al., 1986). Na literatura (Paganini-Hill, Henderson, 1994; Rocca, Amaducci, Schoenberg, 2004) são encontradas estatísticas que apontam para uma maior incidência em mulheres do que em homens, inclusive um dos estudos (Paganini-Hill, Henderson, 1994) afirma que esta maior prevalência em mulheres pode ser explicada pela deficiência de estrógeno em consequência da menopausa, que ocorre nas mulheres com idade avançada. Pode-se observar que os resultados obtidos pelo presente estudo revelam uma incompatibilidade com os achados literários, não havendo uma plausível explicação para a existência de uma maior quantidade de relatos de casos da doença de Alzheimer em homens do que em mulheres. Faz-se necessário, ainda, chamar a atenção para os estudos que não informaram o sexo do paciente, gerando dificuldades para a interpretação dos resultados.

Dos 12 estudos selecionados, 6 identificaram a presença de outra patologia além da doença de Alzheimer (Gálvez et al., 1990; Hedera et al., 1998; Kobayashi et al., 1998; Milder, Elliott, Evans, 1984; Osoegawa et al., 2001; Yokoyama et al., 2002), dos quais, 2 (Hedera et al., 1998; Yokoyama et al., 2002) identificaram a presença da doença de Parkinson, o que pode ser explicado pelo fato de as demências, incluindo a doença de Alzheimer, afetarem 6 vezes mais pacientes com a doença de Parkinson do que pessoas saudáveis (Emre, 2003). Outras patologias neurológicas, como doença do neurônio motor, doença de Creutzfeldt-Jakob, doença por corpos de Lewy difuso, esclerose lateral amiotrófica, paralisia supranuclear progressiva e atrofias olivopontocerebelares foram encontradas em associação com a

doença de Alzheimer, o que pode, de alguma maneira, ter influenciado na gliose reacional encontrada nos casos relatados. Faz-se necessário uma diferenciação diagnóstica das patologias encontradas para o estabelecimento de uma fiel relação de causa e conseqüência entre determinada doença e os achados histopatológicos.

As áreas do cérebro dos pacientes analisados onde foi encontrada gliose reacional foram bastante diversas, dentre as quais se destacam o hipocampo e os lobos frontal e temporal por terem aparecido em mais de um artigo: 2 estudos (Kanazawa et al., 2001; Yokoyama et al., 2002) no primeiro caso e 3 estudos (Lanska et al., 1998; Li et al., 2000; Osoegawa et al., 2001) no segundo caso.

Por fim, observa-se, pelo estudo realizado, que ocorre uma gliose reacional, na DA, como provável mecanismo funcional ou de adaptação do cérebro, com intuito de delimitar a área de lesão neuronal ou para ocupação celular da área lesada. Esta gliose foi observada em todos os estudos, nos quais se empregou a análise histopatológica como ferramenta de estudo, ou ainda em alguns trabalhos onde se empregou a análise de imagem como metodologia.

As referências quanto à presença da gliose é explicada por hiperplasia ou hipertrofia das células da glia. Estas observações parecem carecer de dados numéricos comprobatórios, seja através de estudo morfométrico das células gliais quanto ao tamanho e espessura, assim como em relação a uma possível análise do índice proliferativo dessas células.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o comportamento do tecido neural adjacente à destruição neuronal na doença de Alzheimer.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o índice de proliferação celular na gliose adjacente ao neurônio destruído.
- Avaliar, histomorfometricamente, o comportamento tecidual neural adjacente à destruição neuronal, através da contagem proporcional entre neurônios e células da glia em amostras de DA e grupo controle para posterior comparação.

3 MÉTODOS

3.1 Área / População

A pesquisa foi realizada no setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), localizado na Universidade Federal de Pernambuco, utilizando-se 16 amostras de tecido cerebral, adquiridas através do Serviço de Verificação de Óbitos (SVO). As amostras foram obtidas de pacientes com idade superior a 60 anos que obtinham a doença de Alzheimer, clinicamente diagnosticada em vida e confirmada de acordo com o Consórcio Para Estabelecimento do Registro da Doença de Alzheimer (CERAD) no exame histopatológico post mortem.

3.2 Período de Referência

A coleta de dados foi realizada no período de Agosto de 2009 a Novembro de 2010.

3.3 Delineamento da Pesquisa

A pesquisa é do tipo analítica, observacional e transversal. É classificada como analítica porque investiga uma relação de causa e efeito entre a doença de Alzheimer e o aumento da proliferação celular glial. Por se tratar de um estudo no qual o pesquisador não intervém no grupo estudado e investiga as relações de causa e efeito ao mesmo tempo, a pesquisa passa a ser classificada também como observacional e transversal.

3.4 Seleção da Amostra

As amostras foram selecionadas de acordo com o diagnóstico histopatológico confirmado de doença de Alzheimer em pacientes com idade superior a 60 anos, adotando-se como critério de exclusão a presença de outras patologias associadas à lesão cerebral.

3.5 Processamento dos tecidos para corte histológico

Os tecidos foram fixados em formol tamponado a 10%. Seguiu-se a lavagem em água corrente. Posteriormente, foram desidratados em banhos de álcool etílico de concentrações crescentes de 50 a 100%, diafanizados em dois

banhos de xilol e impregnados com parafina, utilizando processador Leika. A seguir, os tecidos foram emblocados em parafina para posterior corte em micrótomo.

3.6 Análise Imuno-histoquímica

3.6.1 Silanização das lâminas

As lâminas foram imersas em acetona P.A por dois minutos e, após esgotar bem o excesso, foram imersas em solução de APTS a 4% por mais dois minutos. Posteriormente, foram imersas em acetona por quatro vezes, e postas em estufa para secagem.

3.6.2 Obtenção dos cortes histológicos

Os blocos de parafina, com os materiais processados histologicamente, foram resfriados em congelador e cortados em micrótomo rotativo com espessura de 6 μ m.

3.6.3 Recuperação antigênica

Foi utilizado o método da incubação em calor úmido. Os cortes histológicos foram desparafinizados em banhos de xilol e reidratados com soluções de álcool etílico de concentrações decrescentes de 100 a 70%. As lâminas foram incubadas em tampão citrato 10mM / pH6,0, em panela de pressão, durante vinte minutos contados a partir da fervura; após resfriamento de vinte minutos, seguiram-se as lavagens em água corrente e destilada.

3.6.4 Bloqueio da peroxidase endógena

As lâminas foram imersas durante dez minutos, duas vezes, em solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% em metanol. Posteriormente, seguiram-se as lavagens em água corrente e destilada, e PBS.

3.6.5 Incubação com o anticorpo Anti-ki-67

Os cortes foram incubados “overnight” em câmara úmida, à temperatura de 4°C, com o anticorpo monoclonal anti-ki-67 (cepa MIB-1) da DAKO Corporation® diluído de 1:100 em solução de albumina a 10%.

3.6.6 Revelação

A revelação foi feita com o sistema LSAB-plus da DAKO Corporation®.

3.7 Análise Morfométrica

3.7.1 Obtenção dos cortes

Os blocos de parafina, com os materiais processados histologicamente, foram resfriados em congelador e cortados em micrótomo rotativo com espessura de 6µm.

3.7.2 Coloração com hematoxilina e eosina

Os cortes histológicos foram desparafinizados em dois banhos de xilol e reidratados em soluções decrescentes de álcool de 100 a 70%. Em seguida, foram lavados em água corrente e corados com hematoxilina e eosina.

3.7.3 Delimitação dos campos

Foram delimitados cinco campos visuais por lâmina para os casos de doença de Alzheimer, e dez para os controles, tomando-se como ponto de referência a fascia dentata do hipocampo.

3.7.4 Contagem de células

Foi feita a contagem de neurônios, astrócitos, oligodentrócitos e micróglia nos casos de DA e nos controles para posterior comparação proporcional.

3.8 Método de Análise

Os dados coletados foram computados no Excel e, posteriormente, submetidos ao programa STATA 10 para análise estatística. Foi utilizado o teste de regressão linear simples.

MORPHOMETRIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF REACTIVE GLIOSIS IN ALZHEIMER'S DISEASE

Melissa Papaléo Rocha de Lima¹ Nicodemos Teles de Pontes Filho PhD² Luciano Tavares Montenegro PhD² Roberto José Vieira de Melo PhD²

¹ Pathology sector of Laboratory of Immunopathology Keizo Asam, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil. ²Department of Pathology of Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

ABSTRACT

Alzheimer disease (AD) is a chronic degenerative disorder of the brain, which accounts for the most common form of dementia in the elderly. Its histopathology is well established, with hallmarks including senile plaque, neuritic tangles, loss of neurons and reactive gliosis in specific regions of the brain. Gliosis is a universal event in the central nervous system following tissue damage of any kind, and may be defined as abnormally increased growth, by hypertrophy and/or hyperplasia, of microglia, astrocytes, and, perhaps in a qualitatively different extent, oligodendrocytes. To better understand the reactive gliosis mechanism, we performed a quantitative immunohistochemical inventory on the hippocampus, using the proliferation marker Ki-67, and also investigated the proportional quantity of neurons and glial cells on the same area of 16 AD samples and 5 nondemented controls. No Ki-67-positive cells were found on the hippocampus of AD brain. A decrease of neurons and oligodendrocytes and an increase of astrocytes and microglia were observed in AD brain, compared to the control group. The results of this study suggest that reactive gliosis on AD doesn't occur by hyperplasia of astrocytes and microglia, but hypertrophy or a migration of these cells to the degeneration area as a compensative response.

Key words: Alzheimer disease, Gliosis, Ki-67 Antigen, Immunohistochemistry

1 INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) afflicts ~15 million people worldwide (Ferri et al., 2005). The clinical symptoms of AD are exemplified by progressive deterioration of cognitive function, psychiatric problems and dementia (Mohs, Schmeidler, Aryan, 2000). Thus, persons afflicted with AD steadily lose their memory and ability to learn, reason, make judgments, communicate and carry out daily activities.

AD is a chronic degenerative disorder of the brain, which accounts for the most common form of dementia in the elderly (Giulian, 1999). It's the neurodegenerative disorder more frequently associated to the age, which cognitive and neuropsychiatric manifestations results in progressive deficiency and incapacity (Janus, Westaway, 2001; Zhao, Tang, 2002), and affects around 10% of individuals with age over 65 years and 40% over 80 years (Selkoe, 2001).

The histopathology of AD is well established, with hallmarks including senile plaque (complex protein aggregates containing the β -amyloid peptide [A β]), neuritic tangles (remnants of neurons containing hyperphosphorylated tau protein), loss of neurons, damaged synaptic connections, and reactive gliosis in specific regions of the brain (Giulian, 1999; Price, 1986; Jellinger, 1990). Neuropathologically, the hippocampus is one of the first and most severely damaged structures in AD (Braak, Braak, 1991).

Reactive gliosis may be defined as abnormally increased growth, by means of hypertrophy and/or hyperplasia, of microglia, which attack the senile plaque, astrocytes, which surround the plaque complex as a protective wrap, and, to a more limited and perhaps qualitatively different extent, oligodendrocytes (Giulian, 1999; Polito, Reynolds, 2005).

Gliosis is a universal event in the central nervous system (CNS) following tissue damage of any kind (Nathaniel, Nathaniel, 1981; Lindsay, 1991; Hatten et al., 1991). It is characterized by the presence of large numbers of reactive astrocytes, distinguished from normal astrocytes by their larger size, longer thicker processes, and increased staining of glial filaments (Eng et al., 1971; Bignami et al., 1972; Eng, 1985).

In the central nervous system, neurons are greatly outnumbered by supporting glial cells that play essential roles in daily function and in the response

to all forms of CNS insults such as injury, ischemia, infection, or degenerative disease. The loss of CNS functions after injury or disease is ultimately due to the dysfunction or death of neurons. Nevertheless, glial cells, as the primary responders to CNS insults, are in a position to be key determinants of clinical outcome. Achieving a better understanding of glial cell roles during the complex multicellular interactions that unfold after CNS insults is an important goal in developing new ideas for potential therapeutic interventions (Sofroniew, 2005).

Our study focuses on the hippocampal region, located on the baso-medial part of the temporal lobe. This region is one of the first to develop the neuropathological signs of AD and, in advanced cases, is the region most profoundly affected (Braak, Braak, 1991; Ball Mar, 1988).

To address whether proliferative changes related to glial cells are indeed significant in AD brain, we studied a well defined cohort of AD cases and performed a detailed quantitative immunohistochemical inventory on the hippocampus, using the proliferation marker Ki-67, which is a 345 to 395 kDa non-histone protein complex present only in the nucleus of proliferating cells during G1, S, G2 and M, but not the G0 phase of the cell cycle (Endl, Gerdes, 2000).

In this study, we also investigated the proportional quantity of neurons and glial cells on the hippocampus of AD brain and nondemented controls.

2. METHODS

2.1 Immunohistochemistry and morphometry

Brains from 16 patients with Alzheimer's disease and 5 nondemented controls were used in this study. Post mortem diagnoses of AD were confirmed by routine neuropathologic examination. The brains were fixed in 10% formalin, and the brain specimens were embedded in paraffin. The 6 μ m thick sections of the hippocampus were deparaffinized and rehydrated according to standard procedures.

For immunohistochemical analysis, the sections were put into a steamer at 100°C for 20 minutes in 0.01 M of citrate buffer at pH 6.0, put to cool down to room temperature for 20 minutes, and treated for 10 minutes, twice, with 0.3% H₂O₂ solution in methanol.

They were then incubated overnight at 4°C with Anti-Ki-67 Monoclonal Antibody (clone MIB-1) from DAKO Corporation® at a dilution of 1:100 in 10% albumin solution. LSAB-plus from DAKO Corporation® was used as revelation system.

Nuclei were counterstained with hematoxylin. Quantifying of Ki-67–positive glia (astrocytes, microglia and oligodendrocytes) was estimated on five randomly selected fields using an optical microscopy coupled to a digital camera and a computational system with Motic Images Plus 2.0 ML® software.

For morphometric analysis, the same brain specimens were used. The 6µm thick sections were stained with hematoxylin and eosin. Neurons, astrocytes, microglia and oligodendrocytes were quantified on five selected fields around the fascia dentate of hippocampus, using the same equipment mentioned before, for subsequent comparison between the AD cases and the control group.

2.2 Statistical analysis

Linear regression analysis was used to calculate the regression coefficients. Statistical comparisons between groups were carried out using Student's *t*-test. The computations were performed with the STATA 10 statistical software. *P* values below 0.05 were considered significant.

3 RESULTS

3.1 Immunohistochemical analysis

No Ki-67-positive cells were observed in the hippocampus of AD brain (Fig. 1)

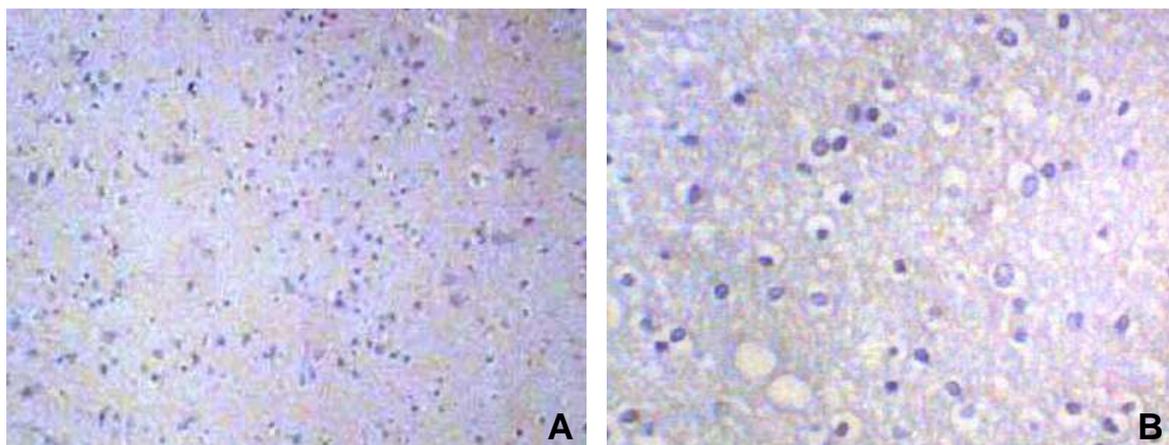


Fig. 1. Negative immunohistochemical analysis of AD hippocampus (A) Magnification of 100X (B) Magnification of 400X.

3.2 Morphometric analysis

The AD brain sections had visibly less quantity of neurons and oligodendrocytes, as shown in the figures 2 and 3. The opposite was found in relation to astrocytes, which seemed to be in a bigger amount in AD cases. Furthermore, the apparently reactive astrocytes nuclei were larger than the ones seen in the control group (figure 4).

The statistical results (table 1) about the morphometric analysis of the hippocampus of AD cases revealed a decrease of 78.13% of neurons compared to the control group. A decrease of oligodendrocytes was also found in AD brain, around 53.81%.

Differently, both astrocytes and microglia were found in a greater amount in AD cases, characterizing the reactive gliosis as a consequence for the neuronal loss. In AD brain, there was 98.82% more microglia and 84.14% more astrocytes than in the control patients.

The difference of the estimative number of cells (neurons, astrocytes, oligodendrocytes and microglia) between AD cases and control group can be seen at figure 5.

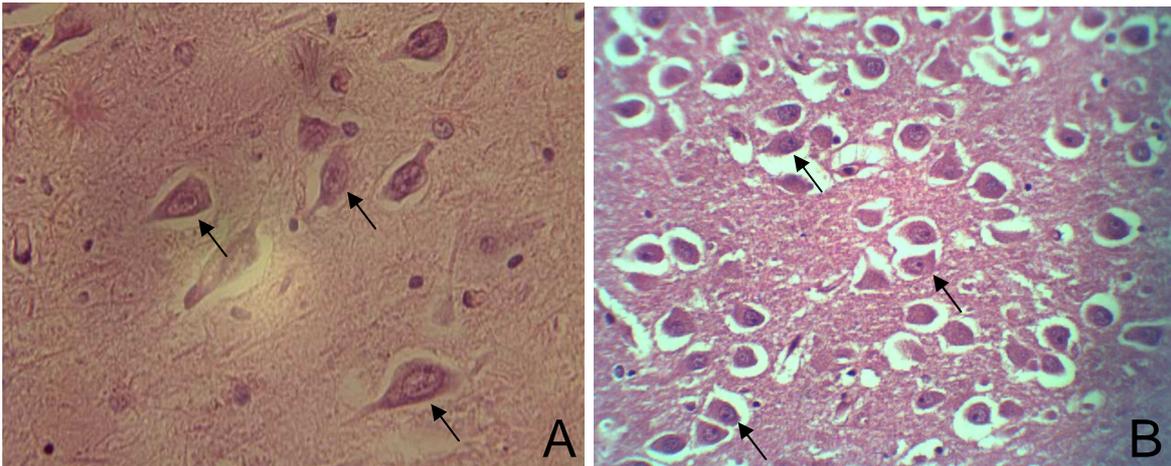


Fig. 2. Comparison of quantity of neurons between AD and control group hippocampus (A) Alzheimer disease, demonstrating the less quantity of neurons (400x) (B) Nondemented control, showing the major quantity of neurons (400x).

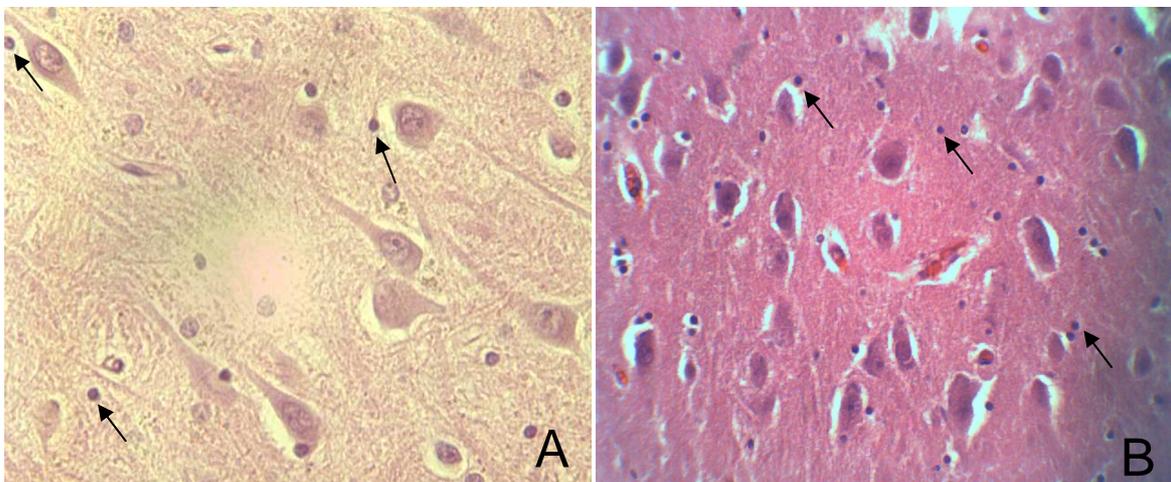


Fig. 3. Comparison of quantity of oligodendrocytes between AD and control group hippocampus (A) Alzheimer disease, demonstrating the less quantity of oligodendrocytes (400x) (B) Nondemented control, showing the major quantity of oligodendrocytes (400x)

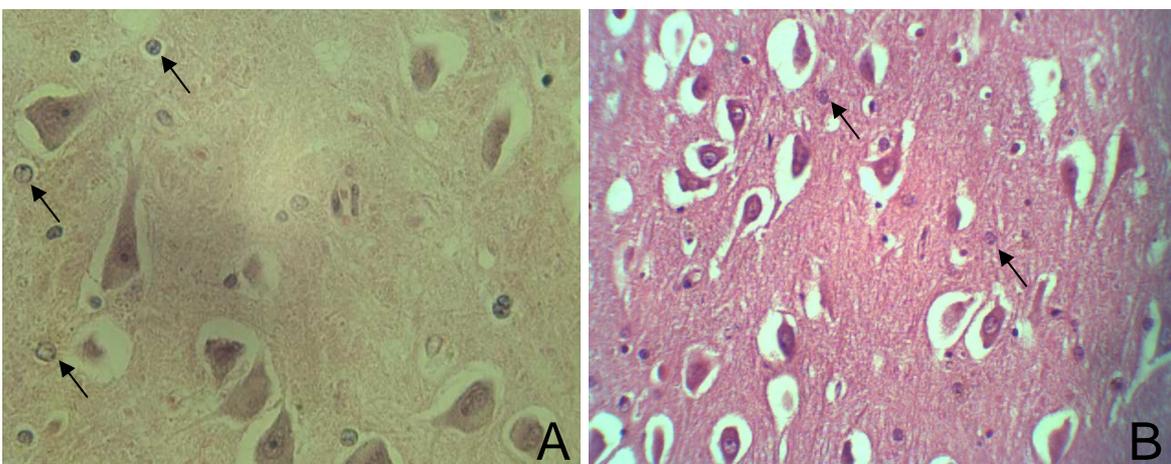


Fig. 4. Comparison of size and quantity of astrocytes between AD and Control group hippocampus (A) Alzheimer disease, demonstrating the major quantity and the bigger size of astrocytes (400x) (B) Nondemented control, showing the less quantity and the smaller size of astrocytes (400x).

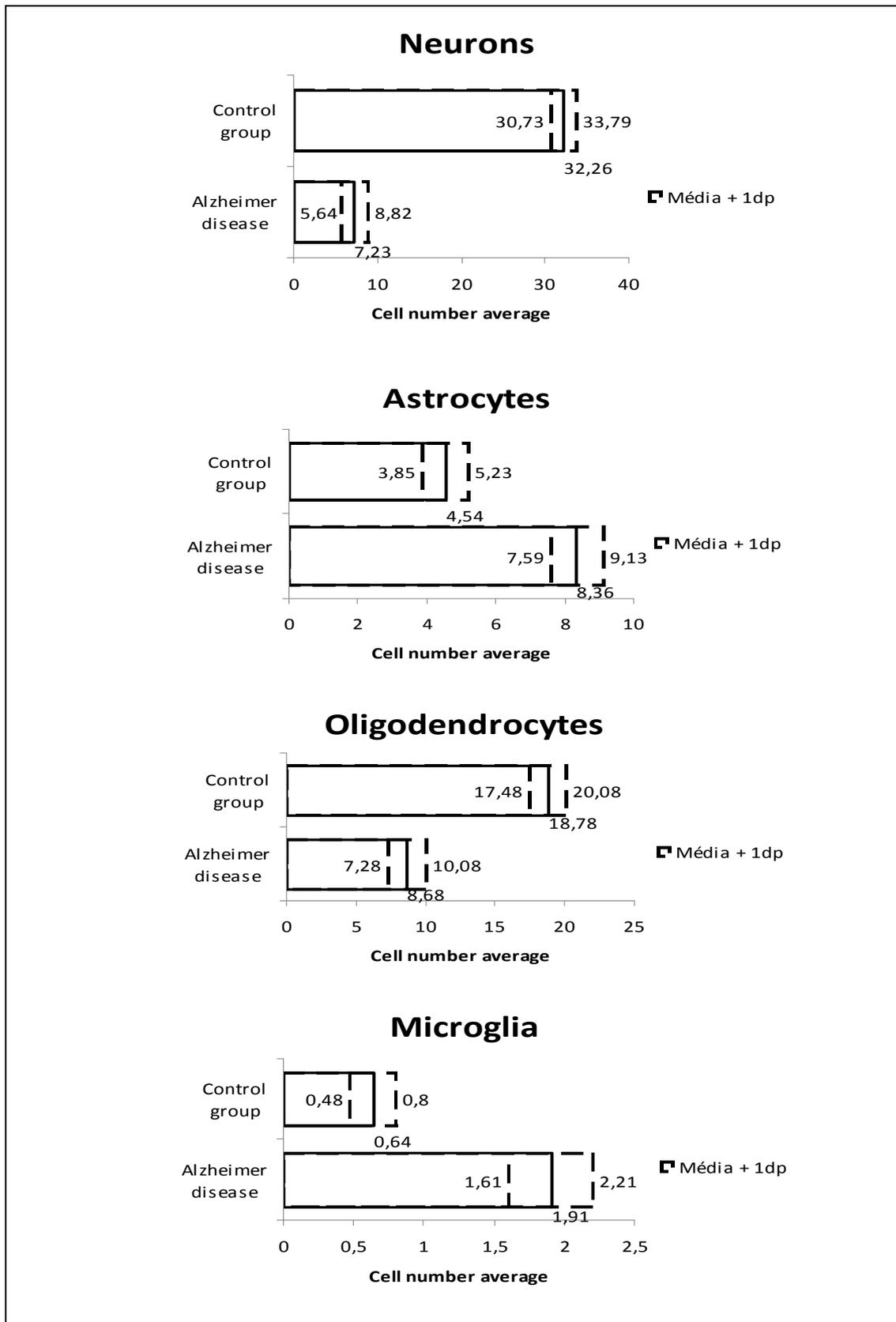


Figure 5. Average numbers of neurons, astrocytes, oligodendrocytes and microglia in Alzheimer's disease hippocampus and nondemented controls.

Table 1. T test between the number of neurons, astrocytes, oligodendrocytes and microglia in Alzheimer's disease patients in comparison to the nondemented control group.

	Coefficient	SD	95% confidence interval	P value
Neurons	-25.0225 ^{***}	1.597609	-28.18364 to -21.86136	0.000
Astrocytes	3.8225 ^{***}	0.772701	2.293578 to 5.351422	0.000
Oligodendrocytes	-10.105 ^{***}	1.401863	-12.87883 to -7.331174	0.000
Microglia	1.2725 ^{***}	0.306991	0.665065 to 1.879934	0.000

*** Significant at the 1% confidence level.

DISCUSSION

In AD, intraneuronal filamentous deposits, or neurofibrillary tangles, accumulate within neurons. These deposits are composed of hyperphosphorylated tau-protein (Hulstaert et al., 1999). These induce progressive neuronal dysfunction and degeneration, resulting in cognitive deficits, DNA damage, brain atrophy and eventually cell death in a limited number of brain areas (LaFerla, Oddo, 2005; Lucassen, 1997; Masters et al., 2006). The resulting neuronal loss is observable as gross atrophy with magnetic resonance imaging. Temporoparietal association cortices and the medial temporal lobe are severely atrophied in AD (DeCarli, 2000), with the entorhinal cortex and hippocampus the earliest and most severely affected (Janke et al., 2001; Thompson et al., 2001b). Thus, the decrease of neurons in AD brain,

more specifically in the hippocampus, observed in this study, is compatible with previously studies.

Some researchers (West et al., 1994) studied the differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. They focused on hippocampus because this region is one of the first to develop the neuropathological signs of AD and, in advanced cases, is the region most profoundly affected (Braak, Braak, 1991; Ball Mar, 1988). Because the hippocampal region is also involved in aspects of memory processes that deteriorate with AD (Hyman, Van Hoesen, Damasio, 1990), they thought that the structure would be altered by the degenerative processes associated with AD and that the region would be an appropriate part of the brain in which to compare degenerative changes related to AD and normal ageing. It was concluded that the neurodegenerative processes associated with normal ageing and with Alzheimer's disease are qualitatively different and that Alzheimer's disease is not accelerated by ageing but is a distinct pathological process. That confirms that the neuronal loss observed in our AD patients had no influence from their age, but is a consequence of AD's pathological process.

Oligodendrocytes (OLGs) are in intimate contact and are key for the morphofunctional maintenance of neurons (Roth et al., 2005). A decrease of OLGs would have a profound effect on neuronal function and viability, since OLGs provide trophic and metabolic support for neurons and axons (Du, Dreyfuss, 2002; Dai, Lercher, Clinton, 2003; Court, Álvarez, 2005).

An unsolved point is whether myelin loss would be secondary to neuronal death and the subsequent axonal degeneration, resulting in the white matter patterns detected by imaging (Noble, 2004). While myelin damage can result from axonal degeneration, it also is induced by several insults (Bartzokis, 2004), including A β (Curtain et al., 2001; Kiuru, Salonen, Haltia, 1999) and radical oxygen species (Whitman, Cotman, 2004). High levels of A β are observed in the white matter of AD patients (Roher et al., 2002; Wiesniewski et al., 1989), and as mentioned above, A β aggregates are considered responsible for the neuronal and vascular degeneration in AD brains (Yankner et al., 1989; Thomas et al., 1996). Although the molecular mechanism of A β -mediated cell death is not clearly defined, it is known that it probably involves oxidative stress, a situation to which OLGs are particularly susceptible because their reduced

glutathione content is low and they have a high concentration of iron, thus presenting an impaired ability to scavenge oxygen radicals (Back et al., 1998; Juurlink, Thorburne, Hertz, 1998). Furthermore, A β possesses an increased capability for damaging cholesterol rich membranes, such as those found in OLGs and myelin (Subasinghe et al., 2003). Therefore, oligodendrocytes are vulnerable to being damaged and killed by A β (Xu et al., 2001), which explains the less number of OLG's in AD samples.

One of the major histopathological characteristics of Alzheimer's disease (AD), besides the presence of senile plaques and neuronal death, is aggregates and activated microglia at the center, surrounded by a crown of activated astrocytes. Glial activation results in the sustained production of proinflammatory molecules, giving rise to a chronic inflammatory process (Roth et al., 2005).

Research on AD has focused mostly on the generation of A β peptide and its induction of neuronal damage (Selkoe, 2004), while the importance of astrocyte and microglial activation induced by A β has gained recognition in the last few years (Von Bernhardi, Ramírez, 2001; Von Bernhardi, Eugenin, 2004). It is well established that astrocytes undergo reactive responses following various kinds of injury or in neurodegenerative processes (Eddleston, Mucke, 1993; Norenberg, 1994; Ransom et al., 2003; Panickar, Norenberg, 2005; Ridet et al., 1997). It is believed that the role of gliosis in the adult is to wall off the area of injury which, in turn, prevents local regeneration of neuronal processes (Reier, Houle, 1988). Thus, both astrocytosis and microgliosis may represent a protective reaction to neuronal damage (Giulian, Vaca, Corpuz, 1993).

It is unclear if the gliosis occurs as a result of hyperplasia or hypertrophy of the glial cells. Our results points to hypertrophy hypothesis, since the immunohistochemical analysis were negative for Ki-67 marker, showing that there was no cell proliferation in AD brain, eliminating the hyperplasia hypothesis. Nevertheless, we cannot affirm that the astrocytes increase their size, although they were visibly larger in AD samples than in the control brain. Therefore, the astrocytosis and microgliosis may be part of an anatomical rearrange, wherein these cells migrate to the injury area in the brain tissue as a compensatory response for neuronal damage.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, podemos concluir que:

- A gliose reativa não ocorre por hiperplasia das células gliais, já que a análise imunohistoquímica com o marcador de proliferação celular Ki-67 foi negativa;
- Há um aumento do número de astrócitos e microglia no hipocampo de pacientes com a doença de Alzheimer, já que a análise morfométrica foi estatisticamente significativa, o que aponta para a hipótese de haver hipertrofia e um rearranjo anatômico dessas células, as quais migram para as áreas de injúria, como uma resposta compensatória à perda neuronal.

7 REFERENCES

BACK SA, GAN X, LI Y, et al. Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. **J Neurosci**. 1998; 18: 6241-6253.

BALL MAR. Topographic distribution of neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in hippocampal cortex of ageing and demented patients. A quantitative study. **Interdiscipl Topics Geront**. 1988; 25: 16-37.

BARNES LL, WILSON RS, BIENIAS JL, SCHNEIDER JA, EVANS DA, BENNETT DA. Sex differences in the clinical manifestations of Alzheimer disease pathology. **Arch Gen Psychiatry**. 2005; 62:685-691.

BARTZOKIS G. Age-related myelin breakdown: A developmental model of cognitive decline and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**. 2004; 25: 5-18.

BIGNAMI A, ENG LF, DAHL D, et al. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. **Brain Res**. 1972; 43:429-435.

BRAAK H, BRAAK E,. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. **Acta Neuropathol**. 1991; 82: 239– 259.

CECCALDI M, PONCET M, GAMBARELLI D, GUINOT H, BILLÉ J. Progressive severity of left unilateral apraxia in 2 cases of Alzheimer disease. **Rev. Neurol (Paris)** 1995; 151: 240-246.

COURT F, ÁLVAREZ J. Local regulation of the axonal phenotype, a case of merotrophism. **Biol Res**. 2005; 38: 365-374.

CURTAIN CC, ALI F, VOLITAKIS I, et al. Alzheimer's disease amyloid-beta binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membranepenetrating structure containing superoxide dismutaselike subunits. **J Biol Chem**. 2001; 276: 20466-20473.

DAI X, LERCHER LD, CLINTON PM. Trophic role of oligodendrocytes in the basal forebrain. **J Neurosci**. 2003; 23: 5846-5853.

DECARLI C Part IV. Neuroimaging in dementing disorders. **Dis Mon**. 2000; 46:706–724.

DU YL, DREYFUSS CF. Oligodendrocytes as providers of growth factors. **J Neurosci Res**. 2002; 68: 647- 654.

DUBINSKI RM et al.: Practice parameter: Risk of Driving and Alzheimer's disease (an evidence-based case review). Report of the quality Standards subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurol**. 2000; 54:2205-2212.

DUFOUIL C, ALPÉROVITCH A. Epidemiology of Alzheimer's disease. **Rev Prat**. 2005 55: 1869-78.

EDDLESTON M, MUCKE L. 1993. Molecular profile of reactive astrocytes— Implications for their role in neurologic disease. **Neurosc**. 54:15–36.

EMRE M. Dementia associated with Parkinson's disease. **The Lancet Neurol**. 2003; 2:229-237.

ENG LF. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. **J. Neuroimmunol**. 1985; 8: 203-214.

ENG LF, VANDERHAEGEN JJ, BIGNAMI A, et al. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. **Brain Res**. 1971; 28:351-354.

FERRI C, PRINCE M, BRAYNE C, BRODATY H, FRATIGLIONI L, GANGULI M, HALL K, HASEGAWA K, HENDRIE H, HUANG Y. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. **The Lancet** 2006, 366:2112-2117.

GÁLVEZ G, SERGIO, CARTIER R, LUIS, BASAURI T, LUCIANO, ARRIAGADA R, CAMILO. Spongiform change in the brain biopsy from a sporadic case of Alzheimer's disease: ultrastructural study. **Rev. chil. neuro-psiquiatr.** 1990, 28: 240-245.

GIULIAN, D. Microglia and the Immune Pathology of Alzheimer Disease. **Am. J. Hum. Genet.** 1999; 65: 13–18.

GIULIAN D, VACA K, CORPUZ M. Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. **J Neurosc.** 1993; 13: 29-37.

HARMAN D. A hypothesis on the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Ann NY** 1996;786:152-68.

HATTEN ME, LIEM RKH, SHELANSKI ML et al. Astroglia in CNS injury. **Glia** 1991; 4: 233-243.

HEDERA P, LERNER AJ, CASTELLANI R, FRIEDLAND RP. Concurrence of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, diffuse Lewy body disease, and amyotrophic lateral sclerosis. **J. Neurol. Sci.** 1998, 128: 219-224.

HUEB TO. Doença de Alzheimer. **Rev Bras Med.** 2008; 65(4):90-5

HULSTAERT F, BLENNOW K, IVANOIU A, et al. Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1–42) and tau levels in CSF. **Neurol.** 1999; 52:1555–1562.

HYMAN BT, VAN HOESEN GW, Damasio AR. Memory-related neural systems in Alzheimer's disease: an anatomic study. **Neurol** 1990; 40: 1721-30.

JANUS C, WESTAWAY D. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. **Physiol Behav.** 2001, 73(5): 873-86.

JANKE AL, DE ZUBICARAY GI, ROSE SE, et al. 4D deformation modeling of cortical disease progression in Alzheimer's dementia. **Magn Reson Med.** 2001; 46:661–666.

JELLINGER K. Morphology of Alzheimer's disease and related disorders. In: Maurer K, Riederer P, Beckmann H, eds. Alzheimer's disease, epidemiology, neuropathology, neurochemistry, and clinics. Wien: Chapman and Hall, 1990: 61-77.

JUURLINK BH, THORBURNE SK, HERTZ L. Peroxide-scavenging deficit underlies oligodendrocytes susceptibility to oxidative stress. **Glia.** 1998; 22: 371-378.

KANAZAWA A, IKEBE S, KOMATSUZAKI Y, TAKANASHI M, MORI H, MOCHIZUKI H, MIZUNO Y. An 84-year-old woman with progressive mental deterioration and abnormal behavior. **No To Shinkei** 2001, 53:199-209.

KIURU S, SALONEN O, HALTIA M. Gelsolinrelated spinal and cerebral amyloid angiopathy. **Ann Neurol.** 1999; 45: 305-311.

KOBAYASHI K, FUKUTANI Y, HAYASHI M, MIYAZU K, MURAMORI F, AOKI T, MUKAI M, SASAKI K, ISAKI K, KOSHINO Y. Non-familial olivopontocerebellar atrophy combined with late onset Alzheimer's disease: a clinico-pathological case report. **J Neurol Sci.** 1998, 154: 106-12.

LAFERLA FM, ODDO S. Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. **Trends Mol Med.** 2005; 4:170–176.

LANSKA DI, MARKESBERY WR, COCHRAN E, BENNETT D, LANSKA MI, COHEN M. Late-onset sporadic progressive subcortical gliosis. **J Neurol Sci.** 1998, 157: 143-147.

LI F, ISEKI E, KATO M, ADACHI Y, AKAGI M, KOSAKA K. An autopsy case of Alzheimer's disease presenting with primary progressive aphasia: a

clinicopathological and immunohistochemical study. **Neuropathol.** 2000, 20: 239-245.

LINDSAY RM. Reactive gliosis. In: S. Fedoroff and A. Vernadakis (eds.), *Astrocytes*, Vol. 3. New York, NY: Academic Press. 1986: 231-262.

LUCASSEN PJ, CHUNG WC, KAMPHORST W, et al. DNA damage distribution in the human brain as shown by in situ end labeling; area-specific differences in aging and Alzheimer disease in the absence of apoptotic morphology. **J Neuropathol Exp Neurol.** 1997; 56: 887–900.

MANDYBUR TI. Cerebral amyloid angiopathy and astrocytic gliosis in Alzheimer's disease. **Acta neuropathol.** 1989, 78: 329-331.

MASTERS CL, CAPPAI R, BARNHAM KJ, VILLEMAGNE VL. Molecular mechanisms for Alzheimer's disease: implications for neuroimaging and therapeutics. **J Neurochem.** 2006; 97:1700– 1725.

MCGEER PL, KAMO H, HARROP R, MCGEER EG, MARTIN WR, PATE BD, LI DK. Comparison of PET, MRI, and CT with pathology in a proven case of Alzheimer's disease. **Neurol.** 1986, 36: 1569-1574.

MEYERHOFF DJ, MACKAY S, CONSTANS JM, NORMAN D, VAN DYKE C, FEIN G, WEINER MW. Axonal injury and membrane alterations in Alzheimer's disease suggested by in vivo proton magnetic resonance spectroscopic imaging. **Annals of Neurol.** 1994, 36: 40-47.

MILDER DG, ELLIOTT CF, EVANS WA. Neuropathological findings in a case of coexistent progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. **Clin Exp Neurol.** 1984, 20: 181-187.

MOHS RC, SCHMEIDLER J, ARYAN M. Longitudinal studies of cognitive, functional and behavioural change in patients with Alzheimer's disease. **Stat. Med.** 2000; 19: 1401–1409.

NATHANIEL EJH, NATHANIEL DR. The reactive astrocyte. In: Fedoroff, S., and Hertz, L. (eds.), *Advances in Cellular Neurobiology*, Vol.2. New York, NY: Academic Press. 1981: 249-31.

NOBLE M. The possible role of myelin destruction as a precipitating event in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**. 2004; 25: 25-31.

NORENBERG MD. 1994. Astrocyte responses to CNS injury. **J Neuropathol Exp Neurol** 53:213–220.

OKADA S, NAKAMURA M, KATOH H, MIYAO T, SHIMAZAKI T, ISHII K, YAMANE J, YOSHIMURA A, IWAMOTO Y, TOYAMA Y, OKANO H. Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. **Nat Med**. 2006, 12: 82-834.

OSOEGAWA M, TAKAO T, TANIWAKI T, KIKUCHI H, ARAKAWA K, FURUYA H, IWAKI T, KIRA J. An autopsy case of dementia with motor neuron disease accompanying Alzheimer's disease lesion. **Rinsho Shinkeigaku** 2001, 41: 482-486.

PAGANINI-HILL A, HENDERSON VW. Estrogen Deficiency and Risk of Alzheimer's Disease in Women. **Am Jour of Epidemiol**. 1994, 140: 256-261.

PANICKAR KS, NORENBERG MD. 2005. Astrocytes in cerebral ischemic injury: Morphological and general considerations. **Glia** 50:287–298.

POLITO A, REYNOLDS R. NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. **J Anat**. 2005; 207:707–716.

PRICE D. New perspectives on Alzheimer's disease. **Ann Rev Neurosci**. 1986; 9:489-512.

RANSOM B, BEHAR T, NEDERGAARD M. 2003. New roles for astrocytes (stars at last). **Trends Neurosci** 26:520–522.

REIER, P.J., HOULE J.D. Functional Recovery in Neurological Disease (S.G. Waxman, Ed.). 1988; 47:87-138. RS Ven Press, New York.

RIDET JL, MALHOTRA SK, PRIVAT A, GAGE FH. 1997. Reactive astrocytes: Cellular and molecular cues to biological function. **Trends Neurosci** 20: 570–577.

ROCCA WA, AMADUCCI LA, SCHOENBERG BS. Epidemiology of clinically diagnosed Alzheimer's disease. **Annals of Neurol.** 2004, 19: 415-424.

ROHER AE, WEISS N, KOKJOHN TA, et al. Increased A beta peptides and reduced cholesterol and myelin proteins characterize white matter degeneration in Alzheimer's disease. **Biochem.** 2002; 41: 11080-11090.

ROTH AD, RAMÍREZ G, ALARCÓN R, et al. Oligodendrocytes damage in Alzheimer's disease: Beta amyloid toxicity and inflammation. **Biol Res.** 2005; 38: 381-387.

SELKOE DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiological Reviews** 2001; 81(2): 741-66.

SELKOE DJ. Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Nat Cell Biol.** 2004; 6: 1054-61.

SOFRONIEW, MV. Reactive Astrocytes in Neural Repair and Protection. **The Neurosc.** 2005; 11(5): 400-407.

SUBASINGHE S, UNABIA S, BARROW CJ, et al. Cholesterol is necessary both for the toxic effect of Abeta peptides on vascular smooth muscle cells and for

Abeta binding to vascular smooth muscle cell membranes. **J Neurochem.** 2003; 84: 471-9.

THOMAS T, THOMAS G, MCLENDON C, et al. Beta-amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. **Nature.** 1996; 380: 168-171.

THOMPSON PM, MEGA RS, WOODS RP, ZOUMALAN, et al. Cortical change in Alzheimer's disease detected with a disease-specific populationbased brain atlas. **Cereb Cortex.** 2001b; 11:1–16.

VON BERNHARDI R, EUGENÍN J. Microglial reactivity to A β is modulated by astrocytes and proinflammatory factors. **Brain Res.** 2004; 1025: 186-193.

VON BERNHARDI R, RAMÍREZ G. Microglia astrocyte interaction in Alzheimer's disease: Friends or foes for the nervous system? **Biol Res.** 2001; 34: 123-128.

WEST MJ, COLEMAN PD, FLOOD DG, et al. Differences In The Pattern Of Hippocampal Neuronal Loss In Normal Ageleg And Alzheimer's Disease. **Lancet.** 1994; 344(8925): 769-72.

WHITMAN GT, COTMAN CW. Oligodendrocyte degeneration in AD. **Neurobiol Aging** 2004; 25: 33-6.

WIESNIEWSKI HM, BANCHER C, BARCIKOWSKA M, WEN. Spectrum of morphological appearance of amyloid deposits in Alzheimer's disease. **Acta Neuropathol (Berl)** 1989; 78: 337- 347.

XU J, CHEN S, AHMED SH, et al. Amyloid-beta peptides are cytotoxic to oligodendrocytes. **J. Neurosci.** 2001; 21(RC118): 1-5.

YANKNER BA, DAWES LR, FISHER S, et al. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. **Science.** 1989; 245(4916): 417-420.

YOKOYAMA K, IKEBE S, KOMATSUZAKI Y, TAKANASHI M, MORI H, MOCHIZUKI H, MIZUNO Y. A 68-year-old woman with dementia and parkinsonism. **No To Shinkei** 2002, 54: 175-184.

ZHAO Q, TANG XC. Effects of huperzine A on an acetylcholinesterase isoforms in vitro: comparison with tacrine, donepezil, rivastigmine and physostigmine. **Euro Jour Pharmacol** 2002, 455(2-3): 101-7.

8 ANEXO



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 123/2009-CEP/CCS

Recife, 13 de maio de 2009.

Registro do SISNEP FR – 250356

CAAE – 0053.0.172.000-09

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 055/09

Título: "Análise Morfométrica do Índice de Proliferação Celular na Glicose Adjacente à Destruição Neuronal na Doença de Alzheimer"

Pesquisador Responsável: Melissa Papaléo Rocha de Lima

Senhor Pesquisador:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco CEP/CCS/UFPE registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 12 de maio de 2009.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar o relatório ao final da pesquisa.

Atenciosamente,

Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE



José Angelo Rizzo
Vice-Coordenador do CEP/CCS/UFPE

A
Mestranda Melissa Papaléo Rocha de Lima
Programa de Pós-Graduação em Patologia – CCS/UFPE