

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa Pós-Graduação em Medicina:
Ciências Médicas**

**Estudo dos Níveis Séricos de Proteína S100 β e EN-e
(Enolase Neurônio-específico) na Doença
de Alzheimer e no Envelhecimento Normal.**

EDUARDO DAURA FERREIRA

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Lorena Fagundes Chaves

**Tese de Doutorado apresentada no
Programa de Pós-Graduação em
Medicina: Ciências Médicas para
obtenção do título de Doutor em
Medicina.**

Porto Alegre

2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS –GRADUAÇÃO EM MEDICINA:
CIÊNCIAS MÉDICAS**

**ESTUDO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE PROTEÍNA S100 β e EN-e
(ENOLASE NEURÔNIO-ESPECÍFICO) NA DOENÇA DE
ALZHEIMER E NO ENVELHECIMENTO NORMAL.**

EDUARDO DAURA FERREIRA

Orientadora: Profa.Dra. Márcia Lorena Fagundes Chaves

**Tese de Doutorado apresentada no
Programa de Pós-Graduação em
Medicina:Ciências Médicas para
obtenção do título Doutor em Medicina.**

Porto Alegre

2005

F383e Ferreira, Eduardo Daura

Estudo dos níveis séricos de proteína S100 β e EN-e (enolase neurônio-específico) na doença de Alzheimer e no envelhecimento normal / Eduardo Daura Ferreira ; orient. Márcia Lorena Fagundes Chaves. – 2005.
xiv, 88 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2005.

1. Doença de Alzheimer 2. Demência 3. Envelhecimento
4. Proteínas S100 5. Fosfopiruvato hidratase I. Chaves, Márcia Lorena Fagundes II. Título.

NLM: WT 155

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho à minha filha, Maria Eduarda, fonte de inspiração e de amor .

Aos meus Pais, Umberto e Iara, pelo ensinamento dos valores da educação, do conhecimento e da vida.

1. Agradecimentos.....	7
2. Abreviaturas.....	9
3. Introdução.....	12
4. Revisão da Literatura.....	
4.1. Doença de Alzheimer.....	
4.2 Proteína S100 β	
4.2.1 Histórico da proteína S100 β	
4.2.2 Propriedades funcionais.....	
4.2.3 Os astrócitos e a proteína S100 β	
4.2.4 A proteína S100 β como marcadora de dano ao sistema nervoso central.....	
4.2.5. Proteína S100 e Doenças Neurodegenerativas.....	
4.3 Proteína EN-e	
5. Objetivos.....	
6. Referências Bibliográficas.....	
7. Artigo em Inglês.....	
8. Artigo em Português.....	
9. Anexos- Tabelas e escalas.....	

1. AGRADECIMENTOS

1. AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof. Dra. Márcia Lorena Fagundes Chaves, pelo constante estímulo ao meu desenvolvimento como profissional médico e como pesquisador.

Aos meus colegas André F. Carvalho, Alberto Maia, Cláudia Godinho, Cristiano A. Köhler, Raquel de LaForet Padilha, Oscar Dall'Igna,

A enfermeira Isabel Piazenski pela ajuda na organização dos dados dos idosos da comunidade;

Aos alunos da medicina, da psicologia, da fonoaudiologia, funcionários que me ajudaram no atendimento dos pacientes do ambulatório de neuro-geriatria do HCPA/UFRGS

Ao colega Roberto Gandolfi Lieberknecht e Ygor Arzeno Ferrão, diretores do Hospital Psiquiátrico São Pedro pelo entendimento da importância da pesquisa na medicina.....

Aos pacientes e familiares que com suas colaborações tornaram possível este estudo.

Aos professores da bioquímica da UFRGS, Prof Dr. Diogo O. Souza e Prof. Dr. Luis V.C. Portela na ajuda da análise do material biológico.

2. ABREVIATURAS

2. ABREVIATURAS

1. **SNC:** Sistema Nervoso Central
2. **AD:** Alzheimer's Disease
3. **EN-e:** Enolase Neurônio-específico
4. **NSE:** neuron-specific enolase
5. **MMSE:** Mini Mental State Examination
6. **CDR:** Escala de Avaliação da Demência

3. INTRODUÇÃO

3. INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional é um fenômeno global. Estima-se que, considerando a população mundial, o número de pessoas com 60 anos ou mais número de pessoas com 60 anos ou mais irá crescer mais de 300% nos próximos 50 anos, de 606 milhões em 2000 para quase dois bilhões em 2050. Este crescimento será maior nos países em desenvolvimento, onde esta população irá aumentar mais do que 4 vezes, de 374 milhões em 2000 para 1,6 bilhões em 2050.

O Brasil é um dos países em desenvolvimento nos quais o envelhecimento da população está ocorrendo com maior velocidade. Nos últimos 50 anos houve um aumento expressivo da população com 60 anos ou mais. Em 1950 essa população era de aproximadamente 2 milhões, e correspondia a 4,1% da população total. No ano 2000 esta população aumentou para 13 milhões, mais que sextuplicando, e passou a corresponder a 7,8% da população total. Nos próximos 50 anos estima-se que a população idosa será de 58 milhões, o que corresponderá a 23,6% da população total. Atualmente, a maioria de pessoas idosas, em números absolutos, já vive em países em desenvolvimento. Apesar disso, existe pouca informação sobre a situação de saúde dessa parcela da população. Entre os problemas de saúde que ocorrem com mais frequência nesta fase da vida e para os quais existe pouca informação epidemiológica está a demência, caracterizada pela presença do declínio da função cognitiva, incluindo a memória, e interferência no funcionamento ocupacional ou social. (Scazufca et al., 2002)

No Brasil e em outros países em desenvolvimento, os estudos populacionais sobre demência são escassos, e ainda não existem estimativas precisas da sua incidência e prevalência. Num estudo de Nitrini e colaboradores, 2004 em Catanduva, cidade do interior de São Paulo, Brasil, no ano de 1997, em amostra de 1656 idosos acima dos 65 anos, relatou a incidência de demência como sendo de 13,8 por 1000, e a

demência de Alzheimer como 7,7 por 1000. A taxa de incidência praticamente dobra a cada 5 anos de idade. Não há diferença no sexo, mas mulheres tem maior incidência de demência, principalmente DA acima de 85 anos de idade (Nitrini et al., 2004). Atualmente, estima-se a prevalência de pessoas com demência nos países em desenvolvimento a partir dos parâmetros obtidos nos países desenvolvidos.

Assim, considerando-se uma prevalência uniforme de 3%, obtida a partir das prevalências para faixas etárias específicas observadas nos países desenvolvidos ponderadas pela distribuição etária da população idosa dos países em desenvolvimento, o número de pessoas com 60 anos ou mais com demência nos países em desenvolvimento espera-se, para o ano de 2020 que a população idosa seja em torno de 15 milhões de brasileiros, sendo que o valor absoluto de indivíduos portadores de demência, mantendo-se a mesma proporção, será de 450 mil pessoas . Este aumento deverá ser mais significativo nos estados que compõem a região sul do país por apresentar expectativa de vida mais elevada, e concentrar grande parte desta população idosa (IBGE, 2000).

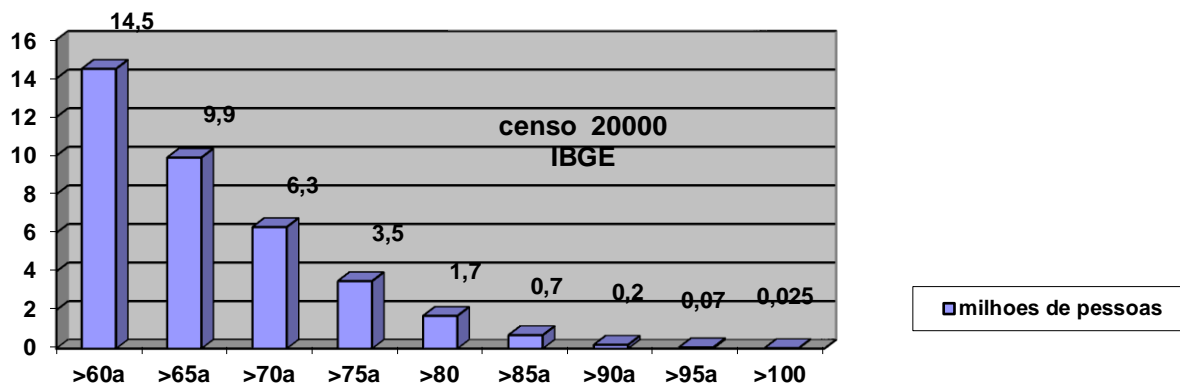


Tabela 1- número de indivíduos com mais de 60 anos no Brasil

No mundo todo, para o ano 2010, espera-se encontrar 18 milhões de pessoas portadoras de demência, sendo dois terços, i.e. 12 milhões, com a doença de Alzheimer.

Poucos estudos de prevalência de demência foram realizados nos países em desenvolvimento, mas as evidências sugerem que a taxa de prevalência é a mesma dos países desenvolvidos (3% da população acima dos 60 anos) (Van Dujin et al., 1996). No entanto, a maioria da população com demência em todo mundo está ainda para ser encontrada e vive em países de baixa e média renda.

Nos próximos 20 anos deverá ocorrer aumento do valor absoluto de demência, principalmente na China, Índia e América Latina (Prince, 1997).

Devido à heterogeneidade do curso da doença de Alzheimer, das dificuldades de detecção precoce, de confirmação diagnóstica, de determinação da evolução e do grau de severidade por testes neuropsicométricos por valores clínicos insatisfatórios (alta sensibilidade com baixa especificidade, ou vice-versa), bem como dos exames de imagem (por tomografia computadorizada ou ressonância magnética) também por parâmetros diagnósticos insuficientes (sensibilidade e especificidade baixas), os imunociteados sérico de S100 β e EN-e podem ser instrumentos complementares válidos. Podem possivelmente contribuir no acompanhamento do comprometimento cognitivo correlacionando-o ao grau de severidade da demência e da perda tecidual cerebral (atrofia), e de sua evolução ao longo da doença (como um marcador de declínio cognitivo), podendo auxiliar na determinação de cuidados especiais e sobrevida.

Estes resultados poderão auxiliar estudos clínicos e epidemiológicos, contribuindo tanto na fase diagnóstica quanto na prognóstica, que posteriormente incorporados à rotina clínica prática, poderá colaborar para a melhora da qualidade de vida dos pacientes e seus familiares, bem como do manejo dos pacientes por parte dos serviços de atendimento à saúde.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4. REVISÃO DA LITERATURA

De forma geral os quadros demenciais ocorrem numa freqüência semelhante em todo o mundo, que é em torno de 5% dos indivíduos acima dos 65 anos. Acima dos 80 anos, esta freqüência pode chegar a 20-25% (Heyman et al., 1984; Van Dujin et al., 1991). De todas as causas, a doença de Alzheimer costuma corresponder a 50% ou mais de todos os casos de demência, seguida pela demência vascular e pela combinação das duas. Nos países de economia em desenvolvimento, onde os sistemas de saúde e educação são precários, a demência vascular ocupa o primeiro lugar em freqüência, seguida pela doença de Alzheimer e a combinação das duas (Chaves, 1995).

Embora o diagnóstico definitivo da doença de Alzheimer requeira autópsia e amostras de tecido cerebral, não é necessário esperar até a morte para saber, com um certo grau de certeza, o que provoca os sintomas e comportamentos observados. O diagnóstico clínico inclui a história completa do paciente e de sua família, o exame físico, revisão do uso de fármacos, exame neurológico e testagem neuropsicológica, avaliação psiquiátrica, e testes laboratoriais.

A acurácia e a disponibilidade de diagnóstico clínico têm melhorado significativamente nos últimos anos, sendo que diversos estudos têm mostrado que estes apresentam acurácia em torno de 81-88% em relação às autópsias (Geldmacher, 1999).

O diagnóstico clínico oferece um grande número de benefícios. Poderá identificar demência provocada por condições reversíveis (reações a drogas, tumores, infecções, problemas da tireóide ou deficiências nutricionais) o que em alguns casos, quando tratadas, a demência pode desaparecer. É importante lembrar que mesmo as condições reversíveis se não identificadas, e conseqüentemente não tratadas, podem causar lesão permanente. Nas demências irreversíveis poderá ser útil para identificar a presença de outros problemas clínicos, que podem estar complicando a doença que

produz a demência, como no caso de Alzheimer, e que podem ser tratados. A qualidade de vida do paciente pode ser melhorada se condições tratáveis forem controladas (Alzheimer's Association, 1999). Mas mesmo assim, falha para detectar o déficit cognitivo decorrente da demência, especialmente da doença de Alzheimer, ocorre em 21% a 72% dos pacientes, e mais freqüentemente no início do curso da doença, porque as alterações cognitivas podem não ser identificadas pela avaliação. Ou, então, o déficit cognitivo é identificado mas acaba sendo classificado como aquele que pode ser observado no envelhecimento normal. Para diminuir esta falha, muitos marcadores bioquímicos foram pesquisados no líquido, soro sanguíneo e tecidos humanos, como neurotransmissores e proteínas que são encontradas nas lesões do sistema nervoso central características da doença de Alzheimer. Muitos marcadores se mostraram insatisfatórios ou insuficientes, ou ainda inviáveis para o uso clínico (Corey-Bloom et al, 1993), não havendo ainda nenhum marcador biológico de uso clínico comprovado.

O diagnóstico precoce é importante porque permite tratamento na fase inicial de uma demência reversível, mas principalmente e de forma mais freqüente auxilia o alívio do sofrimento desnecessário para o paciente portador de doença não reversível (Alzheimer) e sua família. O planejamento precoce, iniciado quando os sintomas de demência são leves, também pode ser mais efetivo e pode mesmo auxiliar a limitar o peso financeiro e psicológico sobre o paciente e cuidador por prepará-los para lidar com a doença. Pode permitir ao próprio doente participar no planejamento dos cuidados e das decisões a serem tomadas. Uma vez que o diagnóstico tenha sido feito, planejar o manejo da doença, tratar problemas médicos concomitantes e identificar fontes e recursos que poderão ser necessárias, podem ser iniciados.

4.1. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é uma doença cerebral degenerativa com demência progressiva. Aspectos clínicos incluem perda gradual de memória, alterações de linguagem e da habilidade para executar tarefas rotineiras, desorientação, dificuldade de aprendizado e mudanças na personalidade (Corey-Bloom et al, 1993).

As dificuldades discretas da memória costumam ser o primeiro sintoma. Alterações de personalidade, como perda de interesse e apatia, freqüentemente ocorrem a seguir. O prejuízo de memória piora gradualmente e aparecem déficits em outras áreas cognitivas, como julgamento, raciocínio abstrato, cálculo, e habilidades viso-espaciais. Às vezes já no início, mas mais freqüentemente nos estágios intermediários da doença, uma afasia de fluência começa como uma dificuldade para nomear objetos ou escolher a palavra certa para expressar uma idéia (anomia). Esta afasia é progressiva em muitos pacientes, especialmente naqueles com doença de início precoce, levando a uma perda total da seqüência lógica da fala. Apraxia também ocorre e pode caracterizar um grande problema para os cuidadores. Nos estágios finais da doença, os pacientes apresentam grande alteração do ciclo sono/vigília, e tendem a perambular, tornarem-se episodicamente agitados e irritáveis e perdem a capacidade de atender suas necessidades pessoais como se vestir, alimentar-se e executar higiene pessoal. A demência da doença de Alzheimer, apresenta-se com um início insidioso e curso com deterioração progressiva. Caracteriza-se por um diagnóstico clínico e patológico combinado, que só pode ser atingido de forma definitiva quando um paciente satisfaz os critérios clínicos e apresenta na biópsia cerebral ou exame pós-mortem as alterações histológicas da doença (inúmeras placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares no hipocampo e neocórtex).

A causa da doença de Alzheimer é ainda desconhecida. O que se sabe a partir de pesquisas recentes e em andamento é que uma variedade de fatores, genéticos e ambientais, levam às alterações neuropatológicas no cérebro do que chamamos de doença de Alzheimer. Múltiplos fatores ambientais e genéticos auxiliam ou estimulam a cascata de alterações patológicas no cérebro. Enquanto a "primeira causa" (ou "primeiras causas") da doença de Alzheimer não tenha sido determinado com certeza, o conhecimento acumulado até agora sobre estas alterações são objeto da compreensão do processo da doença, concepção de terapias para combater ou reduzir a progressão da doença, e oferecer esperança de interferir com o surgimento da doença em populações de idosos vulneráveis (DeKosky, 1999).

As alterações neuropatológicas e bioquímicas da doença de Alzheimer podem ser divididas em duas áreas gerais: modificações estruturais e alterações nos neurotransmissores/ sistemas neurotransmissores. As modificações estruturais incluem os envelados neurofibrilares, placas neuríticas e alterações do metabolismo amilóide, bem como as perdas sinápticas e morte neuronal. O declínio cognitivo é acompanhado do surgimento destas lesões caracterizadas pela deposição fibrilar extracelular de polipeptídios derivados de glicoproteínas denominadas β -APP (“ β -amyloid precursor protein”) e por emaranhados filamentosos intraneuronais formados por proteínas tau em um arranjo denominado PHF (“paired helical filaments”), ou seja filamentos helicoidais pareados. Tais depósitos amilóides são distribuídos principalmente nas paredes dos vasos cerebrais, placas neuríticas e lesões difusas nos gânglios da base e no cerebelo. Nas placas neuríticas típicas encontramos processos neuronais (com PHF), processos astrocíticos e microglia. As β -APP têm origem em um gene do cromossomo 21 (Small, 1998). O envolvimento de outros cromossomos, além do 21, tem sido investigado. Nos cromossomos 1 e 14 estão genes de proteínas envolvidas no processamento das β -APP e no 19 estão genes da apolipoproteínas E que interagem com as proteínas tau na gênese dos PHF (Cummings et al ,1998; Levy-Lahad et al., 1995; Oliveira e Zatz, 1999).

4.2. Proteína S100 β

4.2.1. Histórico da proteína S100 β :

A proteína S100 β foi descrita primeiramente por Moore em 1965, durante um experimento de mapeamento protéico de extratos solúveis de cérebro e fígado bovino, no qual ele buscava encontrar proteínas exclusivas ou únicas do sistema nervoso (Kapzinski, Quevedo & Izquierdo, 2003). O mapeamento foi feito por eletroforese em gel de amido, e uma banda de proteína em especial chamou a atenção por se mover mais rapidamente sem sobreposição de outras proteínas e por estar presente nos extratos de cérebro, mas ausente nos de fígado. Devido à solubilidade parcial dessa proteína em solução de sulfato de amônio 100% saturado e pH neutro, ela foi denominada “S100”. Na época, Moore sugeriu que esta seria uma proteína de origem neuronal. Posteriormente,

foi demonstrado que a fração S100 isolada de tecido cerebral continha predominantemente uma mistura de dois políptídeos, α e β , constituindo as duas isoformas da S100: α_1 (dímero α - α) e β (dímero β - β). Atualmente, sabe-se que a proteína S100 β faz parte da família de proteínas ligante de cálcio denominada S100 e está presente em altas concentrações no citosol dos astrócitos, mas também já foi imunodetectada em células de Schwann, melanócitos, adipócitos, condrócitos e células epidermais de Langerhans. Desde o isolamento e caracterização da S100 β e da S100 α_1 , 19 proteínas já foram descritas como sendo componentes da família S100.

4.2.2 Propriedades funcionais:

Apesar de a proteína S100 ter sido descrita há mais de 30 anos, suas funções biológicas ainda não foram totalmente identificadas e compreendidas; entretanto, tem sido relatado que essa família apresenta atividades tanto intra como extracelulares. Embora detectada extracelularmente, a concentração intracelular é muito maior, o que sugere que, nesse compartimento, as proteínas S100 funcionam como proteínas receptoras de cálcio. Dentro das células, elas têm sido relacionadas a funções biológicas, tais como: (a) regular a fosforilação de proteínas constituintes do citoesqueleto, como proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e proteínas associadas a microtúbulos; (b) modular a atividade de enzimas como ATPase, adenilato ciclase e aldolase; (c) modular o ciclo celular. A S100 β pode ser secretada fisiologicamente e estimular extracelularmente a diferenciação neuronal e a proliferação glial.

Azmitia e colaboradores mostraram que a secreção da proteína S100 β poderia ser estimulada pelo neurotransmissor serotonina, por meio dos receptores 5-HT $1A$ presentes nos astrócitos. Em contrapartida, a proteína liberada pelos astrócitos provocaria a liberação de mais serotonina pelos neurônios. Já foi demonstrado que o tratamento crônico com antidepressivos promove o aumento da expressão da S100 β no hipocampo. Dessa forma, a S100 β pode ser um dos fatores que medeiam as ações neurotróficas de antidepressivos serotoninérgicos. Os mecanismos que envolvem a secreção da S100 β e a ativação desses processos ainda são objetos de investigações.

4.2.3 Os astrócitos e a proteína S100 β

Pode-se dizer que aproximadamente 95% da S100 β corporal está localizada no cérebro e principalmente nos astrócitos. Entre as células gliais, os astrócitos são as mais abundantes e desempenham um papel importante, que está relacionado à homeostasia e a integração dos processos neuroquímicos, e não unicamente ao suporte estrutural. Os astrócitos também liberam fatores neurotróficos e citocinas, orientam o desenvolvimento neuronal, direcionam o crescimento dos axônios, regulam o metabolismo dos neurotransmissores e os níveis dos íons extracelulares. Outro importante papel atribuído aos astrócitos é a sua participação tanto na formação quanto na manutenção da integridade da barreira hematoencefálica. Portanto, alterações funcionais ou estruturais nos astrócitos podem afetar a atividade neuronal e das próprias células gliais, resultando em comprometimento do sistema nervoso central (SNC). Nesse contexto que envolve aspectos estruturais e funcionais dos astrócitos, a proteína S100 β tem recebido muita atenção da comunidade científica, tanto em relação nas patologias quanto em relação as funções fisiológicas. No desenvolvimento do sistema nervoso, ocorre uma série de eventos coordenados que inclui a regulação da proliferação e diferenciação celular, sendo que a proteína S100 β tem sido implicada nesses processos. Recentemente, Portela e colaboradores, 2002 demonstraram que, em indivíduos hígidos desde neonatos até os 70 anos, os níveis da proteína S100 β apresentam uma correlação negativa com a idade, isto é, quanto mais jovem o indivíduo, maiores os níveis sanguíneos dessa proteína. Tal resultado está de acordo com a idéia do envolvimento da S100 β nos processos de desenvolvimento e maturação do SNC.

4.2.4 A proteína S100 β como marcadora de dano ao sistema nervoso

central

Embora o papel fisiológico da proteína S100 β ainda não seja completamente conhecido, está bem descrito que seus níveis no sangue e no líquido estão aumentados em vários distúrbios agudos: traumatismo craniano (Herrmann e cols 1999; Pleines et al., 2001; de Kruijk, 2001) hipotensão induzida, mania aguda (Machado-Vieira et al., 2002) bypass arteriocoronariano (Basile e cols, 2001; Rasmussen e cols 2002), de crônicos, no líquido de pacientes com DA envolvendo o SNC. (Peskind e cols. 2001) Tem sido demonstrado que a quantificação dos níveis da proteína S100 β em LCR (Líquido céfalo-raquidiano) e sangue correlaciona-se com a intensidade e as extensões das lesões do SNC, o que permite a sua utilização em estudos como marcador bioquímico de dano funcional ou estrutural ao SNC. O aumento dos níveis da proteína S100 β no líquido e no sangue pode refletir gliose reativa, lesão estrutural ao astrócito, bem como alterações na barreira hematoencefálica.

4.2.5 Proteína S100 e Doenças Neurodegenerativas

Estudos com o objetivo de esclarecer o envolvimento potencial da S100 β em processos neurodegenerativos e os mecanismos pelos quais ela exerce seus efeitos têm sido tratados com grande interesse nos últimos anos

A S100 β é uma citocina derivada de astrócitos, de uma família de proteínas ácidas, muito solúveis, de baixo peso molecular (Boyes et al, 1986; Van Eldik and Zimmer, 1987; Donato, 1999), que promove sobrevivência e desenvolvimento neuronal, crescimento neurítico e síntese de precursores da proteína β amiloide (β -APP) em neurônios e neuritos (Donato, 1999).

A S100 β é um homodímero de 21 kDa com dois sítios de cálcio do tipo "EF hand"/monômero envolvida na modulação da atividade de outras proteínas. Muitos alvos intracelulares da proteína S100 β têm sido descritos, tais como a proteína tau (τ) associada a microtúbulos, a GFAP e a vimentina, proteínas de filamentos intermediários em astrócitos, a B-50 e a MARCKS associadas ao desenvolvimento celular e a p53, uma

proteína pró-apoptótica (Fanò et al, 1996). A fosforilação de todas estas proteínas é modulada pela S100 β . Em nosso laboratório demonstramos que a fosforilação da GFAP pode ser inibida pela S100 β (Ziegler et al, 1998). Embora sem evidências definitivas acredita-se que esta proteína tenha muitos papéis intracelulares modulando o crescimento e diferenciação celular, através de seus alvos protéicos no núcleo, no citoesqueleto e na membrana.

A presença extracelular da proteína S100 β tem um efeito mitogênico sobre células astrogliais, bem como neurotrófico sobre neurônios (Kligman e Marshak, 1985; Selinfreund et al, 1991). Os efeitos tróficos de S100 β são observados *in vitro* em concentrações de pM a nM (Donato, 1999). Entretanto, níveis micromolares, como os observados em doenças neurodegenerativas, poderiam ser deletérios ao tecido nervoso. De fato, níveis micromolares de S100 β podem levar à morte por apoptose de neurônios e astrócitos *in vitro*, por uma via dependente de óxido nítrico (Hu et al, 1997).

Muitos estudos têm sugerido que a S100 β pode ser um marcador clínico de valor para a avaliação de lesão cerebral numa variedade de situações clínicas (dano ou doença), como pós cirurgia cardíaca (Kumar et al., 1997; Van Dongen et al., 1998; Rasmussen et.al.,2002), parada cardíaca (Basile et.al., 2001), AVE isquêmico (Mokuno et al., 1983; Persson et al., 1987), trauma craniano (Herrmann et.al.,2001; Kruijk et.al.,2001), doença de Creutzfeldt-Jakob; (Green et al., 1997ab,) e no envelhecimento normal (Portela et.al., 2002). Na doença de Alzheimer, cujas lesões histológicas são bastante similares às encontradas na síndrome de Down, a proteína S100 β pode ter um papel ativo na etiopatogenia da doença (Whitaker-Azmitia et al, 1997). Os astrócitos nas placas neuríticas, de tecido cerebral de necrópsia de pacientes portadores de doença de Alzheimer, contêm elevados níveis da proteína S100 β (Griffin et al,1989). Várias observações sugerem o envolvimento da proteína S100 β na doença de Alzheimer, como o elevado imunocontéudo no tecido cerebral, no líquido e no sangue (Griffin et al, 1989; Singh et al, 1994; Green et al, 1997a), a interação com proteínas tau, as quais são anormalmente fosforiladas nos PHF, e a localização gênica no cromossomo 21, mais especificamente na região 21q22.2-22.3 referida como DSCR1 (“Down Syndrome

Chromosome Region 1”), que está relacionada ao fenótipo da síndrome de Down como o retardo mental (Mito et al, 1993).

Os estudos com tecido cerebral humano post-mortem (Griffin et al., 1989; Marshak et al., 1990; Sheng et al., 1994; Van Eldik and Griffin, 1994; Mrazek et al., 1996; Sheng et al., 1997; Griffin et al., 1998;), animais (Sheng et al., 2000) e cultura de células (Hu et al., 1997; Hu and Van Eldik, 1999), implicam a S100 β na patogênese das placas neuríticas da doença de Alzheimer. Já foi demonstrado que os níveis da S100 β biologicamente ativa estão elevados no tecido cerebral de necrópsia de pacientes com DA (Marshak et al., 1991), e que esta elevação é diretamente relacionada à patologia neurítica τ -positiva (Sheng et al., 1994, 1997), e à difusão da patologia da placa neurítica através das regiões cerebrais (Van Eldik and Griffin, 1994). Além disso, o número de astrócitos associados às placas neuríticas, super-expressando S100 β , correlaciona-se com a densidade de neuritos distróficos exageradamente crescidos, super-expressando β -APP, nas placas neuríticas individuais bem como nos campos ricos em placas de cérebros com Alzheimer (Mrazek et al., 1996). Estes achados em conjunto com as funções biológicas estabelecidas para a S100 β são consistentes com um papel para a S100 β na produção dos neuritos distróficos na DA, um passo necessário na transformação dos depósitos amilóides benígnos (do envelhecimento normal) nas placas neuríticas diagnósticas de DA.

4.3 Proteína EN-e

Muitas substâncias são lançadas no líquido cérebro raquidiano e no sangue durante a lesão no cérebro mas o marcador ideal de dano cerebral tem que satisfazer certos requisitos: estar localizado intracelularmente, estar presente em alta concentração no tecido cerebral e finalmente , ser relativamente fácil sua detecção. A proteína Enolase Neurônio-específico (EN-e) como mencionado, pode ser um possível marcador de dano no tecido cerebral.

A Proteína enolase neurônio-específico (EN-e) é uma proteína intracelular, predominantemente presente no citoplasma do neurônio e em células neuro-endócrinas em insignificantes concentrações. É uma iso-enzima da via glicolítica, específica para para phosphoglycerate e phosphoenolpyruvate (2-phospho-D-glycerate-hydrolase, EC. 4.1.11). É uma enzima altamente solúvel, sendo facilmente liberada no líquido e no sangue, após algum dano cerebral, com uma meia-vida de 48 horas (Marangos et al., 1987).

A EN-e constitui por volta de 1.5% de toda a massa de proteínas do cérebro. O papel da EN-e no sistema nervoso central não está completamente elucidado mas alguns estudos relatam sua função neuroprotetora. Descreve-se que durante o desenvolvimento do SNC a EN-e toma parte na formação de estruturas da membrana e está envolvido em todos os processos celulares dependentes de energia (Hattori et al., 1995; Sesenbrenner et al., 1997).

A EN-e é também necessária para a manutenção da excitabilidade da membrana neuronal (Kaiser et al., 1989). É sabida sua participação na regulação da resposta ao stress, e nos processos reparativos do cérebro. (Sesenbrenner et al., 1997; Horn et al., 1995). Células tumorais, neuroblastoma, seminoma, e o tumor de pequenas células do pulmão podem produzir EN-e, a qual é seguida por um aumento desta enzima no plasma (Cooper et al., 1985; Oremek et al., 1993).

Estudos experimentais mostram um aumento da EN-e no plasma e no líquido após isquemia no cérebro de animais de laboratório (Horn et al., 1995; Barone et al., 1993; Hardemark et al., 1989) e em humanos. (Cunningham, et al., 1996). Baseado nestes fatos seria importante estudar os níveis de EN-e em patologias como a DA a nível periférico e sua relação com algumas variáveis da doença como idade, sexo, gravidade (escala CDR- escala de avaliação de demência - Morris, 1997; Hughes, 1982 e grau de comprometimento cognitivo (teste Mini Mental - Folstein et al., 1975)

5. OBJETIVOS

5. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Investigar o imunoconteúdo por método de quimioluminescência de S100 β e EN-e como marcadores na doença de Alzheimer e da sua gravidade, em relação a idosos normais da comunidade.

Objetivos específicos:

1. Avaliar o imunoconteúdo de S100 β e EN-e séricos de pacientes com diagnóstico clínico provável de doença de Alzheimer comparando à variabilidade do mesmo numa amostra de voluntários normais;
2. Comparar os níveis séricos de S100 β e EN-e entre os níveis de gravidade da doença (escala CDR);
3. Correlacionar os níveis séricos de S100 β e EN-e com o desempenho cognitivo (Mini Exame do Estado Mental - MMSE), idade e sexo dos pacientes com DA e dos idosos normais;
4. Avaliar a variabilidade dos níveis séricos de S100 β e EN-e nos idosos normais da comunidade com idade acima de 80 anos, comparando-os com os mais jovens.

6. REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Azmitia EC, Griffin WS, Marshak DR, Van Eldik LJ, Whitaker-Azmitia PM . S100 beta and serotonin: a possible astrocytic-neuronal link to neuropathology of Alzheimer's disease. Prog Brain Res, 1992; 94:459-73

Barone FC, Clark RK, Price WJ, White RF, Feuerstein G, Storer BL. Neuron-specific enolase increases in cerebral and systemic circulation following focal ischemia. Brain Res 1993; 623: 77–82.

Basile AM, Fusi C, Conti AA, Paniccia R, Trefoloni G, di Carlo A, Noferi D, Carbonetto F, Pretelli P, Calamai G, Vaccari M, Abbate R, Inzitari D. S-100 protein and neuron-specific enolase as markers of subclinical cerebral damage after cardiac surgery: preliminary observation of 6-month follow up study. Eur Neurol 2001; 45:151-9.

Boyes BE, Kim SU, Lee V, Sung SC .Immunohistochemical co-localization of S-100b and the glial fibrillary acidic protein in rat brain. Neuroscience, 1986; 17:857-65

Chaves MLF Demências. Taborda JG; Prado-Lima P; Busnello ED (eds.). Rotinas em Psiquiatria, Porto Alegre: Artes Médicas. (1995)

Cooper EN. Neuron-specific enolase as a marker of (small cell) cancers of neuronal and neuroendocrine origin. Biomed Pharmacother 1985; 39: 165–166.

Corey-Bloom J, Galasko D and Thal LJ. Clinical features and natural history of Alzheimer's disease. *IN Neurodegenerative Diseases*, ed by DB Calne, WB Saunders Company, London, Chap 37. 1993

Cummings JL, Vinters HV, Cole GM, Khachaturian ZS. Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. *Neurology*, 1998 51:S2-17; discussion S65-7

Cunningham R, Watt M, Winder J, Mckinstry S, Lawson J, Johnston C, et al. Serum neurone-specific enolase as an indicator of stroke volume. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 298-303.

de Kruijk JR, Leffers P, Menheere PP, Meerhoff S, Twijnstra A. S-100B and neuron-specific enolase in serum of mild traumatic brain injury patients: a comparison with health controls. *Acta Neurol Scand*. 2001;103(3):175-9.

DeKosky, ST. Molecular and Pathological Mechanisms in Alzheimer's Disease. In: *Dementia Update*. American Academy of Neurology 1999 Annual Education Program - Syllabi-on-CD-ROM.

Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta*, 1999; 1450:191-231

Fanò G, Biocca S, Fulle S, Mariggio MA, Belia S, Calissano P. The S-100: a protein family in search of a function. *Prog Neurobiol*, 1995; 46:71-82

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*, 1975; 12(3):189-98.

Fundação IBGE. (1997) Anuário Estatístico do Brasil. Rio de Janeiro.

Geldmacher, DS. Alzheimer's disease. Neurobase- CD-ROM. Third 1999 Edition. Copyright (c) 1993-1999 Arbor Publishing Corp.

Green AJ, Harvey RJ, Thompson EJ, Rossor MN. Increased S100beta in the cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal dementia. *Neurosci Lett*, 1997a; 235:5-8

Green AJ, Keir G, Thompson EJ . A specific and sensitive ELISA for measuring S-100b in cerebrospinal fluid. *J Immunol Methods*, 1997b; 205:35-41

Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL 3d, Araoz C. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989; 86:7611-5

Hattori T, Takei N, Mizuno Y, Kato K, Kohsaka S. Neurotrophic and neuroprotective effects of neuron-specific enolase on cultured neurons from embryonic rat brain. *Neurosci Res* 1995; 21: 191–198.

Hardemark H, Ericsson N, Kotwica Z, Rundstrom G, Mendel-Hartvig I, Olsson Y, et al. S-100 protein and neuron-specific enolase in CSF after experimental traumatic or focal ischemic brain damage. *J Neurosurg* 1989; 71: 727–731.

Herrmann M, Curio N, Jost S, Wunderlich MT, Synowitz H and Wallesch CW, Protein S-100B and neuron specific enolase as early neurobiochemical markers of the severity of traumatic brain injury, *Restor Neurol Neurosci*, 1999; 14: (2–3), pp. 109–114.

Herrmann,M. High serum S100B levels for trauma patients without head injuries. *Neurosurgery*, 2001; v49, p1272-3

Hu J, Ferreira A, Van Eldik LJ. S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem*, 1997; 69:2294-301

Horn M, Seger F, Schlote W. Neuron-specific enolase in gerbil brain and serum after transient cerebral ischemia. *Stroke* 1995; 26: 290–297.

Kaiser E, Kuzmits R, Pregant P, Burghuber O, Worofka W. Clinical biochemistry of neuron-specific enolase. *Clin Chim Acta* 1989; 183: 13–31.

Kapczinski F, Quevedo J, Izquierdo I e cols. *Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos* - 2.ed. 2003

Kligman D, Marshak DR . Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985; 82:7136-9

Kumar P, Dhita K, Hossein-Nia M, Pate 1S, Holt D, Treasure T. S-100 protein release in a range of cardiothoracic surgical procedures. *Thorac Cardiovasc Surg*.1997 ;113(5):953-4

Levy-Lahad E et al. A familial Alzheimer's disease locus on Chromosome 1. *Science*, 1995; 269: 970-972.

Machado-Vieira R, Lara DR, Portela LV, Gonçalves CA, Soares JC, Kapczinski F, Souza DO. Elevated serum S100 β protein in drug-free bipolar patients during first manic episode: a pilot study. *Eur. neuropsychopharmacol*, 2002; v.12,p.269-72,

Marangos PJ, Schmechel DE. Neuron-specific enolase, a clinically useful marker for neurons and neuroendocrine cells. *Ann Rev Neurosci* 1987; 10: 269–295.

Marshak DR. S100beta as a neurotrophic factor. *Prog Brain Res*, 1990;86:169-81

Mito T, Becker LE. Developmental changes of S-100 protein and glial fibrillary acidic protein in the brain in Down syndrome. *Exp Neurol*, 1993; 120:170-6.

Mokuno K, Kato K, Kawai K, Matsuoka Y, Yanagi T, Sobue I. Neuron-specific enolase and S-100 protein levels in cerebrospinal fluid of patients with various neurological diseases. *J Neurol Sci.*, 1983 ; 60(3):443-51.

Morris JC. Clinical dementia rating: a reliable and valid diagnostic and staging measure for dementia of the Alzheimer type. *Int Psychogeriatr*. 1997; 9 Suppl 1:173-6; discussion 177-8.

Nitrini R, Caramelli P, Herrera E Jr, Bahia V S, Caixeta L F, Radanovic M, Anghinah R, Charchat-Fichman H, Porto C S, Carthery M T, Hartmann A P J, Huang N, Smid J, Lima E P, Takada L T, Takahashi D Y. Incidence of Dementia in a Community-Dwelling Brazilian Population. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, 2004; 8(4):241-246.

Oliveira JR, Zatz M () The study of genetic polymorphisms related to serotonin in Alzheimer's disease: a new perspective in a heterogenic disorder. *Braz J Med Biol Res*, 1999; 32:463-7

Oremek GM, Boeckmann W, Seiffert UB, Jonas D. Neuron-specific enolase (NSE)-a tumor marker in metastatic seminoma: a comparison of methods. *Lab Med* 1993; 17: 34–35.

Persson L, Handemark HG, Gustafsson J, Rundstrom G, Mendel-Hartvig I, Esscher T and Pahlman S. S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system, *Stroke*, 1987; 18, pp. 911–918.

Peskind, E.R. et al. Cerebrospinal fluid S100 β is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochem.int.*, 2001; v39, p.409-13

Pleines UE, Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Joller H, Trentz O, Kossmann T. S-100 beta reflects the extent of injury and outcome, whereas neuronal specific enolase is a better indicator of neuroinflammation in patients with severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 2001 ;18(5):491-8.

Portela LV, Tort AB, Schaf DV, Ribeiro L, Nora DB, Walz R, Rotta LN, Silva CT, Busnello JV, Kapczinski F, Goncalves CA e Souza DO, The serum S100B concentration is age dependent, *Clin Chem*, 2002; 48, pp. 950–952.

Portela L.V.C., Lara D.R., Souza.D.O.G. A proteína S100 β na Neuropsiquiatria, capítulo 38, p 483-487, em: Kapczinski, Quevedo & Izquierdo, *Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos*, Artes médicas do Sul, 2003

Prince M . The need for research on dementia in developing countries. *Trop Med Int Health* , 1997; 2:10 993-1000

Rasmussen LS, Christiansen M, Eliassen K, Sander-Jense K, Moller JT. Biochemical markers for brain damage after cardiac surgery: time profile and correlation with cognitive dysfunction. *Acta Anaesthesiol.Scand.*, 2002; v46,p547-51

Scazufca M., Cerqueira ATAR, Menezes PR, Prince M, Vallada HP, Miyazaki MCOS, Domingos NAM, Antunes EH, Macedo GC, Almeida SA e Matsuda CMCB. Epidemiological research on dementia in developing countries *Rev Saude Publica*, 2002; 36(6):773-8

Selinfreund RH, Barger SW, Pledger WJ, Van Eldik LJ. Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991; 88:3554-8

Sesenbrenner M, Lucas M, Deloulme J. Expression of two neuronal markers, growth-associated protein 43 and neuron-specific enolase, in rat glial cells. *J Mol Med* 1997; 75: 653–663.

Sheng JG, Mrak RE, Griffin WS S100 beta protein expression in Alzheimer disease: potential role in the pathogenesis o neuritic plaques. *J Neurosci Res.*, 1994; v 1;39(4):398-404

Singh VK. Studies of neuroimmune markers in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, 1994; 9:73-81

Small DH (1998) The role of the amyloid protein precursor (APP) in Alzheimer's disease: does the normal function of APP explain the topography of neurodegeneration? *Neurochem Res*, 23:795-806

Sorci G, Bianchi R, Giambanco I, Rambotti MG, Donato R (1999) Replicating myoblasts and fused myotubes express the calcium-regulated proteins S100A1 and S100 β . *Cell Calcium*, 25:93-106

Van Dongen EP, ter Beek HT, Schepens MA, Morshuis WJ, Haas FJ, de Boer A, Boezeman EH, Aarts LP. The relationship between evoked potentials and measurements of S-100 protein in cerebrospinal fluid during and after thoracoabdominal aortic aneurysm surgery. *J Vasc Surg*. 1999 Aug;30(2):293-300.

V Selakovic, R Raicevic, L Radenovic (2005) The increase of neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and plasma as a marker of neuronal damage in patients with acute brain infarction. *Journal of Clinical Neuroscience* (2005) June, in press

Van Duijn CM. (1996) Epidemiology of the dementias: Recent developments and new approaches. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60:478-488.

Van Duijn C, Clayton D, Chandra V, Fratiglioni L, Graves A, Heyman A et al. For EURODEM Risk Factors Research Group. Familial aggregation of Alzheimer's disease and related disorders: a collaborative re-analysis of case-control studies. *Int J Epidemiol* (1991), 20(2) suppl. 2: 13-20.

Van Eldik LJ, Zimmer DB (1987) Secretion of S-100 from rat C6 glioma cells. *Brain Res*, 436:367-70

Vinade L, Goncalves CA, Wofchuk S, Gottfried C, Rodnight R (1997) Evidence for a role for calcium ions in the dephosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in immature hippocampal slices and in astrocyte cultures from the rat. *Brain Res Dev Brain Res*, 104:11-7

Whitaker-Azmitia PM, Wingate M, Borella A, Gerlai R, Roder J, Azmitia EC (1997) Transgenic mice overexpressing the neurotrophic factor S-100 beta show neuronal cytoskeletal and behavioral signs of altered aging processes: implications for Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Brain Res*, 776:51-60

Ziegler DR, Innocente CE, Leal RB, Rodnight R, Goncalves CA (1998) The S100 β protein inhibits phosphorylation of GFAP and vimentin in a cytoskeletal fraction from immature rat hippocampus. *Neurochem Res*, 23:1259-63

Zhu SG, Sheng JG, Jones RA, Brewer MM, Zhou XQ, Mrak RE, Griffin WS (1999) Increased interleukin-1 β converting enzyme expression and activity in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58:582-7

7. ARTIGO EM INGLÊS

S100 β , but not NSE, serum levels differentiate mild from severe Alzheimer`s disease patients

**Eduardo D. Ferreira^b, Isabel Piazenski^b, Alberto Maia^b, Luis V.C. Portela^a,
Diogo O. Souza^a and Márcia L.F. Chaves^b ✉**

^aDepartamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Ramiro Barcelos 2600
90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^bServiço de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350,
90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Keywords: Alzheimer disease; S100 β protein; Neuron-specific enolase;

Neurodegenerative disorders; Biochemical markers

Corresponding author:

Marcia L. F. Chaves

Serviço de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350,
90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: 55-51-2101.8520

e-mail: mchaves@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Objective(s): We evaluated S100 β and neuron-specific enolase (NSE) serum levels in mild, moderate and severe Alzheimer's disease (AD) patients. We also analyzed S100 β and NSE serum levels in community healthy elderly. **Methods:** We carried out a cross-sectional study with 36 Alzheimer's disease patients and 66 community-dwelling healthy elderly. The Alzheimer's disease patients were those who met the probable NINCDS-ADRDA criteria. The AD diagnosis was assigned following the application of the Mini Mental State examination and the Clinical Dementia Rating (CDR) scale. A sample of community-dwelling cognitively normal elderly individuals was recruited from the catchment area of the same hospital. The inclusion criteria were age greater than 60 years and cognitively normal (CDR=0). Educational attainment was checked for all participants. Blood samples (3 ml) were collected without anticoagulants by venipuncture. Serum was obtained by centrifugation at 3000g for 5 min and, soon thereafter, was frozen at -70 °C until analysis. **Results:** In AD, S100 β levels were significantly different between mild and severe dementia ($P=0.02$). There was a tendency for a difference between mild and moderate AD patients ($P=0.06$; Mann-Whitney $U=26.00$). NSE did not show significant difference among dementia severity. S100 β levels marginally correlated with MMSE scores (Spearman $r=-0.33$; $P=0.05$), but not with age (Spearman $r=-0.05$; $P=0.76$). There was no statistically significant difference between S100 β and NSE serum levels of AD and community elderly. In healthy elderly, S100 β ($r=-0.02$; $P=0.90$) and NSE levels did not vary with age ($r=0.18$; $P=0.21$). NSE levels were higher among men than women ($P=0.049$), and S100 β was similar. The healthy elderly older than 80 years of age did not show difference in S100 β and NSE levels compared with those younger than eighty years of age. **Conclusions:** It seems that NSE and S100B do not have a diagnostic role as peripheral markers in AD, but serum S100B may have a potential role as a marker of the degree of severity of this disease.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is one of the fastest growing neurological conditions in developed countries and is the leading cause of dementia (1). More than 4 million people in the United States suffer from dementia, most with Alzheimer's disease. Given the rapid aging of the population, the number of people suffering from AD is expected to quadruple by the middle of the century unless interventions are found to delay the onset or prevent the disease (2). The incidence of dementia in Brazil has been reported as 13.8 per 1000, and AD as 7.7 per 1000 for community-dwelling individuals aged 65 years and more. The incidence rates of dementia almost doubled with every 5 years of age. There was no difference according to gender, but women had a higher incidence of dementia, predominantly AD, in very old age (3).

Alzheimer's disease is not a normal consequence of aging, although the increasing age is the greatest risk factor for the disorder. One in 10 individuals aged 65 years and older has AD, and the condition affects nearly half of those aged 85 years and older. As the number of Americans older than 65 doubles over the next 2 decades, the prevalence of Alzheimer disease will dramatically increase (4).

Early recognition and accurate assessment of cognitive decline can identify patients at risk for progression to AD and if is diagnosed as AD, the families can plan the future better, the treatments can start earlier, and many scientific studies can be due. The Memory Impairment Study found 10% to 15% of individuals with mild cognitive impairment, a transitional state of cognition and functionality between healthy aging and mild AD, progress to clinically probable AD each year (5).

A recent study found the lifespan of individuals diagnosed with AD is reduced by about 50%, compared with those of similar age without the disease, and that certain factors help predict long-term survival. (6) In community-dwelling elderly persons who received a diagnosis of AD survival was shorter than predicted on the basis of U.S. population data, especially with onset at younger ages, increased severity of cognitive impairment, decreased functional level, history of falls, findings of frontal release signs,

and abnormal gait. The variables most strongly associated with survival were measures of disease severity at the time of diagnosis (6).

Alzheimer's disease is characterized by the presence of two pathological structures, senile plaques and neurofibrillary tangles. Senile plaque is an extracellular structure composed of β -amyloid protein ($A\beta$), with peptides of approximately 40 amino acids cleaved from the $A\beta$ precursor protein. Neurofibrillary tangles are a bundle of abnormal, paired helical filaments, of which hyperphosphorylated tau protein is the principal component. Although the relationship between the accumulation of extracellular $A\beta$ and intracellular abnormal phosphorylated tau protein, and their relationship with neuronal cell death in AD have been discussed, it remains unclear whether $A\beta$ deposits lead to the accumulation of hyperphosphorylated tau protein (7)

There is no definitive ante-mortem diagnostic test for AD. Also, when the clinical diagnostic is done, there is no easy way to know the degree of neuronal cells loss (8). Therefore, a peripheral marker of AD would be of great interest to complement the clinic evaluation.

S100 β is a calcium binding protein mostly produced and released by astrocytes in the central nervous system (CNS) (9). It has intracellular functions, like modulation of cytoskeleton proteins and regulation of cellular cycles, and extracellular functions, which are dependent on concentration. At nanomolar concentrations, S100 β has neurotrophic and gliotrophic actions, possibly having important roles in normal CNS development and recovery after injury. At micromolar concentrations, it may be toxic, producing neuronal and glial cell death by apoptosis (10).

Considering its prevalence in the CNS, several studies have been aimed at investigating its potential role as a peripheral biochemical marker of neuronal injury, possibly involving reactive gliosis, astrocytic death and/or blood-brain-barrier dysfunction (11). Elevated cerebrospinal fluid (CSF) or serum S100 β levels were found in several acute and chronic brain pathologies, including traumatic brain injury (12,13), stroke (14), Alzheimer's disease (15,16), schizophrenia (17), Parkinson's disease (18), HTLV-I associated myelopathy (19) and systemic lupus erythematosus (20).

The neuron-specific enolase (NSE) is a cytoplasmatic glycolytic enzyme, whose isoform $\gamma\gamma$ is found in neurons, as well as in cells with neuroendocrine differentiation (18). Since NSE is not physiologically secreted, an increase of its serum and CSF levels is considered a marker of damage to neuronal cells, as reported in traumatic brain injury (13), stroke (21) and seizures (22). Taken together, NSE and S100 β protein could be considered, respectively, neuronal and glial peripheral markers of CNS pathologies.

In this work, we studied S100 β and NSE serum levels in patients with AD and healthy community elderly to evaluate their potential use as peripheral markers of this disease. We also assessed the effect of severity of dementia and gender on their serum levels, and the correlation with the degree of cognitive impairment and age. The effect of age older than 80 years of age on serum levels of S100 β and NSE proteins among healthy community elderly were also analyzed.

2. Methods

We carried out a cross-sectional study with Alzheimer's disease patients and community-dwelling healthy elderly.

The Alzheimer's disease patients were those who met the probable NINCDS-ADRDA criteria (23) and were recruited from the Neurogeriatric outpatient clinic of a large university hospital (HCPA) in Porto Alegre, Southern Brazil. The AD diagnosis was assigned following the application of the Mini Mental State examination (24) and the Clinical Dementia Rating (CDR) scale (25,26). The CDR scale assessed severity of dementia by coding mild, moderate and severe as 1, 2 and 3, respectively. The ischemic score of Hachinski (27) was also used. Exclusion criteria for patients were any other neurological, psychiatric (except if associated with AD), or medical disease that makes the diagnoses of Alzheimer's disease improbable. Laboratory tests included computed tomography (CT) or magnetic resonance imaging of the brain, electrocardiography, chest radiography, and an extensive biochemical evaluation with vitamin B₁₂ and folate, Lues immunofluorescence, and liver, thyroid and kidney function tests was made.

A sample of community-dwelling cognitively normal elderly individuals was recruited from the catchment area of the same hospital. The inclusion criteria were age greater than 60 years and cognitively normal (CDR=0). Educational attainment was checked for all participants.

Blood samples (3 ml) were collected without anticoagulants by venipuncture. Serum was obtained by centrifugation at 3000g for 5 min and, soon thereafter, was frozen at -70 °C until analysis.

The Ethics Committee for Medical Research of the university hospital approved the study. Informed consent was obtained from the subjects, their nearest relatives, or both.

2.2 S100 β protein

A quantitative monoclonal two-site immunoluminometric assay LIA-mat Sangtec 100 (BYK-Sangtec, Germany), was used for measuring S100 β in all participants. The immunoluminometric assay is composed of three monoclonal antibodies specific to subunit β of S100 and a tracer antibody, which is bound to isoluminol. Oxidation of isoluminol is started by injection of an alkaline peroxide solution and catalyst solution. The immunological reaction is detected by light reaction (28).

2.3 NSE

The NSE serum levels were also evaluated in all participants by electrochemiluminescence assay ECLIA (Roche Diagnostics, USA). This is a quantitative method that uses a monoclonal antibody specific for NSE and labelled with a ruthenium complex, which produces light emission.

2.4 Statistical analysis

Descriptive statistics are presented with mean and standard deviation for parametric variables, and absolute and percentage frequency for categories. Comparison between groups was made by using a parametric *t* test for NSE, and a non-parametric Mann-Whitney test for S100 β . Correlations are presented with Pearson's coefficient, for NSE with age, and with Spearman's coefficient for all S100 β correlations and for the correlations of NSE with clinical scales. Statistical analyses were carried out with the SPSS 11.0 for MacOs.

3. Results

The demographic, biochemical and clinical characteristics of patients and healthy elderly are depicted in Table 1. There was no statistically significant difference between S100 β and NSE serum levels of AD and community elderly.

In AD, S100 β levels were significantly different between mild and severe dementia (Table 2). The difference between mild and moderate stages of dementia showed a tendency for statistical significance ($P=0.06$; Mann-Whitney $U=26.00$). NSE did not present significant difference among dementia severity (Table 2). S100 β levels marginally correlated with MMSE scores (Spearman $r=-0.33$; $P=0.05$). No correlation between S100 β and age was observed (Spearman $r=-0.05$; $P=0.76$), nor between CDR and age ($P>0.05$).

In healthy elderly, S100 β ($r=-0.02$; $P=0.90$) and NSE levels did not vary with age ($r=0.18$; $P=0.21$), neither with gender ($P>0.05$). Serum levels of S100 β and NSE were similar in the healthy elderly older than 80 years of age and those younger than eighty years.

In this healthy community sample, men showed higher serum levels of NSE than women ($P=0.049$) (Table 3). No effect of gender was observed for S100 β levels.

4. Discussion

Although increased serum levels of S100 β and NSE have been found in many disorders that involve neuronal death (12,13,14,15,16,17,18,19,21) compared to normal controls, we did not observe statistically significant difference between AD patients and community elderly participants. However, we observed significant difference of S100 β serum levels between mild and severe AD patients and a tendency between mild and moderate, according to CDR scale. Moderate and severe patients presented similar S100 β serum levels. NSE serum levels were also similar among classes of severity of dementia (CDR scale).

The difference between mild and severe cases of Alzheimer's patients occurred because those most severely affected by the disease presented S100 β levels similar to healthy elderly, while patients mildly affected presented lower levels (Table 2). Alzheimer's disease patients may present lower levels of S100 β protein during the clinically mild phases of the disease, which do not correspond to the beginning of the pathology of disease. The beginning of the brain pathology of AD is believed to occur years and maybe decades before the first symptoms of disease can be noticed (29).

The increased protein levels with the increase of the AD severity could be a consequence of neural damage of other brain regions, which occurs with the progression of AD (30). This could lead to a larger reactive astrogliosis with consequent increase in serum S100 β levels (15). This fact could be because there is not a inflammatory mechanism involved in Alzheimer's pathology as in Parkinson's Disease where Schaf et al., 2005, (18) found a correlation between the low severity levels of the Parkinson's Disease and serum S100 β levels but in HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (19) and lupus erythematosus (20) where a inflammatory pathogenesis is well known.

We also observed a marginally significant negative correlation between MMSE scores and S100 β among AD patients. The higher the S100 β serum level, the lower the

MMSE score. No correlation was found between NSE levels and cognitive performance (MMSE scores).

The present results suggest that serum NSE is not a useful biological marker in Alzheimer's disease, as observed in the study of Lamour (31) in serum and Parnetti (32) in cerebrospinal fluid (CSF). The role of S100 β serum levels as biological marker in AD still needs further exploration (studies with larger samples of AD patients according to severity).

We also analyzed the effect of age (>80 years) on S100 β and NSE serum levels among normal community participants. No statistical difference on levels of S100 β and NSE was observed with increased age. Normal elderly (older than 60 years and above the age of 80) presented similar serum levels of both proteins. After a certain age, a plateau with no variation in the serum concentration of the S100 β and NSE proteins could occur. As far as we know, this is the first study to demonstrate this analysis until now.

The possibility that the concentration of S100 β in CSF might be age-dependent was based on these published reports. Sheng and co-workers, 1996, (15) studying postmortem AD and normal healthy brains, from 1 to 80 years of age, found that the level of S100 β protein increased with advancing age, and all the normal subjects values were significantly lower than those found in Alzheimer patients. Van Engelen and associates (33) studied S100 β concentrations in the CSF of patients who were undergoing neurological examination but who had no evidence of an organic neurological disease. The concentration of S100 β increased slightly with increasing age but did not differ substantially by sex. Nygaard and co-workers (34) examined patients undergoing various surgical procedures with spinal anesthesia and observed higher concentrations of S100 β in the CSF with increasing age. Also they found that S100 β concentrations in the CSF were higher in men than in women. All these groups applied analytical methods that detected predominantly CSF S100 β , but were not sensitive enough to detect S100 β concentrations in the blood of subjects.

Portela and co-workers (28), studying blood samples from neonate until 70 years of age, found that blood S100 β concentrations appear to decrease considerably in the

first two decades of life and remain relatively constant during adulthood. Wiesmann and associates (35), in blood samples of 200 healthy donors between 18 and 65 years of age, did not observe significant difference of serum S100 β concentration with increasing age and by sex.

We found no difference of serum S100 β concentrations by gender in community elderly participants. However, nondemented men showed highest NSE levels than women (Table 3). The higher CSF level of S100 β among men had been previously demonstrated (31), but no evaluations of NSE in healthy elderly.

It seems that NSE and S100 β do not have a diagnostic role as peripheral markers in AD, but serum S100 β may have a potential role as a marker of the degree of severity of this disease. While novel treatment approaches to AD are emerging, the development of biomarkers will play an important role in the early clinical diagnosis, in testing drugs that affect key pathogenetic steps in AD, and dose-response relationships (37).

5. REFERENCES

1. Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA (2003) Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol* 60: 1119-1122.
2. Brookmeyer R, Gray S, Kawas C. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset, *Am J Public Health* 1998, pp. 1337–1342.
3. Nitrini R, Caramelli P, Herrera E Jr, Bahia V S, Caixeta L F, Radanovic M, Anghinah R, Charchat-Fichman H, Porto C S, Carthery M T, Hartmann A P J, Huang N, Smid J, Lima E P, Takada L T, Takahashi D Y. Incidence of Dementia in a Community-Dwelling Brazilian Population. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*.18(4):241-246, october/November/December 2004.
4. C. Kawas, S. Gray, R. Brookmeyer, J. Fozard and A. Zonderman, Age-specific incidence rates of Alzheimer's disease The Baltimore Longitudinal Study of Aging, *Neurology* 54 (2000), pp. 2072–2077.
5. Grundman M, Petersen RC, Ferris SH, Thomas RG, Bennett DA, Foster NL, Jack CR Jr, Galasko DR, Doody R, Kaye J, Sano M, Mohs R, Gauthier S, Kim HT, Jin S, Schultz AN, Schafer K, Mulnard R, va Dyck CH, Mintzer J, Zamrini EY, Cahn-Weiner D, Thal LJ; Alzheimer's Disease Cooperative Study. Mild cognitive impairment can be distinguished from Alzheimer disease and normal aging for clinical trials. *Arch Neurol*. 2004; 61(1): 59-66.
6. Larson EB, Shadlen MF, Wang L, McCormick WC, Bowen JD, Teri L, Kukull WA. Survival after initial diagnosis of Alzheimer disease. *Ann Intern Med*. 2004 Apr 6; 140(7):501-9.
7. Rapoport M, Dawson NH, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A. Tau is essential to β -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 April 30; 99(9): 6364–6369.
8. Growdon J. Biomarkers 101. *Alzheimer's and Dementia*, 2005, 1(1-S1): 8.

9. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles, *Int J Biochem Cell Biol* 33 (2001) (7), pp. 637–668.
10. Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull* 37 (1995) (4), pp. 417–429
11. Marchi N, Rasmussen P, Kapural M, Fazio V, Kight K, Mayberg MR, Kanner A, Ayumar B, Ibensi B, Cavaglia M, Janigro D. Peripheral markers of brain damage and blood-brain barrier dysfunction, *Restor Neurol Neurosci* 2003; 21(3–4): 109–121.
12. T. Ingebrigtsen, K. Waterloo, E.A. Jacobsen, B. Langbakk and B. Romner, Traumatic brain damage in minor head injury: relation of serum S-100 protein measurements to magnetic resonance imaging and neurobehavioural outcome, *Neurosurgery* 45 (1999), pp. 468–475.
13. M. Herrmann, N. Curio, S. Jost, M.T. Wunderlich, H. Synowitz and C.W. Wallesch, Protein S-100B and neuron specific enolase as early neurobiochemical markers of the severity of traumatic brain injury, *Restor Neurol Neurosci* 14 (1999) (2–3), pp. 109–114.
14. M.T. Wunderlich, A.D. Ebert, T. Kratz, M. Goertler, S. Jost and M. Herrmann, Early neurobehavioural outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage, *Stroke* 30 (1999), pp. 1190–1195.
15. J.G. Sheng, R.E. Mrak, C. Rovnaghi, E. Kozłowska, L.J. Van Eldik and W.S. Griffin, Human brain S100 β and S100 β mRNA expression increases with age: pathogenic implications for Alzheimer's disease, *Neurobiol Aging* 17 (1996), pp. 359–363.
16. Sulkava R, Viinikka L, Erkinjuntti T, Roine R. Cerebrospinal fluid neuron-specific enolase is decreased in multi-infarct dementia, but unchanged in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1988 Apr; 51(4):549-51.
17. Lara DR, C.S. Gama, P. Belmonte-de-Abreu, L.V.C. Portela, C.A. Gonçalves, M. Fonseca, S. Hauck and D.O. Souza, Increased serum S100 β protein in

- schizophrenia: a study in medication-free patients, *J Psychiatr Res* 35 (2001), pp. 11–14.
18. Schaf DV , Tort AB, Fricke D, Schestatsky P., Portela LV, Souza DO, Rieder CR. S100 β and NSE serum levels in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2005 Jan; 11(1):39-43.
 19. R. Walz, L.V.C. Portela, A.B.L. Tort, E.C. Neto, L.N. Fernandes, C.A. Gonçalves and D.O. Souza, Serum S100 β levels in patients with HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, *Neurology* 54 (2000), pp. 2021–2022.
 20. L.V. Portela, J.C. Brenol, R. Walz, M. Bianchin, A.B. Tort, U.P. Canabarro, S. Beheregaray, J.A. Marasca, R.M. Xavier, E.C. Neto, C.A. Gonçalves and D.O. Souza, Serum S100 β levels in patients with lupus erythematosus: preliminary observation, *Clin Diagn Lab Immunol* 9 (2002), pp. 164–166.
 21. L. Persson, H.G. Handemark, J. Gustafsson, G. Rundstrom, I. Mendel-Hartvig, T. Esscher and S. Pahlman, S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system, *Stroke* 18 (1987), pp. 911–918.
 22. A.L. Rabinowicz, J. Correale, R.B. Boutros, W.T. Couldwell, C.W. Henderson and C.M. DeGiorgio, Neuron-specific enolase is increased after single seizures during inpatient video/EEG monitoring, *Epilepsia* 37 (1996) (2), pp. 122–125.
 23. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34: 939-944.
 24. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975 Nov; 12(3):189-98.
 25. Hughes CP, Berg L, Danzinger WL, et al. A new clinical scale for staging of dementia. *Br J Psychiatr* 1982; 140:566-72

26. Morris JC. Clinical dementia rating: a reliable and valid diagnostic and staging measure for dementia of the Alzheimer type. *Int Psychogeriatr.* 1997; 9 Suppl 1:173-6; discussion 177-8.
27. Hachinski VC, Iliff LD, Zilhka E, Du Boulay GH, Mc Allister VL, Marshall J, Russell RW, Symon L. Cerebral blood flow in dementia. *Arch Neurol.* 1975 Sep; 32(9):632-7.
28. L.V. Portela, A.B. Tort, D.V. Schaf, L. Ribeiro, D.B. Nora, R. Walz, L.N. Rotta, C.T. Silva, J.V. Busnello, F. Kapczinski, C.A. Goncalves and D.O. Souza, The serum S100B concentration is age dependent, *Clin Chem* 48 (2002) (6 Pt 1), pp. 950–952.
29. Godbolt AK, Cipolotti L, Anderson VM, Archer H, Janssen JC, Price S, Rossor Mn, Fox NC. A decade of pre-diagnostic assessment in a case of familial Alzheimer's disease: tracking progression from asymptomatic to MCI and dementia. *Neurocase.* 2005 Feb; 11(1):56-64.
30. Van Eldik LJ, Griffin WS. S100 beta expression in Alzheimer's disease: relation to neuropathology in brain regions. *Biochim Biophys Acta.* 1994 Sep 29; 1223(3): 398-403.
31. Lamour Y, Scarna H, Roudier M, Safer S, Davos P. Serum neuron-specific enolase in senile dementia of the Alzheimer type. *Neurosci Lett.* 1988 Mar 31; 86(2):241-4.
32. Parnetti L, Palumbo B, Cardinali L, Loreti F, Chionne F, Cecchetti R, Senin U. Cerebrospinal fluid neuron-specific enolase in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurosci Lett.* 1995 Jan 2; 183(1-2):43-5.
33. Van Engelen BGM, Lamers KJB, Gabreels FJM, Wevers RA, van Geel WJA, Borm GF. Age-related changes of neuron-specific enolase, S-100 protein, and myelin basic protein concentrations in cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 1992; 38:813-816.

34. Nygaard ø, Langbakk B, Romner B.. Age- and sex-related changes of S-100 protein concentrations in cerebrospinal fluid and serum in patients with no previous history of neurological disorder. Clin Chem 1997; 43:541-543
35. Wiesmann M, Missler U, Gottmann D, Gehring S. Plasma S-100b protein concentration in healthy adults is age and sex-independent. Clin Chem 1998; 44:1056-1057
36. Preece P, and Cairns NJ. Quantifying mRNA in postmortem human brain: influence of gender, age at death, postmortem interval, brain pH, agonal state and inter-lobe mRNA variance. Brain Res Mol Brain Res. 2003 Oct 21; 118(1-2):60-71.
37. Pratico D. Plasma biomarkers in Alzheimer's disease diagnostic. Alzheimer's and Dementia, 2005, 1(1-S1): 8-9.

Table 1. Demographic, biochemical and clinical data of subjects evaluated

	Nondemented (N=66)	Alzheimer (N=36)	P value
Age (years)	76.56 ± 5.46	74.50 ± 9.27	0.003
Gender			
Male (%)	20 (30%)	13 (36%)	0.55
Educational level (years of schooling)	8.48 ± 5.24	5.74 ± 4.47	0.32
Mini Mental	27.09 ± 2.99	11.60 ± 6.32	0.003
CDR (%)			
0	66 (100%)	-	0.001
1	-	07 (19%)	
2	-	15 (42%)	
3	-	13 (36%)	
S100β (µg/l) *	0.07 (0.02-0.17)	0.06 (0.03-0.18)	0.92
NSE (µg/l) **	9.33 ± 4.95	9.81 ± 4.99	0.34

* Mann-Whitney U-test

** Student t test (independent samples)

Table 2. Dementia severity and S100 β and NSE serum levels

	CDR 1	CDR 2	CDR 3	P value
S100β*	0.01 (0.00-0.05) ^a	0.08 (0.033-0.189)	0.08 (0.04-0.21) ^a	0.06
NSE **	8.73 \pm 3.79	10.87 \pm 6.67	9.49 \pm 3.59	0.69

* median and interquartiles (Kruskal-Wallis ANOVA)

^a difference between CDR 1 and 3 (P=0.02; Mann-Whitney U test=16.00)

** mean \pm SD (one-way ANOVA; F=0.372)

Table 3. Gender and S100B and NSE levels in community elderly participants

	Male (N=20)	Female (N=42)	P value
S100B *	0.06 (0.02-0.22)	0.09 (0.02-0.16)	0.79
NSE **	10.76±8.31	8.78±2.73	0.049

* median and interquartiles (Mann-Whitney U=402.0)

** mean SD (Student t test, t=2.18)

8. ARTIGO EM PORTUGUÊS

Os níveis séricos de proteína S100 β , mas não de EN-e, podem diferenciar os pacientes graves dos leves na doença de Alzheimer.

Eduardo D. Ferreira^b, Isabel Piazenski^b, Alberto Maia^b, Luis V.C. Portela^a, Diogo O. Souza^a and Márcia L.F. Chaves^b, ✉

^aDepartamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Ramiro Barcelos 2600
90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil

^bServiço de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350,
90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil

Palavras-chave: doença de Alzheimer ; proteína S100 β ; enolase neurônio-específico;
transtornos neurodegenerativos; maçadores bioquímicos

Endereço para correspondência:

Márcia L. F. Chaves

Serviço de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350,
90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil

Telefone: 55-51-2101.8520

e-mail: mchaves@hcpa.ufrgs.br

Resumo

Objetivo(s): Nós avaliamos o nível sérico das proteínas S100 β e enolase neurônio – específico (NSE) na doença de Alzheimer (DA) com gravidades leve, moderada e graves.

Nós também analisamos o nível destas proteínas em idosos saudáveis da comunidade.

Métodos: Foi conduzido um estudo transversal com 36 pacientes com a DA e 66 pacientes da comunidade. Os pacientes com a DA preenchem os critérios de DA provável pelo NINCDS-ADRDA . Os pacientes com DA ainda foram submetidos ao exame do Mini-Mental, a escala CDR (Avaliação Clínica da Demência). A amostra de idosos normais foi recrutada de uma área próxima do hospital. Os critérios de inclusão incluíam ter mais de 60 anos e estar cognitivamente normal (CDR=0). O nível de escolaridade foi avaliado em todos os participantes. A amostra de 3ml de sangue foi coletada por veno-punção sem anticoagulante e depois centrifugada a 3000g/min por 5 minutos e logo congelada a – 70 °C até a análise.

Resultados: Nos pacientes com a DA, os níveis de S100 β foram significativamente diferentes entre os de gravidade leve e grave ($P=0.02$). Houve uma tendência para uma diferença entre as gravidades leve e moderada nos pacientes com DA ($P=0.06$; Mann-Whitney $U=26.00$). A EN-e, não mostrou diferença estatística entre as gravidades da DA. Houve uma correlação marginal entre os níveis de S100 β e o Mini-Mental (Spearman $r=-0.33$; $P=0.05$), mas não com a idade (Spearman $r=-0.05$; $P=0.76$). Não foi encontrada diferença estatística nos níveis séricos de S100 β e EN-e entre os pacientes com DA e os idosos normais da comunidade. Nos idosos normais o níveis séricos de, S100 β ($r=-0.02$; $P=0.90$) e EN-e não variaram com a idade ($r=0.18$; $P=0.21$). Os níveis de EN-e foram maiores nos homens do que nas mulheres ($P=0.049$) e os níveis de S100 β foram similares. Não houve diferença nos níveis S100 β EN-e entre os idosos normais maiores que 80 anos comparado com os menores de 80 anos. **Conclusões:** Parece que os níveis sérico de EN-e e S100 β não tem um papel diagnóstico na DA, mas a proteína S100 β pode ter um potencial como marcador da gravidade da DA.

1. Introdução

A Doença de Alzheimer (DA) é uma das enfermidades neurológicas de mais rápido crescimento nos países desenvolvidos e a maior causa de demência (1). Mais de 4 milhões de pessoas nos Estados Unidos sofrem de demência, a maioria com Alzheimer (DA).

Levando em conta o rápido envelhecimento da população, o número de pessoas com DA irá quadruplicar por volta do meio do século a menos que algo seja descoberto para retardar o início ou prevenir a doença (2).

A incidência de demência no Brasil foi relatada como sendo de 13,8 por 1000, e a DA como 7,7 por 1000, para indivíduos da comunidade com idade superior a 65 anos.

A taxa de incidência praticamente dobra a cada 5 anos de idade. Não há diferença no sexo, mas mulheres têm maior incidência de demência, principalmente acima de 85 anos de idade (3).

A Doença de Alzheimer (DA) não é uma consequência do envelhecimento normal, mas o aumento da idade é o maior fator de risco para o desenvolvimento da doença.

Um em cada 10 indivíduos com idade de 65 anos ou mais tem a DA, e esta condição afeta quase que metade das pessoas com mais de 85 anos. Como o número de americanos acima dos 65 anos dobrará nas próximas 2 décadas, a prevalência da DA irá aumentar muito (4). Com o reconhecimento precoce e a avaliação acurada do declínio cognitivo será possível identificar os pacientes em risco para progredir para DA e uma vez diagnosticado as famílias poderão planejar melhor o futuro, os tratamentos podem começar mais cedo e muitos estudos científicos podem ser feitos. O Estudo sobre déficit de memória encontrou entre 10 a 15% de indivíduos com uma condição clínica chamada declínio cognitivo leve, um estado transitório de cognição e funcionalidade entre o envelhecimento normal e a DA com gravidade leve, que irão progredir para DA provável a cada ano (5).

Um estudo recente encontrou que a expectativa de vida de indivíduos diagnosticados com DA é reduzido por volta de 50%, comparado com pessoas de

mesma idade sem a doença, e que alguns fatores podem predizer uma longa sobrevivência (6).

Idosos da comunidade que recebem o diagnóstico de DA tem a sobrevida menor do que os idosos sem demência de acordo com dados demográficos americanos. Os fatores como idade de início precoce da DA, uma gravidade cognitiva e incapacidade funcional muito alta, história de quedas, sinais de liberação frontal e alteração da marcha no exame neurológico como preditores de diminuição de sobrevida. As Variáveis fortemente associadas com a sobrevida foram medidas da gravidade da doença por ocasião do diagnóstico. (6). A doença de Alzheimer (DA) é uma patologia cerebral degenerativas comum, caracterizada pela presença de 2 estruturas patológicas, as placas senis e os emaranhados neuro-fibrilares. As placas senis são uma estrutura extracelular composta de uma proteína β -amilóide ($A\beta$), com peptídeos de aproximadamente 40 aminoácidos clivados de uma proteína precursora beta-amilóide ($A\beta$). Os emaranhados neuro-fibrilares são um feixe de filamentos pareados em hélice, anormais, no qual a hiperfosforilação da proteína tau é seu principal componente. Embora a relação entre o acúmulo extracelular de $A\beta$ e a fosforilação intracelular anormal da proteína tau, e sua relação com a morte neuronal tem sido discutida, ainda esta em aberto se, os depósitos de $A\beta$ levam ao acúmulo de proteína tau hiperfosforilada (7).

Não há um teste diagnóstico definitivo para a DA ante-mortem. Assim, não há uma maneira fácil de saber a quantidade de perda neuronal que ocorreu. (8). Devido a isto um marcador periférico para a DA seria de grande interesse para completar a avaliação clínica. A proteína S100 β é uma proteína cálcio-ligante principalmente produzida e liberada pelos astrócitos no Sistema Nervoso Central (SNC)(9). Tem suas funções intracelulares como modular o citoesqueleto proteico, regular o ciclo das proteínas e funções extra celulares, as quais são dependentes da sua concentração. Em concentrações nanomolares a S100 β ações neurotróficas e gliotróficas, possivelmente tendo importante papel no desenvolvimento normal do SNC, na recuperação após uma lesão. Em concentrações micromolares, pode ser tóxica, produzindo morte neuronal e da glia por apoptose (10).

Considerando sua prevalência no SNC, muitos estudos têm investigado seu potencial papel como marcador periférico, de lesão neuronal, possivelmente envolvendo gliose reativa, morte do astrócito e/ou disfunção da barreira hemato-encefálica (11). O nível elevado de S100 β no sangue ou no líquido foi encontrado em muitas doenças cerebrais crônicas e agudas como traumatismo craniano (12,13), isquemia cerebral (14), doença de Alzheimer (15,16), esquizofrenia (17), doença de Parkinson (18), mielopatia associada ao HTLV-I (19) e lúpus eritematoso sistêmico (20).

A enolase neurônio-específica (EN-e) é uma enzima glicolítica citoplasmática, cuja isoforma $\gamma\gamma$ é encontrada nos neurônios, assim como em células com diferenciação neuro-endócrina (18). Uma vez que a EN-e não é secretada fisiologicamente, um aumento do seu nível no líquido ou no sangue é considerado lesão neuronal como relatado em traumatismo craniano (13), isquemia cerebral (21) e na epilepsia (22). Juntas as proteínas EN-e e a S100 β podem ser consideradas, como marcadores periféricos neuronal e da glia de patologias do SNC.

Neste trabalho, nos estudamos o nível sérico de S100 β e EN-e em pacientes com a DA e em idosos saudáveis da comunidade para avaliar seu potencial uso como marcador periférico desta doença. Nós também avaliamos o efeito da gravidade da DA, do sexo, nos níveis séricos e sua correlação com o grau de comprometimento cognitivo e idade. O efeito da idade, nos idosos da comunidade acima de 80 anos de idade no nível sérico das proteínas S100 β e EN-e também foi analisado.

2. Método

Foi realizado um estudo transversal com pacientes com a doença de Alzheimer e idosos cognitivamente normais da comunidade.

Os pacientes com a doença de Alzheimer preenchem os critérios para provável DA do NINCDS-ADRDA (23) e foram recrutados do ambulatório de neuro-geriatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brasil. O diagnóstico da DA foi

complementado com o uso do Mini-Mental (24) e a escala CDR (Avaliação Clínica da Demência) (CDR) (25,26). A escala CDR quantifica a gravidade da demência em leve, moderada ou grave, como 1, 2 ou 3, respectivamente. O escore isquêmico de Hachinski (27) também foi usado. Os critérios de exclusão para os pacientes foram quaisquer outras doenças neurológicas, psiquiátricas (exceto as associadas com a DA) ou clínica que tornasse o diagnóstico de DA improvável. Exames complementares incluíam tomografia computadorizada do encéfalo e/ou ressonância magnética do encéfalo, eletrocardiograma, RX de tórax, e uma extensiva bateria de exames bioquímicos com a inclusão de dosagem de vitamina B12, imunofluorescência para Lues, exames de função renal, hepática e da tireóide.

Uma amostra de idosos cognitivamente normais foi recrutada de uma área próxima ao hospital. O critério de inclusão era ter mais que 60 anos e ser cognitivamente normal (CDR=0). O nível de escolaridade foi avaliado em todos os participantes. A amostra de 3ml de sangue foi coletada por veno-punção sem anticoagulante e depois centrifugada a 3000g/min por 5 minutos e logo congelada a -70 °C até a análise.

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário aprovou o estudo. O Consentimento informado foi obtido dos pacientes/sujeitos, seus parentes, ou ambos

2.2 Proteína S100 β

O teste quantitativo monoclonal dupla-facey LIA-mat Sangtec 100 (BYK-Sangtec, Germany), foi usado em todos os participantes para medir a S100 β . O teste imunoluminométrico é composto de 3 anticorpos monoclonais específicos para a subunidade β da S100 e um anticorpo marcador o qual é ligado ao isoluminol. A oxidação do isoluminol é iniciada por injeção de peróxido alcalino e uma solução catalizadora. A reação imunológica é detectada por reação á luz (28).

2.3 EN-e

A dosagem de EN-e no sangue também foi medida pelo teste de eletroquimioluminescência ECLIA (Roche Diagnostics, USA). Tè um método quantitativo que usa um anticorpo monoclonal específico para EN-e marcado com o complexo ruthenium o qual emite luz .

2.4 Análise estatística

As estatísticas descritivas são apresentadas com médias e desvio padrão para as variáveis paramétricas, e em frequências absolutas e porcentagem para as categóricas. A comparação entre os grupos foi feita usando o teste paramétrico *t* para o EN-e, e teste não paramétrico Mann-Whitney para S100 β . As correlações são apresentadas com o coeficiente de Pearson's para o EN-e com a idade , e com o coeficiente de Spearman's para todas as correlações da S100 β e para as correlações do EN-e com as escalas clínicas . As análises estatísticas foram realizadas com o programa SPSS 11.0 for MacOs.

3. Resultados

As características clínicas, demográficas e bioquímicas dos pacientes e dos idosos normais da comunidade estão mostrados na tabela 1. Não há diferença estatística significativa entre os níveis séricos de S100 β e EN-e entre os pacientes com DA e idosos da comunidade.

Nos com a DA, os níveis de S100 β foram significativamente diferentes entre os de gravidade leve e os graves (Tabela 2). Houve uma tendência para uma diferença com significância estatística entre os graus leve e moderado ($P=0.06$; Mann-Whitney $U=26.00$). A EN-e, não mostrou diferença estatística entre os estágios de gravidade da DA (Tabela 2). Os níveis de S100 β correlacionam-se marginalmente com os escores do

Mini-Mental (Spearman $r=-0.33$; $P=0.05$). Não foi observada correlação entre os níveis de S100 β e a idade (Spearman $r=-0.05$; $P=0.76$), nem entre CDR e a idade ($P>0.05$).

Nos idosos normais, os níveis de S100 β ($r=-0.02$; $P=0.90$) e EN-e não variaram com a idade ($r=0.18$; $P=0.21$), nem com o sexo ($P>0.05$). Os níveis séricos de S100 β e EN-e foram similares nos idosos normais acima de 80 anos, comparado com os de menos de 80 anos.

Nesta amostra de idosos normais da comunidade, os homens mostraram níveis de EN-e mais altos do que as mulheres ($P=0.049$) (Tabela 3). Não houve influência do sexo nos níveis de S100 β .

4. Discussão

Embora o aumento dos níveis séricos de S100 β e de EN-e tenha sido relatado em vários transtornos que envolvam morte neuronal (12,13,14,15,16,17,18,19,21) comparado com controles, nós não encontramos diferença estatística entre os pacientes com a DA e os idosos normais da comunidade. Entretanto, nós pudemos observar uma diferença estatística nos níveis séricos de S100 β entre os pacientes com DA de gravidade leve e grave e uma tendência à diferença entre os de gravidade leve e moderada de acordo com a escala CDR. Pacientes de gravidade moderada e grave mostraram níveis séricos semelhantes de S100 β . Os níveis de EN-e também foram similares entre os estágios de gravidade da demência (escala CDR).

Acreditamos que a diferença entre os de grau leve e severo da DA ocorreu porque aqueles pacientes mais gravemente afetados pela doença apresentavam níveis séricos de S100 β similares a níveis de idosos normais, enquanto os de gravidade menor tinham níveis similares aos demenciados como um todo (Tabela 2). Os pacientes com a DA podem apresentar níveis baixos de proteína S100 β durante a fase clínica leve da doença o que não corresponde ao início da patologia cerebral da doença. Acredita-se

que o início da patologia cerebral da DA ocorra anos ou mesmo décadas antes que os primeiros sintomas apareçam. (29).

O aumento dos níveis séricos da proteína, de acordo com o aumento da gravidade da DA pode ser consequência do aumento do dano neuronal de outras áreas do cérebro a medida que aumenta a progressão da doença (30). Isto leva a uma grande reação com astrogliose com consequente aumento dos níveis séricos de (15) Este fato deve-se que a DA não é uma doença em que o mecanismo inflamatório esteja envolvido na sua patologia, assim como na doença de Parkinson, porém o contrário ocorre em patologias onde o processo inflamatório existe, como no Lupus eritematoso, sistêmico, na infecção do SNC pelo HIV, e aí o nível de S100 β pode ser alto desde o início da doença.

Também observamos uma correlação negativa marginal entre os escores do Mini Mental e os níveis séricos de S100 β entre os pacientes com a DA. Não foi encontrada correlação entre os níveis séricos de EN-e e a performance cognitiva (escores do Mini Mental).

O presente estudo sugere que o nível sérico de EN-e não é um marcador biológico útil na DA, como foi também observado por Lamour (31) no sangue e Parnetti (32) no líquido. O papel dos níveis séricos de EN-e ainda precisa ser melhor entendido, talvez com um número maior de sujeitos e explorados de acordo com a gravidade da DA.

Analisamos o efeito da idade (>80 anos) nos níveis séricos de S100 β e EN-e nos idosos normais da comunidade. Não houve diferença estatística entre os níveis de S100 β e EN-e com o aumento da idade após os 80 anos. Os idosos normais, com idade entre 60 e 80 anos apresentaram níveis de proteínas semelhantes. Depois de uma certa idade um plateau pode ocorrer na concentração dos níveis das proteínas S100 β e EN-e. Até o momento este é o primeiro estudo que mostra a relação dos níveis destas proteínas acima dos 80 anos.

A possibilidade que as concentrações de S100 β sejam idade-dependente foi baseada em alguns relatos do líquido. Sheng e colegas, 1996, (15) estudando tecido cerebral de pacientes com a DA e normais, de 1 a 80 anos de idade, encontrou que os

níveis de proteína S100 β aumentam com a idade, e que os níveis dos sujeitos normais eram menores dos que os encontrados na DA. Van Engelen e associados (33) estudou a concentração de S100 β no liquor de pacientes normais do ponto de vista do exame neurológico e encontrou um pequeno aumento de acordo com a idade mas não com o sexo. Nygaard e colaboradores (34) examinaram o liquor de paciente que foram submetidos a cirurgias com anestesia na coluna vertebral e encontrou altas concentrações de S100 β com o aumento da idade e maiores nos homens do que nas mulheres. Todos estes grupos aplicaram métodos analíticos que detectam predominantemente S100 β liquórico, mas não eram sensível o suficiente para detectar concentrações no sangue

Portela e colaboradores (28), estudando amostra de sangue de recém nascidos até 70 anos de idade, encontrou que as concentrações de S100 β diminuem consideravelmente nos duas primeiras décadas da vida e se mantém constante durante a vida adulta. Wiesmann e associados (35), em amostras de sangue de 200 doadores sadios entre os 18 e 65 anos de idade, não observou diferença significativa na concentração de S100 β com a idade e nem com o sexo.

Não encontramos diferença entre nos níveis séricos de S100 β ou EN-e de acordo com o sexo nos idosos da comunidade (Tabela 3). Nesta amostra, os homens tiveram níveis maiores de EN-e do que as mulheres ($p=0.049$), o mesmo achado de Preece P, e Cairns NJ, 2003 (36) que encontrou nas mulheres níveis menores de mRNA (entre 7 analisados um era a EN-e) do que nos homens, achados no cérebro posmorte, trazendo a discussão da relação entre marcadores biológicos periféricos e centrais no diagnóstico / avaliação de pacientes com DA.

Assim, parece que as proteínas EN-e e S100 β não tem um papel diagnóstico como marcador biológico periférico na DA, mas que a proteína S100 β no sangue tem um potencial como marcador da intensidade da gravidade da doença de Alzheimer. Enquanto novos tratamentos estão sendo pesquisados, marcadores periféricos da gravidade da doença têm um papel importante no diagnóstico clínico inicial, para testar

estas drogas se interferem na cadeia patogénica da DA e suas relações dose-resposta (37).

5. REFERÊNCIAS

1. Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA (2003) Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol* 60: 1119-1122.
2. Brookmeyer R, Gray S, Kawas C. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset, *Am J Public Health* 1998, pp. 1337–1342.
3. Nitrini R, Caramelli P, Herrera E Jr, Bahia V S, Caixeta L F, Radanovic M, Anghinah R, Charchat-Fichman H, Porto C S, Carthery M T, Hartmann A P J, Huang N, Smid J, Lima E P, Takada L T, Takahashi D Y. Incidence of Dementia in a Community-Dwelling Brazilian Population. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*.18(4):241-246, october/November/December 2004.
4. C. Kawas, S. Gray, R. Brookmeyer, J. Fozard and A. Zonderman, Age-specific incidence rates of Alzheimer's disease The Baltimore Longitudinal Study of Aging, *Neurology* 54 (2000), pp. 2072–2077.
5. Grundman M, Petersen RC, Ferris SH, Thomas RG, Bennett DA, Foster NL, Jack CR Jr, Galasko DR, Doody R, Kaye J, Sano M, Mohs R, Gauthier S, Kim HT, Jin S, Schultz AN, Schafer K, Mulnard R, va Dyck CH, Mintzer J, Zamrini EY, Cahn-Weiner D, Thal LJ; Alzheimer's Disease Cooperative Study. Mild cognitive impairment can be distinguished from Alzheimer disease and normal aging for clinical trials. *Arch Neurol*. 2004; 61(1): 59-66.
6. Larson EB, Shadlen MF, Wang L, McCormick WC, Bowen JD, Teri L, Kukull WA. Survival after initial diagnosis of Alzheimer disease. *Ann Intern Med*. 2004 Apr 6; 140(7):501-9.
7. Rapoport M, Dawson NH, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A. Tau is essential to β -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 April 30; 99(9): 6364–6369.
8. Growdon J. Biomarkers 101. *Alzheimer's and Dementia*, 2005, 1(1-S1): 8.

9. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles, *Int J Biochem Cell Biol* 33 (2001) (7), pp. 637–668.
10. Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull* 37 (1995) (4), pp. 417–429
11. Marchi N, Rasmussen P, Kapural M, Fazio V, Kight K, Mayberg MR, Kanner A, Ayumar B, Ibensi B, Cavaglia M, Janigro D. Peripheral markers of brain damage and blood-brain barrier dysfunction, *Restor Neurol Neurosci* 2003; 21(3–4): 109–121.
12. T. Ingebrigtsen, K. Waterloo, E.A. Jacobsen, B. Langbakk and B. Romner, Traumatic brain damage in minor head injury: relation of serum S-100 protein measurements to magnetic resonance imaging and neurobehavioural outcome, *Neurosurgery* 45 (1999), pp. 468–475.
13. M. Herrmann, N. Curio, S. Jost, M.T. Wunderlich, H. Synowitz and C.W. Wallesch, Protein S-100B and neuron specific enolase as early neurobiochemical markers of the severity of traumatic brain injury, *Restor Neurol Neurosci* 14 (1999) (2–3), pp. 109–114.
14. M.T. Wunderlich, A.D. Ebert, T. Kratz, M. Goertler, S. Jost and M. Herrmann, Early neurobehavioural outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage, *Stroke* 30 (1999), pp. 1190–1195.
15. J.G. Sheng, R.E. Mrak, C. Rovnaghi, E. Kozłowska, L.J. Van Eldik and W.S. Griffin, Human brain S100 β and S100 β mRNA expression increases with age: pathogenic implications for Alzheimer's disease, *Neurobiol Aging* 17 (1996), pp. 359–363.
16. Sulkava R, Viinikka L, Erkinjuntti T, Roine R. Cerebrospinal fluid neuron-specific enolase is decreased in multi-infarct dementia, but unchanged in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1988 Apr; 51(4):549-51.
17. Lara DR, C.S. Gama, P. Belmonte-de-Abreu, L.V.C. Portela, C.A. Gonçalves, M. Fonseca, S. Hauck and D.O. Souza, Increased serum S100 β protein in

- schizophrenia: a study in medication-free patients, *J Psychiatr Res* 35 (2001), pp. 11–14.
18. Schaf DV , Tort AB, Fricke D, Schestatsky P., Portela LV, Souza DO, Rieder CR. S100 β and NSE serum levels in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2005 Jan; 11(1):39-43.
 19. R. Walz, L.V.C. Portela, A.B.L. Tort, E.C. Neto, L.N. Fernandes, C.A. Gonçalves and D.O. Souza, Serum S100 β levels in patients with HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, *Neurology* 54 (2000), pp. 2021–2022.
 20. L.V. Portela, J.C. Brenol, R. Walz, M. Bianchin, A.B. Tort, U.P. Canabarro, S. Beheregaray, J.A. Marasca, R.M. Xavier, E.C. Neto, C.A. Gonçalves and D.O. Souza, Serum S100 β levels in patients with lupus erythematosus: preliminary observation, *Clin Diagn Lab Immunol* 9 (2002), pp. 164–166.
 21. L. Persson, H.G. Handemark, J. Gustafsson, G. Rundstrom, I. Mendel-Hartvig, T. Esscher and S. Pahlman, S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system, *Stroke* 18 (1987), pp. 911–918.
 22. A.L. Rabinowicz, J. Correale, R.B. Boutros, W.T. Couldwell, C.W. Henderson and C.M. DeGiorgio, Neuron-specific enolase is increased after single seizures during inpatient video/EEG monitoring, *Epilepsia* 37 (1996) (2), pp. 122–125.
 23. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Pride D, Stadlan EM (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34: 939-944.
 24. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975 Nov; 12(3):189-98.
 25. Hughes CP, Berg L, Danzinger WL, et al. A new clinical scale for staging of dementia. *Br J Psychiatr* 1982; 140:566-72

26. Morris JC. Clinical dementia rating: a reliable and valid diagnostic and staging measure for dementia of the Alzheimer type. *Int Psychogeriatr.* 1997; 9 Suppl 1:173-6; discussion 177-8.
27. Hachinski VC, Iliff LD, Zilhka E, Du Boulay GH, Mc Allister VL, Marshall J, Russell RW, Symon L. Cerebral blood flow in dementia. *Arch Neurol.* 1975 Sep; 32(9):632-7.
28. L.V. Portela, A.B. Tort, D.V. Schaf, L. Ribeiro, D.B. Nora, R. Walz, L.N. Rotta, C.T. Silva, J.V. Busnello, F. Kapczinski, C.A. Goncalves and D.O. Souza, The serum S100B concentration is age dependent, *Clin Chem* 48 (2002) (6 Pt 1), pp. 950–952.
29. Godbolt AK, Cipolotti L, Anderson VM, Archer H, Janssen JC, Price S, Rossor Mn, Fox NC. A decade of pre-diagnostic assessment in a case of familial Alzheimer's disease: tracking progression from asymptomatic to MCI and dementia. *Neurocase.* 2005 Feb; 11(1):56-64.
30. Van Eldik LJ, Griffin WS. S100 beta expression in Alzheimer's disease: relation to neuropathology in brain regions. *Biochim Biophys Acta.* 1994 Sep 29; 1223(3): 398-403.
31. Lamour Y, Scarna H, Roudier M, Safer S, Davos P. Serum neuron-specific enolase in senile dementia of the Alzheimer type. *Neurosci Lett.* 1988 Mar 31; 86(2):241-4.
32. Parnetti L, Palumbo B, Cardinali L, Loreti F, Chionne F, Cecchetti R, Senin U. Cerebrospinal fluid neuron-specific enolase in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurosci Lett.* 1995 Jan 2; 183(1-2):43-5.
33. Van Engelen BGM, Lamers KJB, Gabreels FJM, Wevers RA, van Geel WJA, Borm GF. Age-related changes of neuron-specific enolase, S-100 protein, and myelin basic protein concentrations in cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 1992; 38:813-816.

34. Nygaard ø, Langbakk B, Romner B.. Age- and sex-related changes of S-100 protein concentrations in cerebrospinal fluid and serum in patients with no previous history of neurological disorder. Clin Chem 1997; 43:541-543
35. Wiesmann M, Missler U, Gottmann D, Gehring S. Plasma S-100b protein concentration in healthy adults is age and sex-independent. Clin Chem 1998; 44:1056-1057
36. Preece P, and Cairns NJ. Quantifying mRNA in postmortem human brain: influence of gender, age at death, postmortem interval, brain pH, agonal state and inter-lobe mRNA variance. Brain Res Mol Brain Res. 2003 Oct 21; 118(1-2):60-71.
37. Pratico D. Plasma biomarkers in Alzheimer's disease diagnostic. Alzheimer's and Dementia, 2005, 1(1-S1): 8-9.

Tabela 1. Dados demográficos, bioquímicos e clínicos dos sujeitos avaliados

	Não-demenciados (N=66)	Alzheimer (N=36)	Valor de P
Idade (anos)	76.56 ± 5.46	74.50 ± 9.27	0.003
Sexo			
Masculino (%)	20 (30%)	13 (36%)	0.55
Nível educacional (anos de estudo)	8.48 ± 5.24	5.74 ± 4.47	0.32
Mini Mental	27.09 ± 2.99	11.60 ± 6.32	0.003
CDR (%)			
0	66 (100%)	-	0.001
1	-	07 (19%)	
2	-	15 (42%)	
3	-	13 (36%)	
S100β (µg/l) *	0.07 (0.02-0.17)	0.06 (0.03-0.18)	0.92
EN-e (µg/l) **	9.33 ± 4.95	9.81 ± 4.99	0.34

* Mann-Whitney U-test

** Teste t de Student (amostras independentes)

Tabela 2. Grau de demência e níveis séricos de S100 β e EN-e

	CDR 1	CDR 2	CDR 3	Valor de P
S100β*	0.01 (0.00-0.05) ^a	0.08 (0.033-0.189)	0.08 (0.04-0.21) ^a	0.06
EN-e **	8.73 \pm 3.79	10.87 \pm 6.67	9.49 \pm 3.59	0.69

* mediana e interquartiles (Kruskal-Wallis ANOVA)

^a diferenças entre CDR 1 e 3 (P=0.02; Mann-Whitney U test=16.00)

** média \pm DP (one-way ANOVA; F=0.372)

Tabela 3. Sexo e os níveis de S100 β e EN-e em sujeitos idosos da comunidade

	Masculino (N=20)	Feminino (N=42)	Valor de P
S100B *	0.06 (0.02-0.22)	0.09 (0.02-0.16)	0.79
NSE **	10.76±8.31	8.78±2.73	0.049

* mediana e interquartiles (Mann-Whitney U=402.0)

** média ±DP (teste t de student, t=2.18)

9. ESCALAS e TABELAS

9.1 ESCALA CDR

Instruções de preenchimento:

Use toda informação e faça o melhor julgamento. Dê escores para cada categoria (M, O, JSP, AC, CH, CP) tão independente quanto possível. **Circule apenas um item** em cada linha de categorias, graduando cada uma de acordo com a função cognitiva do sujeito. **Quando em dúvida** no escore de uma categoria, gradue no nível mais alto. **Para determinar o escore CDR global**, memória é considerada a categoria primária; todas as outras são secundárias.

Se pelo menos 3 categorias secundárias recebem o mesmo escore numérico de memória, então CDR=M.

Se 3 ou mais categorias secundárias recebem escores maiores ou menores do que o escore de memória, CDR = escore da maioria das categorias secundárias, a menos que 3 categorias secundárias tenham escores para um lado de M e as 2 para o outro lado. Nesta última circunstância, CDR = M.

Se há empate nas categorias secundárias num lado de M, escolha o CDR mais perto de M (p. exemplo, 2 categorias secundárias = 1, 2 categorias secundárias = 2, M e outra secundária = 3; CDR global = 2).

Se apenas 1 ou 2 categorias secundárias recebem o mesmo escore de M, o CDR é igual a M desde que não mais de 2 categorias secundárias estejam de cada lado de M.

Quando M = 0,5, CDR = 1 se pelo menos 3 de certas categorias (O, JSP, AC, CH) tenham escore 1 ou maior (CP não é tão influente aqui). **Se M = 0,5**, CDR não pode ser 0; CDR só pode ser 0,5 ou 1. **Se M = 0**, CDR = 0 a menos que haja comprometimento discreto em duas ou mais categorias secundárias, em cujo caso CDR = 0,5.

	Saudável CDR 0	Demência questionável CDR 0,5	Demência leve CDR 1	Demência moderada CDR 2	Demência grave CDR 3
MEMÓRIA	Nenhuma perda de memória, ou apenas esquecimento discreto e inconsistente	Esquecimento leve e consistente; lembrança parcial de eventos; esquecimento 'benigno'	Moderada perda de memória, mais marcada para eventos recentes; déficit interfere com atividades diárias	Perda de memória grave; apenas material <i> muito </i> aprendido é retido; materiais novos são rapidamente perdidos	Perda de memória grave; apenas fragmentos permanecem
ORIENTAÇÃO	Plenamente orientado	Plenamente orientado	Alguma dificuldade nas relações temporais; orientado para lugar e pessoa no exame mas pode ter desorientação geográfica	Geralmente desorientado	Orientação pessoal apenas
JULGAMENTO E SOLUÇÃO DE PROBLEMAS	Resolve bem problemas do dia-a-dia, bom julgamento em relação ao desempenho passado	Apenas comprometimento duvidoso na solução de problemas, similaridades e diferenças	Dificuldade moderada na solução de problemas complexos; julgamento social em geral mantido	Gravemente comprometido para solução de problemas, similaridades, e diferenças; julgamento social geralmente comprometido	Incapaz de realizar julgamentos ou solução de problemas
ASSUNTOS NA COMUNIDADE	Função independente no nível usual no trabalho, compras, negócios, finanças, e grupos sociais	Apenas comprometimento duvidoso nestas atividades	Incapaz de funcionar independentemente nestas atividades embora possa ainda engajar-se em algumas; pode ainda parecer normal à inspeção casual	Nenhuma pretensão de função independente fora de casa. Parece bem o suficiente para ser levado para atividades fora da casa da família	Nenhuma pretensão de função independente fora de casa. Parece muito doente para ser levado para atividades fora de casa
LAR E HOBBIES	Vida em casa, hobbies, interesses intelectuais bem mantidos	Vida em casa, hobbies, interesses intelectuais discretamente comprometidos	Comprometimento leve mas definido em casa: tarefas mais difíceis são abandonadas; hobbies mais complicados e interesses são abandonados	Apenas tarefas simples são preservadas; interesses muito restritos, pobremente sustentados	Nenhuma função significativa em casa ou fora do quarto
CUIDADOS PESSOAIS	Plenamente capaz	Plenamente capaz	Necessita assistência ocasional	Requer assistência para vestir-se, na higiene	Requer muito auxílio nos cuidados pessoais, em geral incontinente

ESCORE TOTAL

9.2 MINI EXAME DO ESTADO MENTAL (MMSE)

ORIENTAÇÃO

* Qual é o (ano) (estação) (dia semana) (dia mês) e (mês).

* Onde estamos (país) (estado) (cidade) (rua) (nº).

REGISTRO

* Dizer três palavras: PENTE RUA AZUL. Pedir para prestar atenção pois terá que repetir mais tarde. Pergunte pelas três palavras após tê-las nomeado. Repetir até que repita corretamente e anotar número de vezes: ____

ATENÇÃO E CÁLCULO

* Subtrair: 100-7 (5 tentativas: 93 – 86 – 79 – 72 – 65)

Alternativo: série de 7 dígitos (5 8 2 6 94 1)

EVOCAÇÃO

* Perguntar pelas 3 palavras anteriores

LINGUAGEM

* Identificar lápis e relógio de pulso

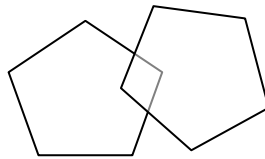
* Repetir: “Nem aqui, nem alí, nem lá”.

* Seguir o comando de três estágios: “Pegue o papel com a mão D, dobre ao meio e ponha no chão”.

* Ler ‘em voz baixa’ e executar: FECHER OS OLHOS

* Escrever uma frase (um pensamento, idéia completa)

* Copiar o desenho:



TOTAL:

10. CONSENTIMENTO INFORMADO

CONSENTIMENTO INFORMADO

AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAR DE UM PROJETO DE PESQUISA

Nome do estudo: S100 β e EN-e: Possíveis marcadores periféricos na doença de Alzheimer.

Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e Departamento de Bioquímica da UFRGS

Pesquisadores responsáveis: Diogo Souza, Carlos Alberto Gonçalves, Márcia L. F. Chaves, Eduardo Daura Ferreira, Alberto G. Maia, Rachel Padilha, Oscar Dall'Igna

Telefones para contato com Dra. Márcia L. F. Chaves: 3316.85.20, 3316.81.82 (Serviço de Neurologia-HCPA)

Nome _____ do
participante: _____

1. OBJETIVO DESTE ESTUDO

A finalidade deste estudo é avaliar a quantidade destas substâncias (proteínas S100 β e EN-e) de pacientes portadores de doença de Alzheimer, pois acredita-se que estejam aumentadas e possam auxiliar, no futuro, na identificação de outros pacientes com esta doença, e de idosos 'normais' residentes na comunidade. Também se estudará a capacidade de memória e outras funções intelectuais, bem como a gravidade da demência através de alguns testes e compararemos com os resultados das proteínas no sangue .

2. EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

O(A) senhor(a) terá que responder perguntas que fazem parte de alguns questionários usados no estudo. As escalas utilizadas avaliam memória, raciocínio, linguagem, problemas de comportamento, dificuldade para realizar atividades diárias, presença de doenças, uso de medicações, e dados gerais de identificação.

Para a amostra de sangue e/ou "líquido da espinha" há um formulário separado para ser lido e assinado no caso de concordar.

Sua participação é voluntária. Se concordar, a aplicação das escalas e questionários, bem como a retirada de sangue, será realizada.

3. POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

O possível desconforto do presente estudo são as perguntas, a retirada da amostra de sangue e o tempo dispensado na entrevista. Os riscos e desconfortos da punção lombar, quando for o caso, são decorrentes, exclusivamente, dos procedimentos de investigação da doença, e que podem ser dor de cabeça após o exame e 'dolorimento' no local da punção.

4. DIREITO DE DESISTÊNCIA

O(A) senhor(a) pode desistir de participar a qualquer momento.

5. SIGILO

Todas as informações obtidas neste estudo, poderão ser publicadas com finalidade científica, preservando-se o completo anonimato dos participantes.

6. CONSENTIMENTO

Declaro ter lido – ou me foi lido – as informações acima antes de assinar este formulário. Foi-me dada ampla oportunidade de fazer perguntas, esclarecendo plenamente minhas dúvidas. Por este instrumento, tomo parte, voluntariamente, do presente estudo.

Porto Alegre, _____ de _____ de 200__.

Assinatura do paciente

Assinatura da testemunha

Assinatura do pesquisador responsável

CONSENTIMENTO INFORMADO

AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAR DE UM PROJETO DE PESQUISA

DOAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Nome do estudo: S100 β e EN-e: Possíveis marcadores, periféricos na doença de Alzheimer.

Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e Departamento de Bioquímica da UFRGS

Pesquisadores responsáveis: Diogo Souza, Carlos Alberto Gonçalves, Márcia L. F. Chaves, Eduardo Daura Ferreira, Alberto G. Maia, Rachel Padilha, Oscar Dall'Igna

Telefones para contato com Dra. Márcia L. F. Chaves: 2101.85.20, 2101.81.82 (Serviço de Neurologia-HCPA)

Nome do Participante _____

1. OBJETIVO DESTE ESTUDO

A finalidade do estudo é avaliar a quantidade destas substâncias (proteínas S100 β e EN-e) no sangue de pacientes portadores de doença de Alzheimer, pois acredita-se que estejam aumentadas e possam auxiliar, no futuro, na identificação de outros pacientes com esta doença. O estudo também inclui idosos 'normais' residentes na comunidade que também doarão sangue

EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

O(A) senhor(a) terá que responder perguntas que fazem parte de alguns questionários usados no estudo, como explicado no outro formulário de consentimento. Uma amostra de sangue será coletada pelo entrevistador que é capacitado para isto com material descartável e seguro para o estudo das proteínas, que será guardado no laboratório do departamento de Bioquímica da UFRGS e utilizado apenas para este teste. É garantido

que o sangue coletado será única e exclusivamente utilizado para a pesquisa sendo depois desprezado.

Sua participação é voluntária. Se concordar, a retirada de sangue, será realizada.

PARA OS PACIENTES EM INVESTIGAÇÃO PARA DOENÇA DE ALZHEIMER:

No caso de ter sido indicada uma punção lombar para identificar a causa de sua doença, o(a) senhor(a) está concordando que uma parte deste material seja utilizado nesta pesquisa.

Sua participação é voluntária e no caso de não concordar, garantimos que não haverá qualquer tipo de punição, represália, ou prejuízo no seu atendimento por esta razão. Se concordar em participar, a amostra de sangue será coletada e será guardado para este estudo, e apenas para este estudo.

2. POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

O possível desconforto do presente estudo são as perguntas, a retirada da amostra de sangue e o tempo dispensado na entrevista.

3. DIREITO DE DESISTÊNCIA

O(A) senhor(a) pode desistir de participar a qualquer momento.

4. SIGILO

Todas as informações obtidas neste estudo, poderão ser publicadas com finalidade científica, preservando-se o completo anonimato dos participantes.

5. CONSENTIMENTO

Declaro ter lido – ou me foi lido – as informações acima antes de assinar este formulário. Foi-me dada ampla oportunidade de fazer perguntas, esclarecendo plenamente minhas dúvidas. Por este instrumento, tomo parte, voluntariamente, do presente estudo.

Porto Alegre, _____ de _____ de 200_.

Assinatura do paciente

Assinatura da testemunha

Assinatura do pesquisador responsável