



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO  
INTEGRADO EM MEDICINA**

**ANA ISABEL FRANGANITO SARDO**

***DETERMINAÇÃO DO ESTADO REDOX DO  
LÍQUIDO CÉFALO-RAQUÍDEO NA DOENÇA DE  
ALZHEIMER***

**ARTIGO CIENTÍFICO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE NEUROLOGIA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:  
PROFESSORA DOUTORA MARIA ISABEL JACINTO SANTANA  
DOUTORA INÊS ESTEVES BALDEIRAS**

**FEVEREIRO 2012**

*DETERMINAÇÃO DO ESTADO REDOX DO LÍQUIDO  
CÉFALO-RAQUÍDEO NA DOENÇA DE ALZHEIMER*

Ana Isabel Franganito Sardo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal  
Azinhaga de Santa Comba, Celas  
3000-548 Coimbra

*E-mail* do autor: [anasardo88@gmail.com](mailto:anasardo88@gmail.com)

**Índice**

Resumo .....	2
Abstract .....	4
Introdução.....	6
População e Métodos .....	9
Resultados .....	14
Discussão.....	18
Agradecimentos .....	21
Referências .....	22

## Resumo

**Introdução:** A Doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência, constituindo 50 a 80% de todos os casos. Atualmente, o diagnóstico provável de DA é baseado em achados clínicos e resultados de testes neuropsicológicos só sendo possível chegar a um diagnóstico definitivo após exame *post mortem*. A importância da via oxidativa e das espécies reativas de oxigênio como intervenientes no processo de dano neuronal progressivo na DA tem sido amplamente demonstrada. Têm sido encontradas deficiências nos complexos da cadeia respiratória mitocondrial e uma diminuição do metabolismo energético no cérebro dos doentes de DA, que tem início provavelmente muitos anos antes do início dos sintomas da doença. Uma forma indireta de avaliar o metabolismo oxidativo no cérebro é determinar o estado redox do líquido céfalo-raquídeo (LCR) através da concentração de lactato e piruvato naquele fluido orgânico.

**Objetivos:** Avaliar a utilidade da razão entre os níveis de lactato e piruvato no LCR, como indicador precoce de disfunção metabólica na DA. Verificar se as alterações metabólicas são específicas da DA ou se são comuns a outros tipos de défices cognitivos e demência e correlacionar as alterações observadas com a gravidade da demência e com perfis genéticos de risco como o polimorfismo da Apolipoproteína E (APOE).

**Metodologia:** Foram investigados três grupos de diagnóstico estabelecidos com base em critérios standardizados: 67 indivíduos com DA (Critérios NINCDS-ADRDA, 1984), 31 com Defeito Cognitivo Ligeiro (DCL) (Critérios de Petersen, 2001) e 37 com Degenerescência Lobar Fronto-Temporal (DFT) (Critérios de Neary e colaboradores, 1998). A gravidade da DA foi avaliada através da escala Clinical Dementia Rating (CDR), sendo que o grau 0,5 corresponde a demência questionável (equivalente do

DCL), e os estadios 1, 2 e 3, respetivamente a demência ligeira, moderada e grave. Os doseamentos de lactato e piruvato foram efetuados por técnicas colorimétricas, a partir de amostras de LCR colhidas e armazenadas no decurso da investigação diagnóstica. O genótipo da Apolipoproteína E foi determinado em amostras de sangue periférico por PCR seguido de enzimas de restrição. A análise dos dados foi realizada com recurso ao software estatístico *SPSS*.

**Resultados:** Os valores bioquímicos de lactato, piruvato e a razão lactato/ piruvato, doseados no LCR dos indivíduos com DA, DCL e DFT não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos de diagnóstico nem entre géneros. Estes valores bioquímicos também não apresentaram diferenças significativas entre portadores e não portadores do alelo  $\epsilon 4$  do gene ApoE nem entre os diferentes graus de severidade de demência avaliadas pela CDR no grupo com DA.

**Conclusão:** A concentração de piruvato e lactato no LCR, assim como a sua razão (lactato/piruvato) não parecem ser marcadores específicos da DA, apresentando valores semelhantes noutras situações clínicas como o DCL e DFT. Apesar de noutros estudos se terem observado alterações da concentração destes marcadores no LCR e diferenças entre os diferentes graus de severidade na DA, no nosso estudo não encontramos diferenças significativas.

**Palavras-chave:** doença de Alzheimer, líquido céfalo-raquídeo, piruvato, lactato, disfunção mitocondrial.

**Abstract**

**Introduction:** Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia, representing 50 to 80% of all cases. The diagnosis of “probable AD” depends on clinical criteria and neurological and neuropathological tests. The definitive diagnosis of AD can only be determined after *post mortem* examination. The importance of the oxidative pathway and reactive oxygen species as agents in the process of progressive neuronal damage in AD has been widely demonstrated. Deficiencies have been found in the mitochondrial respiratory chain complexes as well as a decrease in energy metabolism in the brain of patients with AD, which probably initiates many years before the onset of symptoms. One indirect way to assess brain oxidative metabolism is by determining the redox state of cerebrospinal fluid (CSF) through the concentration of lactate and pyruvate in that organic fluid.

**Objectives:** To evaluate the usefulness of the ratio between the levels of lactate and pyruvate in CSF as early indicator of metabolic dysfunction in AD. To identify whether the metabolic changes are specific to AD or are common to other types of cognitive deficits and dementia and correlate the changes observed with the severity of dementia and genetic risk profiles such as polymorphism of apolipoprotein E (APOE).

**Methodology:** We investigated three diagnostic groups established based on standard criteria: 67 individuals with AD (NINCDS-ADRDA criteria, 1984), 31 with Mild Cognitive Impairment (MCI) (Petersen criteria, 2001) and 37 with Fronto-Lobar Degeneration temporal (FTD) (Neary *et al* criteria, 1998). The severity of AD was evaluated using the Clinical Dementia Rating Scale (CDR), according to which the degree 0,5 corresponds to questionable dementia (equivalent MCI), and stages 1, 2 and 3, correspond respectively to mild, moderate and severe dementia. Lactate and pyruvate CSF levels were determined by colorimetric assays, using samples collected and stored

during the diagnostic investigation. Genotyping of the gene of apolipoprotein E (ApoE) was made from whole blood and ApoE genotype determined by PCR (polymerase chain reaction) followed by hydrolysis with restriction enzymes. Data analysis was performed using the SPSS statistical software.

**Results:** There were no statistically significant differences in the CSF levels of lactate, pyruvate and lactate/pyruvate ratio, between different groups of diagnosis (AD, MCI and FTD) or between gender. These biochemical values did not show significant differences between carriers and noncarriers of the  $\epsilon 4$  allele of the ApoE gene or between different degrees of severity of dementia assessed by CDR in the group with AD.

**Conclusion:** Concentration of pyruvate and lactate in CSF, as well as their ratio (lactate/pyruvate) don't appear to be specific markers of AD, and they showed similar values in other clinical situations such as MCI and FTD. Although changes in concentration of these markers in CSF and differences between the different degrees of severity in AD have been observed in other studies, our study found no significant differences.

**Keys words:** Alzheimer's disease, cerebrospinal fluid, pyruvate, lactate, mitochondrial dysfunction

## **Introdução**

A Doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência, constituindo 60 a 80% de todos os casos. É uma doença neurodegenerativa, ou seja, crónica, progressiva e irreversível, que se inicia por uma perda de memória, afetando posteriormente outras funções cognitivas e tem um impacto progressivo nas actividades de vida diárias. A DA tem uma apresentação clínica variável, embora as alterações na memória sejam consideradas obrigatórias na doença, associando-se-lhe progressivamente defeitos de linguagem e de outras funções verbais, das capacidades visuo-perceptivas e espaciais, apraxia e das funções executivas (revisto em Snowden *et al.*, 2007).

Alguns doentes apresentam um défice de memória isolado, com preservação das suas actividades de vida diárias, sendo esta situação ou estágio designada/o por Defeito Cognitivo Ligeiro (DCL). Estudos têm demonstrado consistentemente que os indivíduos com DCL apresentam um risco elevado de evoluir para DA, sugerindo-se também que o DCL possa constituir uma entidade de transição para DA; estima-se que 15% destes progridem para demência num espaço de um ano e metade em 3 a 4 anos (Petersen *et al.*, 1999).

Uma situação de diagnóstico diferencial com a DA é a Degenerescência Lobar Fronto-temporal (DFT). Manifesta-se clinicamente por alterações da personalidade e do comportamento social e dificuldades de linguagem (Alzheimer's Association Report 2011).

Atualmente, o diagnóstico clínico da DA é baseado na história clínica (informação recolhida pelo próprio doente e por um informante próximo, familiar ou amigo), na observação médica e no exame neurológico. É fundamental também realizar uma avaliação das funções cognitivas, nomeadamente através do teste Minimal-State



Examination (MMSE) (Folstein *et al.*, 1975), investigar perturbações nas actividades de vida diárias e caracterizar os sintomas comportamentais e psicológicos. O diagnóstico é complementado com exames laboratoriais que permitam excluir co-morbilidades significativas, estudos de imagem estrutural e funcional e, eventualmente, análise do LCR e testes genéticos (Hort *et al.*, 2010). O diagnóstico definitivo é feito apenas por estudo histológico, geralmente exame *post mortem* (Braak and Braak 1991).

Histologicamente a DA é caracterizada por uma degenerescência neuronal com perda de sinapses em áreas estratégicas e pela presença em associação de placas senis, que contém o peptídeo beta amiloide ( $A\beta$ ), e de tranças neurofibrilares intracelulares, compostas por proteína Tau hiperfosforilada (revisto em Guglielmotto *et al.*, 2009). O peptídeo  $A\beta$  é neurotóxico (Oda *et al.*, 1995), condicionando possivelmente alterações oxidativas mitocondriais (Caspersen *et al.*, 2005; Crouch *et al.*, 2007). O mecanismo pelo qual este processo ocorre ainda não está bem esclarecido, no entanto estudos efetuados no DCL e em fases precoces da DA (Butterfield and Lauderback 2002), demonstram um possível insulto por stress oxidativo, condicionando lesão e morte neuronal (revisto em Sultana and Butterfield 2009).

Os neurónios requerem muita energia e não armazenam glicogénio nem realizam neoglicogénese, pelo que a energia que utilizam é obtida através da oxidação da glicose e do lactato (Pellerin *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2003). Na DA, inúmeras proteínas estão alteradas no cérebro, nomeadamente a lactato desidrogenase (LDH) (Bubber *et al.*, 2005) que realiza a conversão reversível de piruvato em lactato em condições anaeróbias. Este enzima pode ser encontrado também na mitocôndria, sendo importante na geração de ATP (Lemire *et al.*, 2008). Este processo é fundamental para a sobrevivência do neurónio e para que este possa assegurar um desempenho das funções cognitivas, especialmente quando a necessidade energética a nível cerebral é elevada

(Mangia *et al.*, 2009), e quando o metabolismo energético está comprometido, como parece acontecer no DCL e na DA (Dimou *et al.*, 2009). Admite-se que estas alterações comecem muitos anos antes do início dos sintomas da doença (Johnson *et al.*, 2009).

A DA é uma doença multi-fatorial, determinada por fatores genéticos e ambientais. O risco genético está associado à idade de início da doença e à existência de história familiar, sendo que nas formas tardias, se relaciona fortemente com a presença do alelo  $\epsilon 4$  do gene da Apolipoproteína E (ApoE). O alelo  $\epsilon 4$ , além de aumentar o risco de desenvolver a doença, antecipa a idade de início, agrava o prognóstico (Petersen *et al.*, 1995) e parece também estar relacionado com alterações do metabolismo energético, nomeadamente ao nível do complexo  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, e eventualmente precipitar a formação de placas neuronais e tranças neurofibrilares (Gibson *et al.*, 2000).

Uma forma indireta de avaliar o metabolismo oxidativo no cérebro é determinar o estado redox do líquido céfalo-raquídeo (LCR), através da determinação da concentração de lactato e piruvato naquele fluído orgânico. Este estudo tem como objetivos avaliar a utilidade da razão entre os níveis de lactato e piruvato no LCR, como indicador precoce de disfunção metabólica na DA; verificar se as alterações metabólicas são específicas da DA ou se são comuns a outros tipos de défices cognitivos e demência e correlacionar as alterações observadas com a gravidade da demência e com perfis genéticos de risco como o polimorfismo da ApoE.

## **População e Métodos**

### **População**

O grupo de estudo foi constituído por 67 doentes com o diagnóstico provável de DA de acordo com os critérios do National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) (McKhann *et al.*, 1984), investigados no Serviço de Neurologia do Hospital Universidade de Coimbra. Segundo estes, os critérios para o diagnóstico clínico de DA provável são: a) demência estabelecida por exame clínico e documentada pelo Mini-Exame do Estado Mental, escala de demência de Blessed, ou avaliação semelhante e confirmada por testes neuropsicológicos; b) défices em duas ou mais áreas da cognição; c) agravamento progressivo da memória e outras funções cognitivas; d) ausência de distúrbio da consciência; e) início entre os 40 e 90 anos, mais frequentemente após os 65 anos; f) e ausência de doenças sistêmicas ou outras doenças cerebrais que por si só possam provocar declínio progressivo de memória e cognição. O diagnóstico de DA provável é auxiliado por: a) deterioração progressiva de funções cognitivas específicas como linguagem (afasia), capacidade motora (apraxia) e percepção (agnosia); b) dificuldade nas actividades da vida diárias e padrões anormais de comportamento; c) história familiar de demência (particularmente se confirmada por exame neuropatológico); d) exames laboratoriais compatíveis com o diagnóstico: punção lombar (normal, pelas técnicas usuais), electroencefalograma (EEG) ( padrão normal ou alterações inespecíficas, como aumento de ondas lentas), tomografia computadorizada (TC) do crânio (atrofia cerebral, com progressão documentada por exames seriados). Outras características clínicas consistentes com o diagnóstico de DA provável, após exclusão de outras causas de demência, incluem: a) “Platôs” no curso progressivo da doença; b) sintomas associados: depressão, insónia, incontinência,

delírios, ilusões, alucinações, incontinência verbal, explosões emocionais, agitação, distúrbios sexuais, perda de peso; c) outras anormalidades neurológicas, observadas em alguns doentes, especialmente com doença avançada e incluindo sinais motores, aumento do tônus muscular, mioclonias ou distúrbio da marcha; d) convulsões em doença avançada; e) TC de crânio normal para a idade. As características que tornam o diagnóstico da DA provável incerto ou pouco provável incluem: a) início súbito; b) sinais neurológicos focais (tais como hemiparésia, défices sensitivos, visuais, distúrbio da coordenação motora) no início do curso da doença; c) e convulsões ou distúrbios da marcha nos estágios iniciais da doença.

O grupo de estudo foi também composto por um grupo de 31 doente recrutados a partir da consulta de demências, com os critérios standard para **DCL** (Petersen *et al.*, 2001): (1) queixas de memória, corroboradas por um familiar; (2) défice de memória objectivável; (3) função cognitiva normal; (4) actividades de vida diárias intactas e (5) não preenchimento de critérios para demência.

Para além dos grupos de estudo anteriormente mencionados, também foi estudado um terceiro grupo composto por 38 doentes com diagnóstico provável de **DFT** com base em critérios internacionais - critérios de Neary e colaboradores para a DFT (Neary *et al.*, 1998) e de Mesulam (Mesulam 2001) para Afasia Progressiva Primária revistos pelo Working Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease (The Lund and Manchester Groups (1994)). Critérios de inclusão: o desenvolvimento de défices cognitivos e comportamentais manifestados por (a) uma alteração precoce e progressiva na personalidade, caracterizada por dificuldade em adaptar o comportamento, conduzindo frequentemente a actividades ou respostas inapropriadas, ou (b) alteração precoce e progressiva da linguagem, caracterizada por alterações na expressão ou dificuldades severas na nomeação e reconhecimento do significado de

palavras. Estes défices causam alterações significativas no funcionamento social e ocupacional e representam um declínio significativo em relação ao período anterior ao aparecimento da doença. Critérios de exclusão: os défices delineados em (a) e (b) não deverão ser atribuíveis a outras alterações do sistema nervoso, não devem ocorrer exclusivamente durante episódios de delírio, nem deverão ser atribuíveis a um diagnóstico psiquiátrico (ex: depressão).

Todos os doentes foram submetidos a critérios convencionais, tendo sido feita uma avaliação geral do doente com base na história clínica detalhada obtida pelo próprio doente e um informante fiável próximo deste, numa avaliação neurológica, psiquiátrica e neuropsicológica. Com o objetivo de excluir outras causas de demência ou patologias médicas foi realizada uma avaliação médica com base em exames laboratoriais como perfil bioquímico, hemograma, testes de função tiróideia, níveis de vitamina B12 e ácido fólico, serologia para a sífilis e doença de Lyme, exame imagiológico (Ressonância Magnética), EEG e análise de LCR.

A avaliação cognitiva foi realizada segundo versões portuguesas do Mini-Mental State Examination (MMSE)(Folstein *et al.*, 1975); Alzheimer's Disease Assessment Scale – Cognitive (ADAS – Cog) (Mohs *et al.*, 1983; Rosen *et al.*, 1984) e Clinical Dementia Rating (CDR) (Berg 1988). Relativamente ao MMSE sublinha-se que quanto menor a pontuação, maior a gravidade do défice cognitivo e no que respeita à ADAS-COG esta relação é inversa. A CDR é uma escala de avaliação da capacidade global (considera informações dos domínios cognitivo e funcional) e permite 4 graus classificativos : CDR 0,5 (demência questionável ou DCL); CDR 1 (demência ligeira); CDR 2 (demência moderada); CDR 3 (demência grave).

O estudo foi submetido ao Comité de Ética do Hospital Universidade de Coimbra e todos os participantes deram o seu consentimento informado.

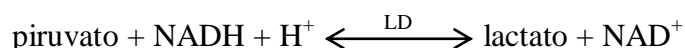
### Doseamentos Bioquímicos

Os doseamentos de lactato e piruvato foram efetuados a partir de amostras de LCR colhidas no decurso da investigação diagnóstica.

#### Piruvato

Para o doseamento do piruvato, imediatamente após a colheita, procedeu-se à desproteinização de 0,5 mL de LCR com 1 mL de ácido perclórico a 8% e manteve-se no gelo durante 15 minutos. Agitou-se muito bem no vortéx durante 30 segundos e em seguida centrifugou-se 1500g durante 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante límpido obtido para um tubo de plástico e congelou-se a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

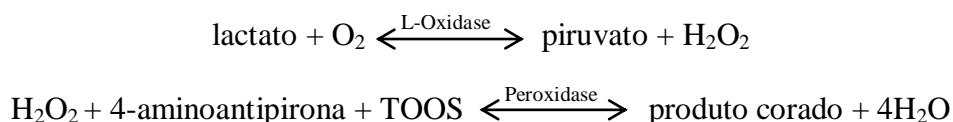
O piruvato na presença de NADH é convertido em lactato por ação da enzima lactato desidrogenase (LD). A oxidação do NADH a  $\text{NAD}^+$  é determinada pelo decréscimo da absorvância a 340 nm e é proporcional à concentração de piruvato inicialmente presente na amostra.



Sendo assim, o doseamento do piruvato foi feito por método enzimático, com deteção em UV, segundo kit da Ben (PY8825).

#### Lactato

O doseamento do lactato foi feito diretamente em amostras de LCR previamente centrifugadas (1500g, 10 minutos), por método enzimático, segundo kit da RANDOX (LC2389). Esta metodologia baseia-se nas seguintes reações, com deteção do produto corado a 550 nm.



### **Genotipagem do gene da Apolipoproteína E (ApoE)**

A genotipagem do gene da ApoE foi efetuada a partir de amostras de sangue total. O DNA foi isolado usando reagentes comerciais segundo as instruções do fabricante (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) e o genótipo ApoE foi determinado por PCR (*polymerase chain reaction*) seguido de hidrólise com enzimas de restrição, segundo o método descrito por Cook (Cook *et al.*, 1994).

### **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o programa *SPSS 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences)*. Para testar a associação entre duas variáveis qualitativas nominais utilizou-se o teste do qui-quadrado. Para análise da distribuição das variáveis quantitativas contínuas foi aplicado o teste Kolmogorov-smirnov. Para testar a associação entre duas variáveis quantitativas contínuas que não apresentaram distribuição normal foi aplicado o teste de Mann-Whitney U e quando mais do que duas variáveis quantitativas contínuas utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. As variáveis que apresentaram uma distribuição normal, o teste aplicado para testar a sua associação foi one-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, no caso de existir homogeneidade da variável ou pós-teste Games-Howell, caso a amostra não seja homogênea.

O nível de significância adotado nestes testes foi de  $p < 0,05$ .

### Resultados

O estudo incluiu 135 doentes, 67 diagnosticados com DA, 31 com DCL e 37 com DFT que integraram o estudo desde 2002 a 2011.

Os três grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao género, à idade e à escolaridade (tabela I).

**Tabela I – Características demográficas da população**

	DA (n=67)	DCL (n=31)	DFT (n=37)
género (F/M)	41/26	20/11	17/20
idade (anos)	64,98±9,5	65,65±7,9	64,27±11,1
(mínimo –máximo)	(51-84)	(48-79)	(38-82)
escolaridade (anos)	5,58±5,033	6,96±4,435	6,6±5,1

Os dados encontram-se representados como Média ± SD.

Em alguns doentes foi possível investigar se tinham história familiar e a frequência de portadores de alelo  $\epsilon 4$  do gene da ApoE. Em relação à presença de história familiar, os três grupos de estudo não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si. A frequência de portadores de alelo  $\epsilon 4$  do gene ApoE era muito superior nos grupos com DA ou DCL, relativamente à DFT, mas a diferença só alcançou significância na comparação entre os grupos DA e DFT (tabela II).



**Tabela II – Características demográficas da população (continuação)**

	DA (n=49)	DCL (n= 26)	DFT (n=28)
história familiar %	40	57	46
portadores do alelo $\epsilon 4$ %	55	42	26,23*

Os dados encontram-se representados como Média  $\pm$  SD.

\*  $p < 0,05$  vs. DA.

Na tabela III encontram-se representadas as características clínicas da população em estudo, sendo que no grupo com DA as médias do MMSE eram inferiores e na ADAS-COG superiores às dos outros grupos de estudo (ambos os índices são indicadores de uma maior gravidade do déficit cognitivo). Os grupos DCL e DFT não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si ao nível do MMSE e o grupo DA não apresentou diferenças estatisticamente significativas comparativamente ao grupo DFT, relativamente à escala CDR.

**Tabela III – Perfil clínico da população**

	DA (n=62)	DCL (n=31)	DFT (n=37)
MMSE	16,5 $\pm$ 5,8	26,7 $\pm$ 3,3*	22,3 $\pm$ 6,1*
ADAS-COG <sup><math>\beta</math></sup>	25,4 $\pm$ 10,7	10,1 $\pm$ 5,2*	18,1 $\pm$ 11,4*
CDR (%) <sup><math>\Omega</math></sup>			
0,5	0	100	20,8
1	54,5		45,8
2 e 3	45,5		37,5

Os dados encontram-se representados como Média  $\pm$  SD.

\*  $p < 0,05$  vs. DA.

<sup>$\beta$</sup>  Avaliada em 37 DA, 27 DCL e 17 DFT.

<sup>$\Omega$</sup>  Avaliada em 44 DA, 31 DCL e 24 DFT.

CDR de 1 corresponde a demência ligeira, CDR de 2 a demência moderada e CDR de 3 a demência severa.

Os valores bioquímicos de lactato, piruvato e a razão lactato/ piruvato, doseados no LCR dos indivíduos em estudo não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos de diagnóstico (tabela IV) nem entre géneros (tabela V).

**Tabela IV – Determinação dos níveis de lactato e piruvato no LCR na população em estudo**

	<b>DA (n=64)</b>	<b>DCL (n=30)</b>	<b>DFT (n=32)</b>
<b>lactato (mM)</b>	1,178±0,333	1,134±0,239	1,209±0,336
<b>piruvato (mM)</b>	0,098±0,029	0,101±0,022	0,102± 0,035
<b>lactato/piruvato</b>	12,599±4,183	11,651±3,692	13,420±5,665

Os dados encontram-se representados como Média ± SD.

**Tabela V – Análise dos níveis de lactato e piruvato no LCR entre género**

	<b>Feminino (n=75)</b>	<b>Masculino (n=50)</b>
<b>lactato (mM)</b>	1,162±0,342	1,195±0,266
<b>piruvato (mM)</b>	0,098±0,030	0,102±0,028
<b>lactato/ piruvato</b>	12,572±4,242	12,526±4,828

Os dados encontram-se representados como Média ± SD.

No grupo de doentes com DA foi avaliada a relação dos valores de piruvato, lactato e razão lactato/ piruvato, com a presença do alelo ε4 (tabela VI) e com a severidade da demência avaliada pela CDR (tabela VII), não tendo sido encontrada também nenhuma relação estatisticamente significativa.

**Tabela VI – Determinação dos níveis de lactato e piruvato no LCR em função da presença do genótipo ApoE**

	<b>portadores do alelo ε4 (n= 27)</b>	<b>não portadores do alelo ε4 (n=22)</b>
<b>lactato (mM)</b>	1,180±0,249	1,106±0,298
<b>piruvato (mM)</b>	0,101±0,033	0,096±0,031
<b>lactato/ piruvato</b>	12,793±3,915	11,949±4,782

Os dados encontram-se representados como Média ± SD

**Tabela VII – Relação dos níveis de lactato e piruvato no LCR em função da severidade da demência.**

	<b>CDR = 1 (n=24)</b>	<b>CDR =2 ou 3 (n=20)</b>
<b>lactato (mM)</b>	1,196 ±0,414	1,071±0,309
<b>piruvato (mM)</b>	0,105±0,035	0,091±0,029
<b>lactato/ piruvato</b>	12,429±4,479	12,450±4,231

Os dados encontram-se representados como Média ± SD

### **Discussão**

Foram estudados três grupos de indivíduos, 67 com DA, 31 com DCL e 37 com DFT e comparadas as suas concentrações de piruvato, lactato e a razão piruvato/lactato no LCR, não tendo revelado diferenças significativas. No grupo com DA, estes marcadores foram também comparados tendo em conta a presença do alelo  $\epsilon 4$  do gene da ApoE e o grau de severidade da demência através da CDR, não tendo os resultados revelado diferenças significativas.

Na DA a taxa de metabolismo cerebral está diminuída, assim como em estádios iniciais da doença e em DCL (Dimou *et al.*, 2009). A diminuição de energia cerebral está correlacionada com alterações a nível mitocondrial, nomeadamente com proteínas como a lactato desidrogenase e o complexo piruvato desidrogenase (Reed *et al.*, 2008) que catalizam o piruvato. No nosso estudo, a concentração de piruvato e lactato dos indivíduos com DA, DCL e DFT não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si. Outras demências têm também sido comparadas com a DA, como a demência vascular, tendo também apresentado valores elevados de piruvato e lactato no LCR, com um padrão bioquímico bastante semelhante ao da DA (Parnetti *et al.*, 2000). Tanto este último estudo como o nosso revelaram baixa especificidade na quantificação de lactato e piruvato no LCR para diagnóstico da DA.

Para uma avaliação mais correta dos valores de lactato e piruvato no LCR seria de extrema importância um grupo controlo, para que pudéssemos comparar a nossa amostra com indivíduos sem patologia neurológica. Dado que a realização de uma punção lombar em indivíduos saudáveis, levanta questões éticas no nosso país, a obtenção de um grupo controlo para este estudo acarreta bastantes dificuldades. Para além deste facto, a determinação de piruvato no LCR obriga à desproteinização

imediate, método não utilizado sistematicamente na análise do LCR, pelo que torna mais difícil esta tarefa.

Apesar de serem poucos os valores de referência de lactato e piruvato na literatura, foi possível recolher valores que considerámos como referência para o lactato entre 0,484 e 2,100 mM (média  $\pm$  2SD)(Parnetti *et al.*, 1995; Parnetti *et al.*, 1995; Vamosi *et al.*, 1983) e para o piruvato entre 0,010 e 0,141 mM (média  $\pm$  2SD) (Parnetti *et al.*, 1995; Parnetti *et al.*, 1995; Vamosi *et al.*, 1983). Ao comparar estes valores com as médias das concentrações de lactato e piruvato dos três grupos estudados, verificou-se que aparentemente estas medições encontravam-se ligeiramente elevadas, parecendo ser um aumento precoce. De facto, em 1995 Parnetti demonstrou um aumento das concentrações de lactato e piruvato no LCR da DA, quando comparadas com um grupo controlo (Parnetti *et al.*, 1995). Este estudo apresentava uma amostra mais pequena (30 DA e 23 controlos) que a nossa, no entanto as características demográficas e clínicas, como média de idades e valores de MMS-E eram semelhantes às da nossa amostra.

Apesar de já ter sido sugerido que o aumento de lactato e do piruvato no LCR está associado à gravidade de défice cognitivo (Parnetti *et al.*, 1995), no nosso estudo não se encontraram diferenças significativas no grupo com DA entre os diversos estadios de gravidade avaliados pela CDR. Sendo assim, não parece existir uma associação entre estes parâmetros bioquímicos e o grau de défice cognitivo.

O género não está associado definitivamente ao desenvolvimento de DA, com um risco mais elevado para o género feminino (Jorm and Jolley 1998). Na nossa população de estudo, as mulheres eram também mais prevalente, mas quando comparámos as concentrações de piruvato e lactato e a sua razão não foi possível provar influências do género.

A presença do alelo  $\epsilon 4$  do gene ApoE é o fator de prognóstico de maior relevância na DA, tendo maior probabilidade de evoluir para esta patologia quem o possua (Petersen *et al.*, 1995). A sua presença está associada não só à formação de placas neuronais e tranças neurofibrilares, assim como, a alterações no metabolismo energético, nomeadamente ao nível do complexo  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, sugerindo disfunção metabólica e mitocondrial (Gibson *et al.*, 2000). Apesar desta associação, no nosso estudo não se encontraram diferenças significativas de concentração de piruvato e lactato entre os indivíduos portadores do alelo  $\epsilon 4$  e os não portadores, isto é, não se encontraram diferenças significativas na alteração do metabolismo energético entre os dois grupos.

Apesar deste estudo não ter revelado diferenças na concentração de piruvato e lactato de LCR entre os diferentes diagnósticos estudados, não significa que não haja disfunção metabólica associada à DA. Noutros estudos, e comparativamente a grupos controlo, verificou-se que no DCL e na DA os doentes apresentavam níveis de piruvato e de lactato ligeiramente aumentados, corroborando a presença de uma disfunção metabólica (Parnetti *et al.*, 1995; Pugliese *et al.*, 2005). Pelos nossos resultados, somos levados a propor que a determinação dos níveis de lactato e de piruvato não será de utilidade no diagnóstico diferencial da DA, por não apresentar especificidade.

É fundamental continuar a investigar a fisiopatologia da demência e desenvolver biomarcadores que permitam um diagnóstico mais precoce. Este tem sido um objetivo recente na DA, salientando-se a investigação de biomarcadores no LCR (Sultana and Butterfield 2009). Relativamente ao estado redox e ao nosso estudo, seria importante associar a análise de um grupo controlo, no sentido de valorizar os resultados obtidos, uma vez que eles não excluem uma disfunção metabólica comum às situações patológicas investigadas.

### **Agradecimentos**

Este foi um trabalho realizado com a ajuda preciosa de algumas pessoas, e como tal gostaria de prestar o meu agradecimento.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Exma. Professora Doutora Isabel Santana, Professora de Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, minha Mestre e orientadora neste projecto, pelo desafio proposto. A ela agradeço a sua dedicação e disponibilidade em tutorar-me neste projeto, a sua orientação bibliográfica e a sua ajuda na revisão de todos os textos presentes ao longo deste trabalho.

Gostaria também de prestar um grande e reconhecido agradecimento à Doutora Inês Baldeiras pela disponibilidade frequentemente demonstrada ao longo deste projeto, pelo apoio e preciosa ajuda na recolha e tratamento dos dados, pela orientação e ajuda bibliográfica e pela sua revisão constante dos textos aqui presentes.

Agradeço também à Dr.<sup>a</sup> Catarina Cunha e Dr.<sup>a</sup> Diana Duro, psicólogas no serviço de Neurologia, por todo o apoio e disponibilidade prestados na recolha da amostra clínica.

Agradeço ao Dr. João Nobre, Dr. Miguel Pereira e Dr. Pedro Silva, meus colegas, pela orientação e ensinamento informático utilizado neste projeto.

Por último, gostaria apenas de agradecer aos meus pais e amigos, em especial à minha mãe e às minhas amigas Carolina e Mariana por todo o apoio moral, emocional e ajuda que me deram durante a execução deste projeto.

**Referências**

- (2011). "2011 Alzheimer's disease facts and figures." W V Med J **107**(3): 82-83.
- Berg, L. (1988). "Clinical Dementia Rating (CDR)." Psychopharmacol Bull **24**(4): 637-639.
- Braak, H. and E. Braak (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." Acta Neuropathol **82**(4): 239-259.
- Bubber, P., *et al.* (2005). "Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications." Ann Neurol **57**(5): 695-703.
- Butterfield, D. A. and C. M. Lauderback (2002). "Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress." Free Radic Biol Med **32**(11): 1050-1060.
- Caspersen, C., *et al.* (2005). "Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease." FASEB J **19**(14): 2040-2041.
- Cook, S. M., *et al.* (1994). "Detection and characterization of atypical mycobacteria by the polymerase chain reaction." Diagn Mol Pathol **3**(1): 53-58.
- Crouch, P. J., *et al.* (2007). "Mitochondria in aging and Alzheimer's disease." Rejuvenation Res **10**(3): 349-357.
- Dimou, E., *et al.* (2009). "Amyloid PET and MRI in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment." Curr Alzheimer Res **6**(3): 312-319.
- Folstein, M. F., *et al.* (1975). "'Mini-mental state'. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician." J Psychiatr Res **12**(3): 189-198.
- Gibson, G. E., *et al.* (2000). "Mitochondrial damage in Alzheimer's disease varies with apolipoprotein E genotype." Ann Neurol **48**(3): 297-303.



- Guglielmotto, M., *et al.* (2009). "Oxidative stress and hypoxia contribute to Alzheimer's disease pathogenesis: two sides of the same coin." ScientificWorldJournal **9**: 781-791.
- Hort, J., *et al.* (2010). "EFNS guidelines for the diagnosis and management of Alzheimer's disease." Eur J Neurol **17**(10): 1236-1248.
- Johnson, D. K., *et al.* (2009). "Longitudinal study of the transition from healthy aging to Alzheimer disease." Arch Neurol **66**(10): 1254-1259.
- Jorm, A. F. and D. Jolley (1998). "The incidence of dementia: a meta-analysis." Neurology **51**(3): 728-733.
- Lemire, J., *et al.* (2008). "Mitochondrial lactate dehydrogenase is involved in oxidative-energy metabolism in human astrocytoma cells (CCF-STTG1)." PLoS One **3**(2): e1550.
- Mangia, S., *et al.* (2009). "The in vivo neuron-to-astrocyte lactate shuttle in human brain: evidence from modeling of measured lactate levels during visual stimulation." J Neurochem **109** Suppl 1: 55-62.
- McKhann, G., *et al.* (1984). "Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease." Neurology **34**(7): 939-944.
- Mesulam, M. M. (2001). "Primary progressive aphasia." Ann Neurol **49**(4): 425-432.
- Mohs, R. C., *et al.* (1983). "The Alzheimer's disease assessment scale: an instrument for assessing treatment efficacy." Psychopharmacol Bull **19**(3): 448-450.
- Neary, D., *et al.* (1998). "Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria." Neurology **51**(6): 1546-1554.
- Oda, T., *et al.* (1995). "Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress." Exp Neurol **136**(1): 22-31.

- Parnetti, L., *et al.* (1995). "Increased CSF pyruvate levels as a marker of impaired energy metabolism in Alzheimer's disease." J Am Geriatr Soc **43**(3): 316-318.
- Parnetti, L., *et al.* (1995). "Increased cerebrospinal fluid pyruvate levels in Alzheimer's disease." Neurosci Lett **199**(3): 231-233.
- Parnetti, L., *et al.* (1995). "Cerebrospinal fluid neuron-specific enolase in Alzheimer's disease and vascular dementia." Neurosci Lett **183**(1-2): 43-45.
- Parnetti, L., *et al.* (2000). "Cerebrospinal fluid pyruvate levels in Alzheimer's disease and vascular dementia." Neurology **54**(3): 735-737.
- Pellerin, L., *et al.* (1998). "Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle." Dev Neurosci **20**(4-5): 291-299.
- Petersen, R. C., *et al.* (1995). "Apolipoprotein E status as a predictor of the development of Alzheimer's disease in memory-impaired individuals." JAMA **273**(16): 1274-1278.
- Petersen, R. C., *et al.* (1999). "Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome." Arch Neurol **56**(3): 303-308.
- Petersen, R. C., *et al.* (2001). "Practice parameter: early detection of dementia: mild cognitive impairment (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology." Neurology **56**(9): 1133-1142.
- Pugliese, M., *et al.* (2005). "Severe cognitive impairment correlates with higher cerebrospinal fluid levels of lactate and pyruvate in a canine model of senile dementia." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **29**(4): 603-610.
- Reed, T., *et al.* (2008). "Redox proteomic identification of 4-hydroxy-2-nonenal-modified brain proteins in amnesic mild cognitive impairment: insight into the role of lipid peroxidation in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease." Neurobiol Dis **30**(1): 107-120.

Rosen, W. G., *et al.* (1984). "A new rating scale for Alzheimer's disease." Am J Psychiatry **141**(11): 1356-1364.

Smith, D., *et al.* (2003). "Lactate: a preferred fuel for human brain metabolism in vivo." J Cereb Blood Flow Metab **23**(6): 658-664.

Snowden, J. S., *et al.* (2007). "Cognitive phenotypes in Alzheimer's disease and genetic risk." Cortex **43**(7): 835-845.

Sultana, R. and D. A. Butterfield (2009). "Oxidatively modified, mitochondria-relevant brain proteins in subjects with Alzheimer disease and mild cognitive impairment." J Bioenerg Biomembr **41**(5): 441-446.

Vamosi, B., *et al.* (1983). "Lactate and pyruvate content of the human cisternal cerebrospinal fluid. Normal values, age and sex dependency, correlations with glucose concentrations." Arch Psychiatr Nervenkr **232**(6): 521-532.