



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

AFRÂNIO CÔGO DESTEFANI

**PAPEL DA OVARIOTECTOMIA NO APARECIMENTO DE
SINAIS HISTOPATOLÓGICOS ASSOCIADOS AO MAL
DE ALZHEIMER EM CAMUNDONGOS APOE
*KNOCKOUT***

**VITÓRIA
2010**

AFRÂNIO CÔGO DESTEFANI

**PAPEL DA OVARIOTECTOMIA NO APARECIMENTO DE
SINAIS HISTOPATOLÓGICOS ASSOCIADOS AO MAL
DE ALZHEIMER EM CAMUNDONGOS APOE
*KNOCKOUT***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ian Victor Silva.

Co-orientador: Prof. Dra. Letícia Batista Azevedo Rangel.

**VITÓRIA
2010**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

D476p Destefani, Afrânio Côgo, 1982-
Papel da ovariectomia no aparecimento de sinais
histopatológicos associados ao Mal de Alzheimer em
camundongos APOE Knockout / Afrânio Côgo Destefani. – 2010.
136 f. : il.

Orientador: Ian Victor Silva.

Co-Orientador: Letícia Batista Azevedo Rangel.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Alzheimer, Doença de. 2. Estrógenos. 3. Ovariectomia. 4.
Proteínas tau. 5. Fator neurotrófico derivado do encéfalo. 6.
Apolipoproteína E. I. Silva, Ian Victor. II. Rangel, Letícia Batista
Azevedo. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de
Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



**“PAPEL DA OVARIOTECTOMIA NO APARECIMENTO DE
SINAIS HISTOPATOLÓGICOS ASSOCIADOS AO MAL DE
ALZHEIMER EM CAMUNDONGOS APOE *KNOCKOUT*”**

Afrânio Côgo Destefani

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada por:

- Prof. Dr. Ian Victor Silva (UFES)
(Orientador)

- Prof. Dra. Leticia Batista Azevedo (UFES)
(Co-Orientador)

- Prof. Dr. Rodrigo Romcy Pereira (UFES)
(Membro Interno)

- Prof. Dr. Jean Christophe Houzel
(Membro Externo-UFRJ)

Vitória-ES, 27 de Julho de 2010.

“Os que confiam no Senhor são como o monte de Sião, que não se pode abalar, mas permanece para sempre. (Salmo 125:1)”

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus familiares e amigos.

Ao Prof. Dr. Ian pelo apoio e oportunidade que me proporcionou ao me orientar neste trabalho.

À sua esposa, Prof.^a Dr.^a Letícia, pela ajuda direta e indireta na execução deste trabalho.

Ao Prof. Diego pela prestatividade em todos os momentos da execução do projeto sendo mais que um colega de laboratório.

Ao Prof. Dr. Jones pelos excelentes conselhos ofertados para a melhoria contínua do pensar científico.

Ao Prof. Dr. Breno que colocou-nos à disposição o seu intelecto e os equipamentos para a realização histomorfométrica dos cérebros e dos úteros dos animais utilizados nos experimentos.

À Profa. Dra. Silvana que gentilmente cedeu-nos o biotério, os animais experimentais e o microscópio de fluorescência.

Aos colaboradores Hélio, Luciene e Lurdes.

À todos os colegas do Curso de Pós-Graduação, pela atenção, união e companheirismo durante todo o tempo em que estivemos juntos.

Ao Sr. Sebastião pelos anos de companheirismo e profissionalismo que me proporcionaram o amadurecimento necessário para a finalização desta etapa em minha vida.

RESUMO

A Doença de Alzheimer é uma moléstia degenerativa progressiva que compromete elementos do sistema nervoso central, associado com a perda de memória e com a demência. Na DA são observadas placas extracelulares, que são constituídas por depósitos do peptídeo beta-amilóide e de emaranhados neurofibrilares intracelulares, que podem estar associados aos filamentos intermediários, principalmente na região do hipocampo e do córtex cerebral. Estudos moleculares e anamnéticos têm sugerido a presença de elementos genéticos associados a esta fisiopatologia, como os genes APOE, BETA-AMILÓIDE E TAU além dos níveis glicêmicos e lipídicos. Sabe-se que a incidência da doença aumenta rapidamente com o avanço da idade e que a Doença de Alzheimer afeta proporcionalmente mais as mulheres do que os homens. Acredita-se que o declínio dos níveis de hormônios gonodais em mulheres pós-menopausa pode contribuir para a diferença observada entre os sexos. O presente trabalho objetivou verificar a influência da ApoE e dos hormônios sexuais femininos sobre os aspectos moleculares envolvidos na formação da placa senil no sistema nervoso central de camundongos fêmeas C57 e ApoE KO utilizando a ovariectomia (OVX) como agente mimetizador da menopausa em mulheres. Foram utilizados 14 camundongos fêmeas C57 e 14 camundongos fêmeas ApoEKO (knockout para o gene da apolipoproteína E) com oito meses. Realizaram-se técnicas histológicas (Cajal, Bielschowsky e Tioflavina S) para a visualização de placas senis em seções cerebrais. Análises plasmáticas de glicose, colesterol, triglicerídeos, c-HDL, VLDL e LDL também foram avaliadas. A formação e a distribuição da proteína β A, da proteína Tau, da proteína Tau [pS199] e do BDNF foram analisadas via ELISA. Os resultados obtidos sugeriram que a ovariectomia promoveu a depleção significativa de estradiol (E2) e BDNF e aumentou significativamente os níveis de β A, Tau e Tau [pS199] em diferentes compartimentos biológicos quando comparados ao controles. Neste ínterim, sugere-se que os hormônios sexuais femininos juntamente com a ApoE modulam o *clearance* de algumas moléculas associadas à formação da placa senil e emaranhados neurofibrilares característicos da Doença de Alzheimer.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, Apolipoproteína E, Proteína Tau, BDNF, Estrógenos e Ovariectomia.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is a progressive degenerative disease that compromises elements of the central nervous system, associated with memory loss and dementia. Are observed in AD extracellular plaques, which consist of deposits of beta-amyloid peptide and intracellular neurofibrillary tangles, which can be associated with intermediate filaments, mainly in the hippocampus and cerebral cortex. Anamnesis and molecular studies have suggested the presence of genetic elements involved in this pathophysiology, such as APOE gene, beta-amyloid and TAU beyond glycemic and lipid levels. It is known that the disease incidence increases rapidly with advancing age and Alzheimer's disease affects proportionately more women than men. It is believed that the decline in gonadal hormone levels in postmenopausal women may contribute to the observed difference between the sexes. This study aimed to determine the influence of ApoE and female sex hormones on the molecular aspects involved in the formation of senile plaques in the brain of female mice C57 and ApoE knockout using ovariectomized (OVX) as an agent mimicking menopause in women. We used 14 female mice C57 and 14 female mice ApoEKO (knockout for apolipoprotein E gene) at eight months. There were histological techniques (Cajal, Bielschowsky and Thioflavine S) for the visualization of senile plaques in brain sections. Analysis of plasma glucose, cholesterol, triglycerides, c-HDL, VLDL and LDL were also evaluated. The formation and distribution of β A, Tau protein and Tau [pS199] and BDNF were analyzed via ELISA. The results suggest that ovariectomy promoted the significant depletion of estradiol (E2) and BDNF and significantly increased levels of β A, Tau and Tau [pS199] in different biological compartments when compared to controls. In the meantime, we suggest that female sex hormones along with ApoE modulates the clearance of some molecules related to the formation of senile plaques and neurofibrillary tangles characteristic of Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's disease, Apolipoprotein E, Tau protein, BDNF, Estrogen and Ovariectomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Placas e emaranhados neurofibrilares	25
Figura 2- Metabolismo da PPA com geração de proteína β A	26
Figura 3- Fatores desencadeantes da formação de placas senis	29
Figura 4- A influência da proteína Tau na Doença de Alzheimer	31
Figura 5- Biossíntese dos Estrógenos	37
Figura 6- Interações entre o cérebro e o sistema reprodutor endócrino.....	42
Figura 7- Papel da ApoE na regulação lipídica.....	46
Figura 8- Curso temporal do crescimento dos animais APOEKO e WT em termos de peso corporal (g)	52
Figura 9- Curso temporal do crescimento dos animais APOEKO e WT em termos de comprimento da cauda (cm).....	53
Figura 10- Identificação anatômica do aparelho reprodutor feminino de camundongos	55
Figura 11- Níveis plasmáticos de E2	67
Figura 12- Níveis plasmáticos de P4	68
Figura 13- Níveis plasmáticos de Testosterona	69
Figura 14- Peso úmido dos úteros e dos cornos uterinos.....	70
Figura 15- Tamanho do endométrio	71
Figura 16- Prancha de seções dos cornos uterinos.....	73
Figura 17- Efeitos da ovariectomia (OVX) nos animais APOEKO e WT	74
Figura 18- Concentração plasmática de glicose	75
Figura 19- Concentração plasmática de colesterol total	76
Figura 20- Concentração plasmática de triglicerídeos	77
Figura 21- Concentração plasmática de c-HDL	78
Figura 22- Concentração plasmática de LDL.....	79
Figura 23- Concentração plasmática de VLDL	80

Figura 24- Concentração plasmática de proteína β A.....	81
Figura 25- Concentração plasmática de proteína Tau Total	82
Figura 26- Concentração plasmática de proteína Tau [pS199].....	83
Figura 27- Concentração no extrato cerebral de proteína β A	84
Figura 28- Concentração no extrato cerebral de proteína Tau Total.....	85
Figura 29- Concentração no extrato cerebral de proteína Tau [pS199]	86
Figura 30- Concentração de proteína β A em urina de 24H	87
Figura 31- Concentração de proteína Tau Total em urina de 24H	88
Figura 32- Concentração de proteína Tau [pS199] em urina de 24H.....	89
Figura 33- Concentração plasmática de BDNF	90
Figura 34- Concentração de BDNF no extrato cerebral.....	91
Figura 35- Seção sagital de cérebro de camundongo	92
Figura 36- Seção coronal de cérebro de camundongo	93
Figura 37- Seções do Córtex Cerebral e do Hipocampo coradas pela Técnica de Cajal.....	95
Figura 38- Seções do Córtex Cerebral e do Hipocampo coradas pela Técnica de Bielschowsky	96
Figura 39- Seções do Córtex Cerebral e do Hipocampo coradas com Tioflavina S...	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Modelos de camundongos transgênicos para a PPA.....	44
Tabela 2- Alelos da APOE e seus fenótipos	47
Tabela 3- Variáveis mensuradas na análise morfométrica dos úteros e cornos uterinos	57
Tabela 4- Padrões métricos adotados para análise morfométrica dos úteros e cornos uterinos.....	58
Tabela 5- Análises Bioquímicas realizadas no plasma	63
Tabela 6- Prancha dos cornos uterinos extraídos aos oito meses de vida.....	71
Tabela 7- Valores Médios \pm EPM dos padrões métricos mensurados na análise morfométrica dos cornos uterinos	72
Tabela 8- Valores de p dos padrões métricos utilizados para a análise morfométrica dos cornos uterinos	73
Tabela 9- Sumário dos Efeitos da Modulação do Colesterol na modulação do processamento da PPA e na produção de β A.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAT	Enzima acetil-CoA acetiltransferase
AICD	Domínio remanescente intracelular da PPA
AINES	Antiinflamatórios não-esteroidais
ApoE	Apolipoproteína E
ApoEKO	Camundongos ApoE <i>knock-out</i>
AVC	Acidente vascular cerebral
AVI	Anos vividos com incapacidade
BACE1	Beta-secretase
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE	Barreira hemato-encefálica
c-HDL	Lipoproteína de densidade alta
CL	Colesterol
CTF α	Fragmento não-amiloidogênico intracelular carboxi-terminal
CTF β	Fragmento amiloidogênico intracelular carboxi-terminal
DA	Doença de Alzheimer
DAF	Doença de Alzheimer Familiar
DHT	5 α -diidrotestosterona
DMO	Densidade Mineral Óssea
E2	17 β -estradiol
ENF	Emaranhados neurofibrilares
EPM	Erro padrão da média
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
HMG-CoA redutase	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase
HPG	Eixo hipotálamo-pituitária-gônada

HSFs	Hormônios sexuais femininos
IDE	Enzima de degradação da insulina
KPI	Domínio inibidor da protease tipo Kunitz
LDL	Lipoproteína de densidade baixa
LH	Hormônio luteinizante
LNGFR	Receptor de baixa afinidade do fator de crescimento do nervo
LRP	Proteína relacionada ao receptor da LDL
MAPs	Proteínas associadas à microtúbulos
OVX	Ovariectomia
P4	Progesterona
PBS	Tampão fosfato
PPA	Proteína precursora amilóide
PSEN 2/PS2	Presenilina 2
PSEN/PS	Presenilinas
PSEN1/PS1	Presenilina 1
SHAM	Cirurgia fictícia
SNC	Sistema Nervoso Central
sPPA α	fragmento solúvel da APP
Tau[pS199]	Proteína Tau fosforilada em uma serina na posição 199
TER	Terapia de reposição de estrogênio
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
α 2M	Alfa-2-macroglobulina
β A	Proteína beta-amilóide

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. <i>Visão Geral da Doença de Alzheimer</i>	19
2.2. <i>Fatores de risco da Doença de Alzheimer</i>	20
2.2.1. Doença de Alzheimer de Estágio Precoce	21
2.2.2. Doença de Alzheimer de Estágio Tardio e Esporádica.....	22
2.3. <i>Processamento da PPA e geração de βA</i>	23
2.3.1. Mutações observadas na Doença de Alzheimer Familiar e o processamento da PPA.....	27
2.4. <i>Presenilina</i>	27
2.5. <i>Proteína TAU</i>	29
2.6. <i>Fator neurotrófico derivado do cérebro</i>	32
2.7. <i>O Colesterol no Sistema Nervoso Central</i>	33
2.7.1. O processamento do colesterol.....	33
2.7.2. Colesterol e processamento da PPA.....	35
2.8. <i>Estrógenos</i>	36
2.8.1. Estrutura e biossíntese do Estrogênio, da Progesterona e da Testosterona	36
2.8.2. Esteróides, Neuroproteção e Plasticidade Neuronal	40
2.8.3. Estrógenos, Envelhecimento e Doença de Alzheimer	40
2.8.4. Doença de Alzheimer e Efeitos Hormonais	41
2.9. <i>Modelos animais para a Doença de Alzheimer</i>	43
2.10. <i>O estudo da ApoE no metabolismo lipídico em animais</i>	44
2.11. <i>O papel da ApoE no Sistema Nervoso Central</i>	48
2.12. <i>A ApoE e a proteína βA</i>	49
3. OBJETIVOS	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1. <i>Animais, Procedimentos e Tratamentos</i>	51
4.2. <i>Procedimentos cirúrgicos</i>	54
4.3. <i>Grupos experimentais</i>	55
4.4. <i>Histomorfometria dos úteros e dos cornos uterinos</i>	56
4.5. <i>Análises Histoquímicas</i>	59

4.5.1.	Técnica de Cajal	59
4.5.2.	Técnica de Bielschowsky	60
4.5.3.	Coloração pela Tioflavina S	61
4.5.4.	Processamento das amostras	62
4.6.	<i>Análises Bioquímicas</i>	63
4.6.1.	Urina de 24H.....	64
4.7.	<i>ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay)</i>	64
4.7.1.	Dosagem da proteína β A, proteína Tau e proteína Tau[pS199]	64
4.7.2.	Dosagem de E2, P4, Testosterona e BDNF	64
4.8.	<i>Equipamentos</i>	64
4.8.1.	Microtomia	64
4.8.2.	Microscopia.....	64
4.8.3.	Análise Histológica e Densitométrica	65
4.8.4.	Dosagens Bioquímicas	65
4.8.5.	Leitor de Microplaca	65
4.9.	<i>Análise Estatística</i>	65
5.	RESULTADOS	66
5.1.	<i>Validação do modelo experimental ovariectomizado</i>	66
5.1.1.	Mensuração dos níveis plasmáticos de 17β -estradiol (E2), de 17-hidroxiprogesterona (P4) e de Testosterona	67
5.1.2.	Efeitos Sistêmicos da Baixa Hormonal na OVX: Involução Uterina e Queda na Densidade Mineral Óssea (DMO)	70
5.2.	<i>Dosagens Bioquímicas</i>	75
5.2.1.	Mensuração da concentração plasmática de Glicose.....	75
5.2.2.	Mensuração da concentração plasmática de Colesterol Total.....	76
5.2.3.	Mensuração da concentração plasmática de Triglicerídeos	77
5.2.4.	Mensuração da concentração plasmática de c-HDL	78
5.2.5.	Mensuração da concentração plasmática de LDL	79
5.2.6.	Mensuração da concentração plasmática de VLDL.....	80
5.3.	<i>Quantificação de Proteínas por meio de ELISA</i>	81
5.3.1.	Mensuração das concentrações plasmáticas da proteína β A, proteína Tau Total e proteína Tau [pS199].....	81
5.3.2.	Mensuração das concentrações no extrato cerebral da proteína β A, proteína Tau Total e proteína Tau [pS199]	84

5.3.3.	Mensuração das concentrações da proteína β A, proteína Tau Total e proteína Tau [pS199] em urina de 24H	87
5.3.4.	Mensuração das concentrações da proteína BDNF no plasma e no extrato cerebral.....	90
5.4.	<i>Análise qualitativa de depósitos amilóides no tecido cerebral.....</i>	92
6.	DISCUSSÃO	98
6.1.	<i>Níveis Glicêmicos e Estradiol (E2).....</i>	98
6.2.	<i>Perfil lipídico e Estradiol (E2).....</i>	99
6.3.	<i>Estrógenos e Proteína βA</i>	99
6.4.	<i>Proteína Tau e Tau[pS199]</i>	102
6.5.	<i>Perfil lipídico e Proteína βA</i>	103
7.	CONCLUSÃO	108
8.	ANEXOS	109
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional é uma realidade mundial nos dias de hoje. Este fenômeno se deve, majoritariamente, aos avanços científicos e tecnológicos na Área Biomédica e também às várias medidas de Saúde Pública adotadas desde o século passado que resultaram num significativo aumento da expectativa dos seres humanos (WHO, 2003). Desde a década de 80, o constante aumento da proporção de idosos na população mundial, apontou para um maior interesse no estudo das chamadas Doenças Associadas ao Envelhecimento (WHO S. G., 1996) (Berquó & Leite, 1988).

No Brasil, em particular, nota-se que a expectativa de vida ao nascimento aumentou em mais de 50% entre os anos de 1950 e 2000 - de 43,2 anos na década de 1950 para 68,4 anos em 2000 (Chaimowicz, 1998). Este fenômeno aliado à uma redução significativa observada à partir da década de 1960 fez que o Brasil passasse da 16ª para a 6ª posição mundial em termos de número absoluto de indivíduos com 60 anos ou mais. Estimativas apontam também que a proporção de idosos (com 65 anos ou mais) deverá aumentar de 5,1% em 2000 para 14,2% em 2050 (Ramos, Veras, & Kalache, 1987) (Chaimowicz, 1998). Essas mudanças são extremamente preocupantes, devido às precárias condições econômicas e sociais dos idosos no Brasil e devido ao fato de que os problemas relacionados à saúde da infância ainda não foram adequadamente resolvidos. Nos países desenvolvidos já ocorreu a transição epidemiológica, caracterizada pela substituição das doenças infecciosas pelas crônico-degenerativas, pelo deslocamento da maior carga de morbimortalidade dos grupos mais jovens para os mais idosos e pelo predomínio da morbidade sobre a mortalidade. No Brasil, onde persistem problemas já resolvidos em outros países, há a "superposição epidemiológica" em que ambos os problemas convivem (Chaimowicz, 1998). Dentre as condições crônico-degenerativas que afligem esta "nova" população, destaca-se a hipertensão arterial, o diabetes mellitus, a osteoporose, a aterosclerose e as demências, em particular a doença de Alzheimer.

Em termos mundiais, sabe-se que as demências estão entre as enfermidades que mais afetam os idosos. Dados recentes (2003) mostram que a demência senil contribuiu com 11,2% dos anos vividos com incapacidade (AVI) em

pessoas acima de 60 anos de idade. Este valor é superior ao encontrado em outras doenças comuns nesta faixa etária, tais como o acidente vascular cerebral (AVC, que correspondeu a 9,5% dos AVI), as doenças músculo-esqueléticas (8,9% dos AVI), as doenças cardiovasculares (5,0% dos AVI) e todas as formas de câncer (2,4% dos AVIs) (estimativas da OMS Organização Mundial da Saúde) (WHO, 2003). Cumpre ressaltar que, dentre os tipos de demência, a Doença de Alzheimer é uma das mais importantes e prevalentes.

Devido a sua importância, esta mazela tem sido estudada largamente na tentativa de elucidar os seus mecanismos. Até recentemente pouco se conhecia a respeito da sua fisiopatologia e dos mecanismos gênicos e, atualmente, grandes avanços já foram impetrados desde os primeiros estudos conduzidos por Alois Alzheimer em 1907. Este fenômeno é, ao menos em parte, devido à carência de estudos moleculares em pacientes visto os aspectos éticos associados à própria doença. O advento de modelos animais para o estudo da Doença de Alzheimer propiciou, todavia, um novo impulso nos estudos mecanísticos deste mal. Deste modo, o estudo dos mecanismos genéticos e orgânicos, sejam eles *in vitro* e *in vivo*, é uma ferramenta de fundamental importância para entendimento das doenças degenerativas.

Devido ao impacto exercido em todos os indivíduos envolvidos por esta devastadora aflição – o próprio doente e seus familiares - há um apelo significativo para o estabelecimento de novas formas de diagnóstico e de condutas terapêuticas para com a Doença de Alzheimer. Entretanto, outra grande complicação encontrada no diagnóstico diferencial da Doença de Alzheimer é a semelhança dos sintomas encontrados em sua fase inicial com aqueles exibidos na aterosclerose cerebral. Esta confluência de sinais patognomônicos pode levar a um tratamento errôneo do paciente, o que certamente piora o prognóstico do doente.

Esta Dissertação de Mestrado visa a tentar elucidar os mecanismos da formação de placas senis em camundongos ApoE *knock-out* (APOEKO), os quais são úteis para o estudo de eventos dislipidêmicos e ateroscleróticos relacionados ao papel do colesterol, por exemplo, nas amiloidopatias (Miller, 1982). Sabe-se que a perda da ApoE em camundongos KO promove nestes animais um desenvolvimento deficiente (Gozes *et al.*, 1997; Bassan *et al.*,

1999), a visualização de disfunções cognitivas (Gordon *et al.*, 1995; Gozes *et al.*, 1999), de danos colinérgicos (Gozes *et al.*, 1997) e hiperfosforilação da Tau (Genis *et al.*, 1999).

Ademais recentemente tem sido mostrado que um dos alelos humanos da APOE, a APOE4, está envolvida, de alguma forma, com a patogênese da doença de Alzheimer (Farrer *et al.*, 1997). Para tanto, utilizamos modelos ovariectomizados (OVX - recentemente mostrado como fator de risco para a Doença de Alzheimer), inicialmente, visando estudar a formação de placas e a modulação de algumas moléculas envolvidas na doença. Os resultados encontrados serão mostrados e discutidos no decorrer desta Dissertação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Visão Geral da Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva representando a forma mais comum de demência em idosos. Estima-se que cerca de quatro milhões de americanos são afligidos pela doença e que sua prevalência, após os 65 anos, dobra a cada cinco vividos (Assoc., 2004). A Doença de Alzheimer é clinicamente diagnosticada através de observações que incluem a perda de memória, o declínio cognitivo e os déficits nas habilidades motoras dos indivíduos afetados (Welsh et al., 1992). Estágios tardios da doença são caracterizados por demência e paranóia. Entretanto, o diagnóstico definitivo da Doença de Alzheimer somente é obtido quando são identificadas estruturas histopatológicas, tais como placas senis e emaranhados neurofibrilares, a termo da autópsia no cérebro do paciente já falecido (Jellinger & Bancher, 1998).

As placas senis são depósitos extracelulares compostos de um pequeno peptídeo conhecido como beta-amilóide (β A) o qual é formado pela clivagem da proteína precursora amilóide (PPA) e se acumula no tecido cerebral do afligido. Já os emaranhados neurofibrilares (ENF) são acúmulos intracelulares de proteína *tau* que está ligada aos microtúbulos das células nervosas. A proteína *tau* encontra-se hiperfosforilada na Doença de Alzheimer, o que leva à formação de filamentos helicoidais pareados e conseqüentemente aos emaranhados (Grundke-Iqbal et al., 1986a).

A Doença de Alzheimer é observada no córtex frontal e parietal bem como no hipocampo de indivíduos afetados por esta patologia (Braak & Braak, 1997). Outras características patológicas incluem a presença de neuritos distróficos – primariamente encontrados na periferia das placas amilóides, perda neuronal acompanhada por atrofia cerebral severa em estágios tardios e inflamação (Akiyama et al., 2000). Contudo, ainda são poucos entendidos os mecanismos que levam ao fenótipo desta doença.

2.2. Fatores de risco da Doença de Alzheimer

Diversos estudos epidemiológicos têm sugerido um variado número de fatores que contribuem para o aparecimento da Doença de Alzheimer (Artiga et al., 1998a). Estes fatores possuem ambos componentes ambientais e genéticos que freqüentemente interagem para manifestar esta complexa doença. Vários fatores ambientais têm sido postulados como contribuintes diretos para o desenvolvimento da Doença de Alzheimer. A idade, contudo, ainda é o fator de risco de maior significância. Estima-se que aproximadamente 3% dos homens e mulheres entre 65 e 74 anos possuem a doença e que metade de todos os indivíduos com mais de 85 anos estejam em alguma fase da Doença de Alzheimer (Katzman, 1993). As mulheres são mais afetadas pela Doença de Alzheimer do que os homens e adicionalmente possuem um risco acumulativo aumentado para o aparecimento da doença ao longo da idade (Andersen et al., 1999) (von Strauss et al., 1999). O grau de escolaridade e a atividade cerebral contínua são fatores protetores contra a Doença de Alzheimer por razões ainda não tão bem elucidadas (Qiu et al., 2001) (Snowdon, Ostwald, & Kane, 1989). Tem sido também sugerido que traumas encefálicos, particularmente em boxeadores, aumentam o risco para Doença de Alzheimer, especialmente em indivíduos com parentes de primeiro grau acometidos por esta patologia (Guo et al., 2000) (Mortiner et al., 1991).

Estudos recentes sugerem que o metabolismo do colesterol e a inflamação possuem um papel chave na Doença de Alzheimer. Em estudos epidemiológicos retrospectivos, indivíduos em tratamento com estatinas para diminuir a síntese de colesterol para condições não relacionadas com Doença de Alzheimer apresentaram uma diminuição da incidência da doença. Estes estudos complementaram a associação de níveis elevados de colesterol com a Doença de Alzheimer em algumas populações (Kivipelto et al., 2001) (Pappolla et al., 2003). Da mesma forma, populações sob utilização de antiinflamatórios não-esteroidais (AINES), para tratamento de condições diversas, também exibiram baixa incidência de casos de Doença de Alzheimer (Andersen et al., 1995) (Beard et al., 1998) (McGeer & McGeer, 1996). Estes achados, combinados com uma resposta inflamatória pronunciada no cérebro de pacientes com Doença de Alzheimer, sugerem que a modulação da inflamação

e os níveis de colesterol podem ser importantes na patogênese da Doença de Alzheimer.

Enquanto a elucidação dos fatores ambientais têm sido útil na identificação de populações de risco para a Doença de Alzheimer, a compreensão de algumas das bases moleculares da doença tornou-se possível através da identificação de fatores genéticos que contribuem para a patogênese da doença. Estudos de incidência para a Doença de Alzheimer realizados em gêmeos têm estimado que a taxa de concordância de pares de gêmeos monozigóticos em que um indivíduo desenvolve a doença é de 40-50%, indicando um forte componente genético para a Doença de Alzheimer (Gatz et al., 2005) (Raiha et al., 1996). A Doença de Alzheimer pode ser estratificada em três subclasses baseada na associação entre mutações genéticas e a idade do aparecimento dos sintomas: Doença de Alzheimer de estágio precoce, Doença de Alzheimer de estágio tardio e Doença de Alzheimer esporádica.

2.2.1. Doença de Alzheimer de Estágio Precoce

No começo da década de 90, análises identificaram diversas mutações em várias famílias que exibiam uma alta incidência de Doença de Alzheimer relativamente precoce (Karlinsky et al., 1992). Estas famílias representavam uma forma particular da Doença de Alzheimer, denominada assim de Doença de Alzheimer de estágio precoce, na qual os sintomas ocorrem entre 30 e 50 anos de idade. Inicialmente um *locus* no braço longo do cromossomo 21 foi relacionado à Doença de Alzheimer, no final de 1980 (Pericak-Vance et al., 1988). Entretanto, a identificação do gene responsável pela Doença de Alzheimer não ocorreu até que esta região fosse analisada em uma única árvore genealógica, devido à heterogeneidade genética da doença. Análises de duas grandes árvores genealógicas suecas com múltiplos indivíduos afetados identificaram um duplo ponto de mutação no gene da PPA, residindo entre o *locus* do cromossomo 21. Esta mutação, posteriormente denominada de mutação sueca, altera dois aminoácidos na PPA nas posições 670 e 671 na porção N-terminal da seqüência do peptídeo β A (Mullan et al., 1992). O mapeamento rebuscado em conjunção com o seqüenciamento direto foi utilizado para identificar outro ponto de mutação na PPA em várias famílias

londrinas. Esta mutação altera o aminoácido na posição 717 (PPA^{L^{on}}), região esta próxima à porção C-terminal da seqüência da β A (Chartier-Harlin et al., 1991) (Goate et al., 1991) (Karlinsky et al., 1992). Um alelo adicional que codifica uma substituição de um aminoácido diferente na mesma posição foi identificado em uma família de Iowa (Estados Unidos) de descendência alemã (PPA^{Ind}) (Murrell et al., 1991). Diversas mutações na Presenilina 1 (PSEN1) no cromossomo 14 (Hutton et al., 1996) e na Presenilina 2 (PSEN2) no cromossomo 1, têm sido identificadas (Levy-Lahad et al., 1995) (Rogaev et al., 1995) (Van Broeckhoven, 1995). Análise genealógica de famílias com Doença de Alzheimer de estágio precoce demonstraram que todas as mutações em ambos PPA e PSEN 1 e 2 possuem um modo dominante de herança e são causadoras da Doença de Alzheimer. Mutações em qualquer destes genes têm aumentado a produção de proteína β A – constituinte primário das placas senis. Interessantemente, indivíduos com Síndrome de Down que carregam uma terceira cópia do cromossomo 21 possuem uma cópia extra da PPA e desenvolvem amiloidopatia por volta dos 30 a 40 anos de idade (Wisniewski et al., 1985), desta maneira promovendo evidência adicional do papel da PPA na patologia da Doença de Alzheimer.

2.2.2. Doença de Alzheimer de Estágio Tardio e Esporádica

Embora as mutações na PPA e na PSEN tenham sido fundamentais para aumentar a compreensão da produção de β A, elas representam apenas 5% de todos os casos de Doença de Alzheimer (Rocchi et al., 2003). Desta forma há claramente outros fatores genéticos que contribuem para a doença. Muitos casos de Doença de Alzheimer são observados em uma idade mais avançada. Estudos familiares com uma alta incidência de Doença de Alzheimer de estágio tardio, com uma média de idade entre 60 e 70 anos, têm elucidado o complexo modo de herança para esta forma da doença. Nos últimos 10 anos, análises especificamente nestas famílias identificaram diversas regiões em todo o genoma destes indivíduos as quais possuem sugestiva significância de ligação à Doença de Alzheimer.

Polimorfismos em vários genes entre estas regiões genômicas estão associados com Doença de Alzheimer em certas populações, incluindo a

Apolipoproteína E (APOE) no cromossomo 19 (Corder et al., 1993) (Strittmatter et al., 1993a), a alfa-2-macroglobulina (α 2M) no cromossomo 12 (Blacker et al., 1998) (Jhoo et al., 2001) (Nacmias et al., 2001), o receptor da lipoproteína de baixa densidade (LRP) no cromossomo 12 (Beffert, Arguin, & Poirier, 1999a) (Kang et al., 1997) e a enzima de degradação da insulina (IDE) no cromossomo 10 (Bian et al., 2004) (Blomqvist et al., 2005). Vale ressaltar que a herança de um dos alelos acima é suficiente para aumentar o risco de desenvolvimento de Doença de Alzheimer, uma importante diferença dos genes identificados na Doença de Alzheimer de estágio precoce, na qual as mutações são as causadoras da doença. O alelo ϵ 4 da APOE é um dos fatores de risco mais significante identificados até o momento, representando por cerca de 50% de todos os casos de Doença de Alzheimer (Raber, Huang, & Ashford, 2004). Primeiramente identificado por Corder *et al.* e Strittmatter *et al.* no começo da década de 90 (Corder et al., 1993) (Strittmatter et al., 1993a), estudos associativos subseqüentes têm ampliado a análise do impacto do alelo ϵ 4 da APOE no aumento do risco de Doença de Alzheimer na população caucasiana e japonesa (Farrer et al., 1997) (Ueki et al., 1993). Além disso, estudos em indivíduos com Doença de Alzheimer esporádica, para os quais não há histórico familiar da doença, demonstraram que a freqüência do alelo ϵ 4 da APOE é maior nesta população – quando comparada à outras com a presença de Doença de Alzheimer e também com relação à indivíduos normais (Rebeck et al., 1993) (Saunders et al., 1993). No que se refere à modulação da PPA, o impacto tanto da idade de aparecimento dos sintomas quanto da severidade da patologia em indivíduos com Doença de Alzheimer é diretamente afetado. Contudo estes fatores parecem não exercer nenhum efeito sobre as mutações da PSEN (Houlden et al., 1998) (Van Broeckhoven et al., 1994). Estas observações sugerem que as mutações na PSEN são dominantes sobre os efeitos das mutações na PPA ou APOE ϵ 4.

2.3. Processamento da PPA e Geração de β A.

A proteína β A foi identificada como a constituinte primária das placas senis em cérebros de pacientes com Doença de Alzheimer no começo da década de 80 por Glenner e Wong (Glenner & Wong, 1984). Posteriormente identificou-se

que esta proteína representava uma porção de proteína precursora de cadeia longa, denominada Proteína Precursora Amilóide, ou PPA, uma proteína transmembranar expressada ubiquamente em humanos e camundongos (Goldgaber et al., 1987) (Tanzi et al., 1987). Há três isoformas da PPA, sendo que somente a isoforma PPA₆₉₅ é processada para gerar β A (Selkoe, 1998). O peptídeo β A não é gerado fora do cérebro, apesar disso ele é encontrado no plasma, presumivelmente devido ao clearance através da barreira hematoencefálica (Shibata et al., 2000).

Análise molecular da PPA demonstrou que esta proteína pode ser clivada em duas vias distintas por um processo dividido em duas etapas. A clivagem da PPA pela alfa-secretase (α -secretase), uma enzima transmembrana postulada como sendo um dos três membros de uma família de desintegrinas e metaloproteínases – ADAM (Asai et al., 2003) (Buxbaum et al., 1998) (Hotoda et al., 2002) (Lammich et al., 1999) (Skovronsky et al., 2000), gera um fragmento amino-terminal conhecido como sPPA α , e um fragmento intracelular carboxi-terminal denominado CTF α o qual permanece atracado à membrana. O CTF α é clivado por outro complexo protéico, gama-secretase (γ -secretase), gerando um pequeno peptídeo, o p3. A γ -secretase é um complexo composto por pelo menos quatro proteínas associadas à membrana: presenilina, nicastrina, Aph-1 e Pen-2 (Fraering et al., 2004) (Francis et al., 2002) (Hu, Ye, & Fortini, 2002) (Kimberly & Wolfe, 2003) (Li et al., 2000). A via de clivagem pela α -secretase é considerada como protetora contra a Doença de Alzheimer, pois o peptídeo p3 não é patogênico e não contribui para a formação das placas senis (Glennner & Wong, 1984).

O processamento alternativo da PPA envolve a clivagem pela beta-secretase (β -secretase) ou BACE, uma aspartil protease ligada à membrana (Hussain et al., 2000) (Vassar et al., 1999). A clivagem pela BACE produz um fragmento amino-terminal pequeno, sPPA β , e um fragmento carboxi-terminal grande, CTF β . Subseqüentemente a clivagem do CTF β pela γ -secretase produz um peptídeo β A de 40 a 42 aminoácidos (β A₁₋₄₀ e β A₁₋₄₂, respectivamente) e um fragmento membranar pequeno, C- γ ou AICD. O peptídeo β A gerado possui alto poder de formar agregados e eventualmente formar depósitos e placas senis (Figuras 1 e 2).

PLACAS E EMARANHADOS NEUROFIBRILARES

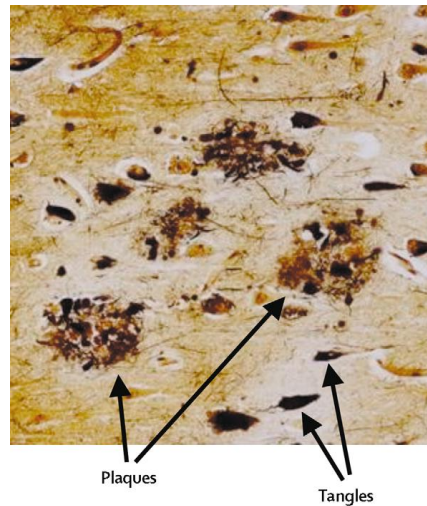


Figura 1: Placas (plaques) e emaranhados neurofibrilares (tangles) no córtex cerebral em pacientes com Doença de Alzheimer. As placas são constituídas de depósitos de Beta Amilóide rodeadas por neuritos distróficos, astrócitos reativos e micróglia, enquanto o emaranhado é um agregado intracelular composto de uma forma hiperfosforilada da proteína tau associada à microtúbulos. Os astrócitos reativos participam de vários mecanismos após lesões do SNC e Periférico os quais incluem neuroproteção, brotamento neuronal, neurotransmissão e dor neuropática (Blennow, De Leon, & Zetterberg, 2006).

METABOLISMO DA PPA COM GERAÇÃO DE PROTEÍNA β A

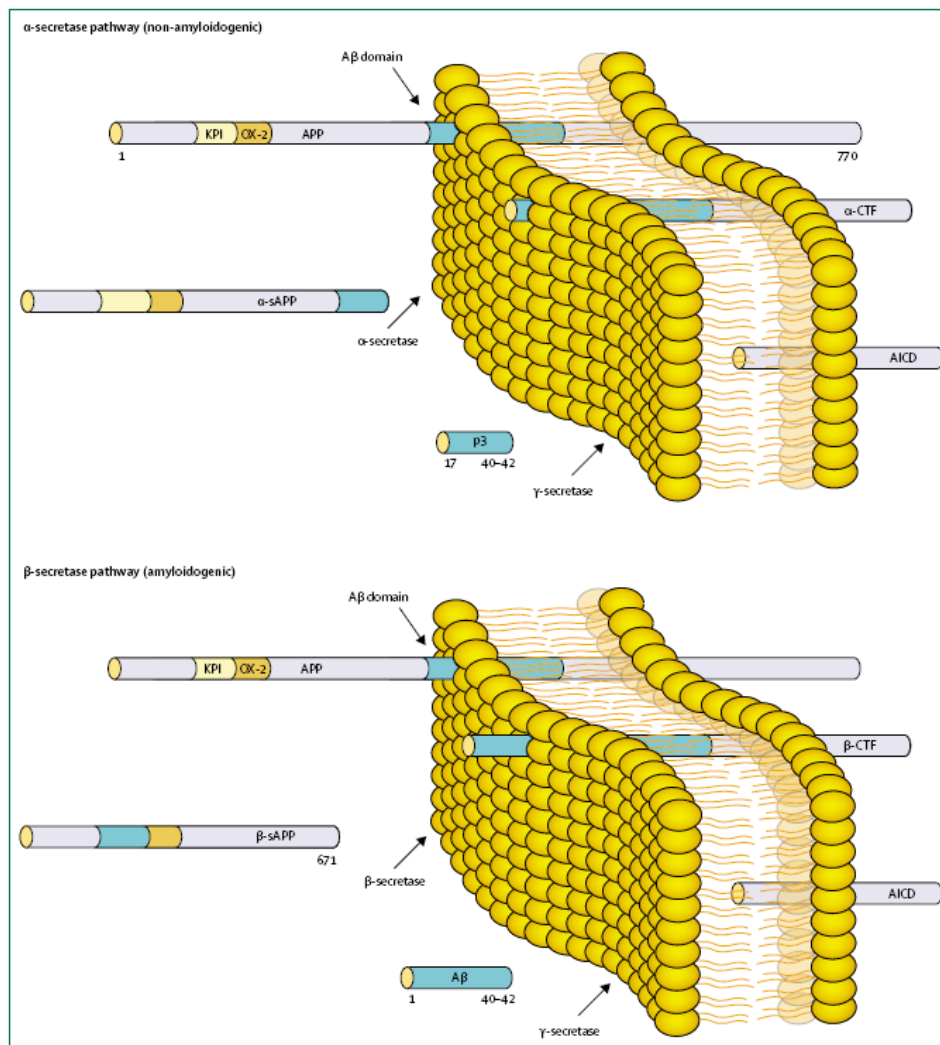


Figura 2: Diagrama esquemático das vias proteolíticas amiloidogênica e não-amiloidogênica do processamento da PPA e produção de β A. A APP é uma proteína transmembrana tendo uma abundante cauda N-terminal extracelular. A forma mais comum da APP está representada (APP770), contendo o domínio inibidor da protease tipo Kunitz (KPI)- o qual está ausente na isoforma APP695, e o domínio antigênico OX-2, o qual está ausente tanto na isoforma APP695 e APP751. O domínio beta-amilóide está parcialmente encaixado na membrana plasmática incluindo o resíduo 28 externamente à membrana e o primeiro resíduo 12-14 no domínio transmembrana. A PPA pode ser processada em duas vias principais. Na via α -secretase, a enzima α -secretase cliva o APP no domínio AB, gerando um fragmento solúvel da PPA (α -sAPP). O fragmento C-terminal remanescente (CTF), α -CTF ou C83 é clivado pela enzima γ -secretase gerando um pequeno peptídeo p3. O domínio remanescente intracelular da PPA (AICD) é metabolizado no citoplasma. Visto que o PPA clivado pela α -secretase está no domínio AB isto impede a geração de AB. Na via β -secretase, a enzima β -secretase cliva o APP justamente antes do domínio AB, gerando a forma solúvel β sAPP. O CTF, β -CTF, ou C99 remanescente é clivado pelo complexo enzimática γ -secretase gerando um peptídeo amilóide livre de 40 ou 42 aminoácidos. O AICD remanescente é metabolizado no citoplasma (Blennow, De Leon, & Zetterberg, 2006).

2.3.1. Mutações observadas na Doença de Alzheimer Familiar e o Processamento da PPA

Análises das células derivadas de pacientes com Doença de Alzheimer Familiar (DAF), bem como estudos de transfecção *in vitro*, têm demonstrado que há uma conexão entre PPA ou PSEN e o aumento da produção de β A. A mutação da PPA dita sueca (PPA^{Swe}) aumenta a preferência de clivagem da PPA pela BACE e desta forma leva à produção de β A₁₋₄₀ e β A₁₋₄₂ (Citron et al., 1994) (Felsenstein, Hunihan, & Roberts, 1994) (Kalaria et al., 1996a), enquanto as mutações PPA^{Lon} e PPA^{Ind}, bem como as mutações na PSEN (Ancolio et al., 1997) (Mann et al., 1997a) (Tomita et al., 1997) (Walker et al., 2005), aumentam os níveis de β A₁₋₄₂ através da modulação da atividade da γ -secretase (Maruyama et al., 1996) (Scheuner et al., 1996). A natureza causal destas mutações e a conseqüente identificação da sua influência na produção de β A tem levado à hipótese de que a proteína amilóide possui um papel chave no desenvolvimento da Doença de Alzheimer.

2.4. Presenilina

O grupo das presenilinas é constituído por duas proteínas, presenilina 1 (PS1) e presenilina 2 (PS2), codificadas por 2 genes estreitamente relacionados, PS1 e PS2, respectivamente. Estão localizadas em membranas intracelulares e são expressas de forma ubíqua no cérebro, primariamente nos neurônios (Kovacs, Fausett, & Page, 1996). PS1 e PS2 possuem múltiplos domínios transmembranares contendo ambas as extremidades amino e carboxi terminal, bem como uma grande alça hidrofílica. As duas proteínas, PS1 com 46 kDa e PS2 com 55kDa, compartilham 67% dos aminoácidos presentes em cada estrutura protéica (Borchet, Thinakaran, & Eckman, 1996).

As funções exatas associadas às PS1/2 ainda não estão totalmente elucidadas. Sabe-se que a PS1 está envolvida na neurogênese normal, na formação do esqueleto axial, na modulação da atividade da γ -secretase, bem como na ligação das presenilinas à PPA. A deleção gênica da PS1 demonstra que esta é indispensável para a geração de proteína β A (Wolfe, Xia, & Ostaszewski, 1999). Dois resíduos transmembranares de aspartato na PS1 são

essenciais para a produção de proteína β A, sugerindo que a PS1 ou é um cofator essencial para a γ -secretase ou talvez a própria γ -secretase (Kimberly, Xia, & Rahmati, 2000). A PS2 também contém dois resíduos transmembranares cruciais que modula a atividade da γ -secretase. Uma crescente lista de proteínas, incluindo a Tau, tem sido relacionada à interação direta ou indireta com as presenilinas (Shinozaki, Maruyama, & Kume, 1998).

As presenilinas também podem estar envolvidas no controle da apoptose. Embora a PS2 aparenta possuir um papel direto na apoptose as mutações na PS1, através da atividade de quinases e fosfatase relacionadas (Wolozin, Alexander, & Palacino, 1998) e desestabilização da homeostase do cálcio (Buxbaum, Choi, & Luo, 1998), podem sugerir uma alta predisposição à apoptose neuronal (Drouet et al., 2000). A proteína Par-4, que está envolvida na apoptose, está superexpressa no cérebro de indivíduos com Doença de Alzheimer e também em células transfectadas mutantes para a PS1 (Guo, Fu, & Xie, 1998).

Há diversas evidências genéticas sugerindo que mutações oriundas da PS1 e PS2 (Scheuner et al., 1996) e de clones destas proteínas (Citron et al., 1997) afetam as enzimas envolvidas na degradação da PPA, sobretudo as secretases (Wolfe, Xia, & Ostaszewski, 1999). A maioria dos casos de DAF está ligada com a mutação dos genes da PS. Mais de 40 mutações já foram descritas para o gene da PS1 que podem posteriormente resultar em Doença de Alzheimer. Mutações em ambos os genes seletivamente aumentam a produção de proteína β A42 em culturas celulares e no cérebro de camundongos transgênicos e estão associadas com o aparecimento de Doença de Alzheimer de estágio precoce, vide figura 3 (Sherrington, Rogaev, & Liang, 1995). Algumas mutações associadas com o aumento no metabolismo da proteína β A ao invés de apresentarem os sintomas da Doença de Alzheimer demonstram uma larga distribuição de placas e sintomas peculiares tais como paraparesia espástica (deficiência relacionada à perda parcial das funções motoras dos membros inferiores com lesão do córtex cerebral o que acarreta em diminuição da força muscular e aumento do tônus muscular) (Smith, Kwok, & McLean, 2001).

FATORES DESENCADEANTES DA FORMAÇÃO DE PLACAS SENIS

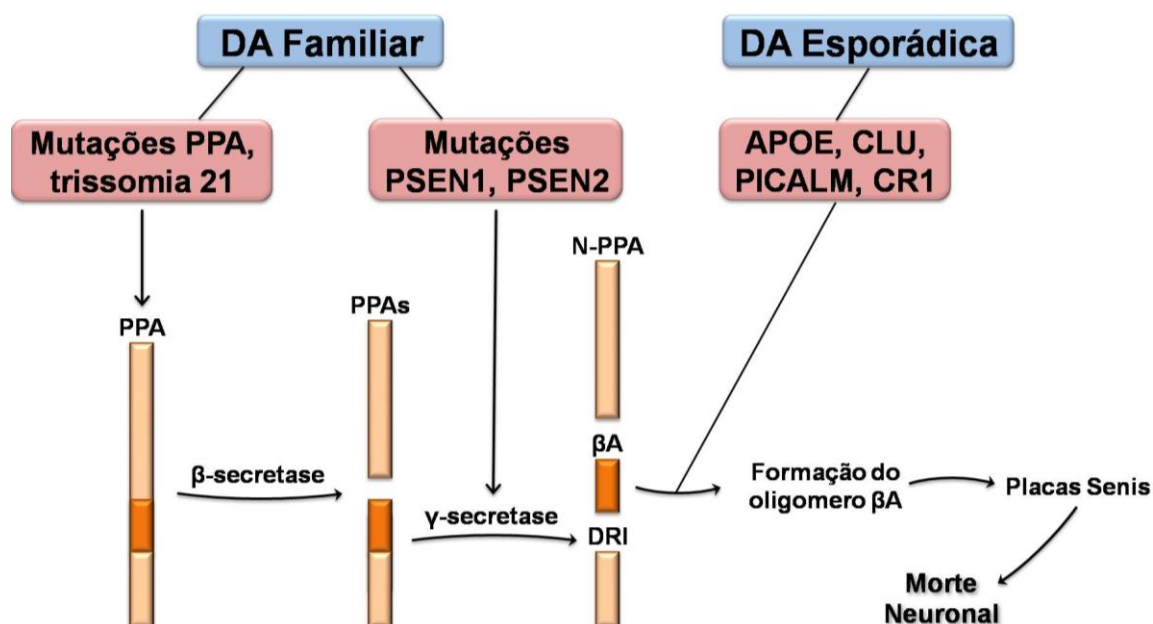


Figura 3: Processamento da APP e fatores de regulação. Doença de Alzheimer: Doença de Alzheimer; β A: proteína β -Amilóide; PPA: Proteína Precursora β -Amilóide; PPA_s: Proteína Precursora β -Amilóide solúvel; N-PPA: porção N-terminal da PPA; DRI: domínio remanescente intracelular da PPA; APOE: gene da apolipoproteína E; CLU: gene da clusterina; PICALM: gene codificante da proteína clatrina - phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein; CR1: gene codificante do receptor 1 do componente 3b/4b do complemento; PSEN1/PSEN2: gene da proteína presenilina 1 e 2 respectivamente. Modificado de (A van Es & H van den Berg, 2009).

2.5. Proteína TAU

Além do depósito de proteína A β , as lesões neurofibrilares constituem uma característica histopatológica marcante da Doença de Alzheimer. Estes achados são encontrados nos corpos celulares e dendritos apicais, em dendritos distais (linhas neuropiais) e em neuritos anormais que estão associados com algumas placas de proteína β A (placas neuríticas). Os emaranhados neurofibrilares (ENF's) desenvolvem-se em sítios específicos e distribuem-se de forma previsível e não-randômica em todo o cérebro (Braak & Braak, 1991). O principal componente dos ENF's são filamentos anormais cujo núcleo protéico é composto pela proteína tau, uma proteína que está associada à microtúbulos (Goedert et al., 1988). No curso normal da Doença de Alzheimer, a proteína tau torna-se, anormalmente, fosforilada o que leva a uma

conformação diferente da inicialmente visualizada. Esta fosforilação provoca uma dissociação da proteína tau dos microtúbulos levando a um aumento da sua solubilidade. Isto se configura como um importante estágio na formação de filamentos de proteína tau no tecido cerebral conforme figura 4 (Chen et al., 2004).

As funções fisiológicas da tau incluem a organização e estabilização dos microtúbulos em células cerebrais. Os microtúbulos são polímeros cilíndricos com aproximadamente 25 nm de comprimento e estão reunidos primariamente em heterodímeros de α - e β - tubulina (80%) e também em uma coleção de proteínas associadas à microtúbulos (MAPs) (20%). Os microtúbulos possuem duas funções básicas: é o principal componente estrutural do fuso mitótico e atua também na organização do citoplasma. A proteína tau pode ser encontrada também em astrócitos e oligodendrócitos, em níveis relativamente menores (Tashiro et al., 1997). Funções adicionais têm sido atribuídas a tau na transdução de sinal, na organização do citoesqueleto de actina, no transporte intracelular de vesículas e na ancoragem de fosfatases e quinases (Maas, Eidenmuller, & Brandt, 2000). No cérebro humano adulto, são visualizadas seis isoformas oriundos de splicing alternativo dos éxons 2, 3 e 10. As isoformas diferem pela presença ou ausência de uma ou duas inserções curtas na porção amino-terminal e possuem três ou quatros motivos de repetição de ligações à microtúbulos na porção carboxi-terminal (3R e 4R). Todas as seis isoformas são encontradas nas lesões neurofilamentares em cérebros de indivíduos com Doença de Alzheimer (Goedert et al., 1992).

A INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA TAU NA DOENÇA DE ALZHEIMER

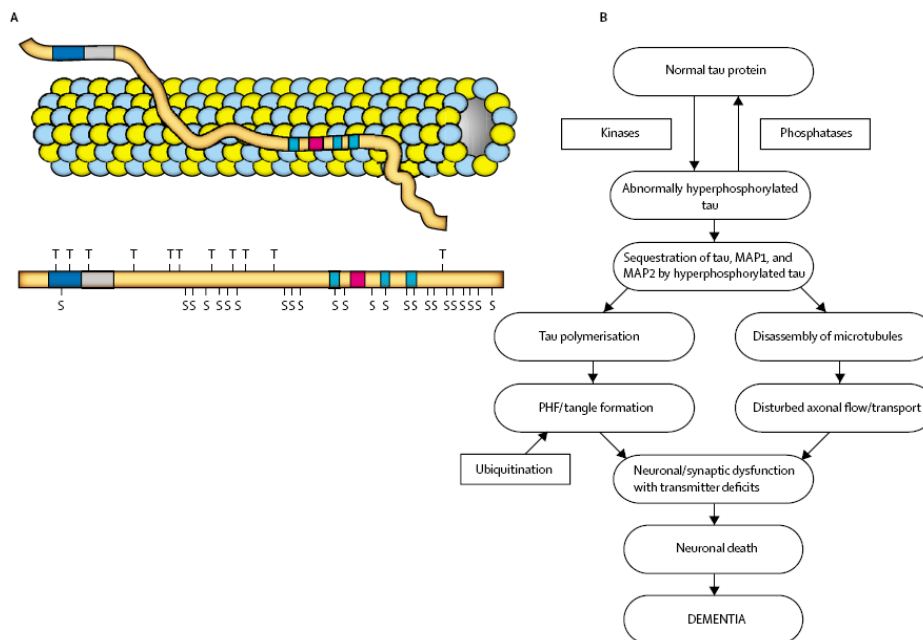


Figura 4: **A:** Esquema da proteína tau ligada a um microtúbulo através de seus domínios ligante a microtúbulo. A maior das seis isoformas da proteína tau está demonstrada, contendo quatro domínios ligantes à microtúbulos e os éxons 2 e 3 em splice. Abaixo encontra-se um esquema da hiperfosforilação da proteína tau com os sítios de fosforilação, treonina (T) ou serina (S). **B:** Fluxograma da hiperfosforilação da proteína tau e formação de emaranhados neurofibrilares. A fosforilação da proteína tau é regulada pelo balanço entre as múltiplas quinases e fosfatases. A proteína tau hiperfosforilada seqüestra a proteína tau normal e outras proteínas associadas à microtúbulos causando desarranjo dos microtúbulos e distúrbios no transporte axonal. A proteína tau hiperfosforilada também se torna propensa à agregação em fibras insolúveis (filamentos helicoidais pareados; PHF) e um grande número de emaranhados. Tanto a perda da estabilização dos microtúbulos e a formação de emaranhados comprometem a função neuronal e sináptica. A proteína tau sob a forma de emaranhados neurofibrilares torna-se disponível para degradação não-lisossomal, mas este processo é ineficiente, e os emaranhados neurofibrilares podem levar os neurônios afetados à morte (Iqbal, Alonso, & Chen, 2005).

2.6. Fator neurotrófico derivado do cérebro

O fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *Brain-derived neurotrophic factor* ou BDNF) tem sido alvo de intenso interesse de diversos estudos no campo da Doença de Alzheimer por longos anos. O BDNF pertence à família das neurotrofinas de fatores de crescimento e modulam a sobrevivência e as funções dos neurônios no SNC, particularmente nas regiões susceptíveis à degeneração na Doença de Alzheimer. Este fator promove a sobrevivência de neurônios colinérgicos do prosencéfalo, bem como de neurônios no hipocampo e no córtex (Hartmann, Heumann, & Lessmann, 2001). O BDNF liga-se à pelo menos dois receptores na superfície das células que possuem a capacidade de responder a este fator de crescimento, TrkB e LNGFR (receptor de baixa afinidade do fator de crescimento do nervo ou p75) (Patapoutian & Reichardt, 2001) e também modula a atividade de diferentes receptores de neurotransmissores, incluindo o receptor de nicotina alfa-7 (Fernandes et al., 2008). Análises *post mortem* demonstraram baixos níveis de BDNF no tecido cerebral de indivíduos com Doença de Alzheimer, embora a natureza da conexão permaneça ainda não elucidada. Estudos sugerem que os fatores neurotróficos desempenham um papel protetor contra a toxicidade do peptídeo β A (Mattson, 2008).

Dois diferentes polimorfismos do BDNF são associados à Doença de Alzheimer. O polimorfismo valina/metionina na posição 196, no códon 66, confere aumento da susceptibilidade para o desenvolvimento da Doença de Alzheimer o qual aparenta ser independente do genótipo para ApoE (Ventriglia et al., 2002). O polimorfismo C270T tem sido associado com Doença de Alzheimer de estágio tardio, mas não com Doença de Alzheimer de estágio precoce, principalmente na população japonesa (Kunugi et al., 2001). Estudos realizados na população alemã sugerem que o polimorfismo C270T aumenta o risco de desenvolvimento de Doença de Alzheimer quando há perda do alelo ApoE4. Exceto para o polimorfismo met-BDNF, pouco é conhecido sobre como os episódios polimórficos afetam as funções do BDNF (Riemenschneider et al., 2002).

Estudos em animais demonstraram que os níveis cerebrais de BDNF são modificados em resposta a certos tipos de estimulação que ocorrem

naturalmente no dia-a-dia. Notavelmente, dois potentes estímulos que rapidamente aumentam os níveis de BDNF no hipocampo são os exercícios e o aprendizado. Em murinos, o estímulo diário à corrida consistentemente aumenta os níveis de mRNA de BDNF e os níveis protéicos no hipocampo e outras regiões cerebrais incluindo partes do córtex (Cotman & Berchtold, 2002). Adicionalmente o auto-aprendizado aumenta os níveis de cerebrais de BDNF, particularmente no hipocampo. Interessantemente, em humanos, o exercício regular está associado com benefícios à saúde mental e funções cognitivas, o qual pode em parte ser devido ao aumento da disponibilidade de BDNF. De fato, a atividade física em adultos não só diminui o risco de déficit cognitivo, como também diminui o risco de depressão e de desenvolvimento de Doença de Alzheimer ou outra demência (Friedland et al., 2001).

2.7. O Colesterol no Sistema Nervoso Central

2.7.1. O processamento do colesterol

A importância dos papéis da proteína relacionada ao receptor da LDL (LRP) e da ApoE no Mal de Alzheimer levou à investigação de possíveis alterações no metabolismo lipídico de indivíduos afetados. No SNC, o metabolismo do colesterol é autônomo ao da periferia e apresenta-se de forma singular em vários aspectos. A lipoproteína HDL é a principal carreadora de colesterol no SNC, em contraste com os sistemas periféricos onde o colesterol é transportado pela LDL. A síntese de colesterol no SNC é rápida durante o desenvolvimento e nas primeiras quatro semanas de vida no camundongo (Quan et al., 2003). O colesterol contido no cérebro humano aumenta constantemente durante os primeiros doze meses de vida (Dietschy & Turley, 2004). Interessantemente, a síntese de colesterol ocorre paralelamente à produção de mielina no cérebro (Dietschy & Turley, 2004), o que faz sentido, visto que a maioria do colesterol no cérebro é encontrada na bainha de mielina dos oligodendrócitos (Muse et al., 2001) (Snipes & Suter, 1997).

A síntese de colesterol ocorre principalmente pelos neurônios, mas também pelos astrócitos e micróglia. Uma das principais funções da APOE é prover colesterol derivado da glia para os neurônios. Apesar de os neurônios possuírem a capacidade de sintetizar o próprio colesterol (Jurevics & Morell,

1994), é clara a importância do colesterol proveniente da glia, particularmente no que diz respeito à formação da sinapse e manutenção neuronal (Mauch et al., 2001). A APOE disponibiliza o colesterol aos neurônios por LRP. Diversas observações sugerem que as isoformas da APOE afetam a manutenção neuronal. A isoforma E3 promove, enquanto a E4 dificulta o crescimento do neurito *in vitro* (Fagan et al., 1996), o que pode estar relacionado à capacidade de carreamento do colesterol destas duas isoformas (Mauch et al., 2001). Os níveis de APOE também estão elevados em resposta às injúrias neuronais (Poirier et al., 1991).

O *turnover* do colesterol no cérebro ocorre a uma fração da taxa na periferia, indicando que há diferenças adicionais na regulação do colesterol nos dois sistemas (Dietschy & Turley, 2004). O transporte do colesterol do cérebro para a periferia é o principal meio através do qual este esterol é eliminado do SNC (Spady et al., 1987). O processo de eliminação envolve a conversão do colesterol em um oxisterol pela CYP46A1 – uma enzima produzida no cérebro capaz de converter colesterol em 24-S-hidroxicolesterol (Lund et al., 2003). Este produto é o principal oxisterol eliminado pelo SNC uma vez que o colesterol não é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica (Osono et al., 1995). De fato, a maioria do 24-S-hidroxicolesterol encontrado na periferia origina-se do SNC (Bjorkhem et al., 1998). Outros oxisteróis também são produzidos no cérebro para o *clearance* do colesterol, incluindo 27-hidroxilase, produzido pela CYP27A1 – uma enzima que se origina no plasma e atravessa a barreira hemato-encefálica (Leoni et al., 2003).

Lutjohann *et al.* reportaram uma diminuição associada à idade nos níveis de 24-S-hidroxicolesterol quando comparado aos níveis de colesterol total em camundongos (Lutjohann et al., 1996). Esta relação é ainda mais diminuída em indivíduos com Doença de Alzheimer (Papassotiropoulos et al., 2000). Entretanto em alguns indivíduos com Doença de Alzheimer, o 24-S-hidroxicolesterol está aumentado, sugerindo que há uma alteração no metabolismo do colesterol no cérebro (Papassotiropoulos et al., 2002). Isto pode estar relacionado à neurodegeneração, embora sejam necessários outros estudos para o entendimento do metabolismo do colesterol no SNC em indivíduos sadios e doentes. A APOE parece estar envolvida no efluxo do

colesterol do cérebro, principalmente na neurodegeneração, como o observado em camundongos deficientes para a APOE *Knockout* (APOEKO) (Fagan et al., 1998).

2.7.2. Colesterol e Processamento da PPA

Além das mutações observadas na PPA e PSEN, diversos fatores ambientais contribuem para a produção de β A. Recentes estudos apontam para o importante papel do colesterol na regulação da produção de β A, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Lah & Levey, 2000). A internalização da PPA na membrana plasmática é mediada pelo LRP, um receptor envolvido na endocitose de vários ligantes, incluindo lipoproteínas. Estudos de localização celular têm demonstrado que a PPA, BACE1 e PSEN são encontradas em domínios membranares ricos em colesterol, conhecidos como *lipid rafts*. Estas estruturas membranares são compostas de um fosfolípido modificado – esfingomiéline, e são mais rígidas que as membranas ricas em fosfolípidios que possuem domínios pobres em colesterol. Nestas estruturas encontramos a α -secretase atracada. A modulação da disponibilidade, da oferta e do tráfego do colesterol, afeta as estruturas destes microambientes e a localização das proteínas nestes domínios transmembranas (Vetrivel et al., 2004).

É importante ressaltar que o colesterol afeta o processamento da PPA *in vitro* presumivelmente pela alteração da localização e das interações em potencial da PPA com suas enzimas de clivagem (Kojro et al., 2001) (Wahrle et al., 2002). Experimentos realizados *in vitro* demonstraram que a diminuição dos níveis de colesterol aumenta a clivagem da PPA pela α -secretase, desta forma, opondo-se à formação de β A (Bodovitz & Klein, 1996). Em contraste, o aumento da disponibilidade do colesterol promove a clivagem da PPA pela BACE, conduzindo, portanto a um aumento da produção de β A (Fears et al., 1999). Com relação à atividade do complexo γ -secretase, tem havido algum debate a respeito da potencialização dessa enzima pela alteração dos níveis de colesterol (Vetrivel et al., 2004). Experimentos de isolamento de membranas revelaram que todos os componentes deste complexo residem em *lipid rafts* e possuem a atividade modulada pela disponibilidade do colesterol (Urano et al., 2005).

Além disso, o tráfico de colesterol mediado pela via endocítica modula o processamento da PPA. Evidências sugerem que a PPA e suas secretases também sejam encontradas em compartimentos endocíticos, particularmente na membrana lisossomal (Kinoshita et al., 2003) (Pasternak et al., 2003). A inibição da atividade da γ -secretase por tratamento com drogas ou deficiência da PSEN1 leva ao acúmulo de CTF β no lisossomo (Chen et al., 2000). Igualmente, o bloqueio do transporte celular de colesterol por um agente inibidor ou por inexistência de NPC – proteína envolvida na desordem de armazenamento lisossomal na Doença de Niemann–Pick, leva a um aumento da atividade da γ -secretase e conseqüente exacerbação da produção de βA_{1-40} e βA_{1-42} no lisossomo (Runz et al., 2002). Estes estudos sugerem que a localização da PPA e das suas enzimas de clivagem, bem como a disponibilidade e o tráfico do colesterol impactam significativamente na geração de βA (Burns et al., 2003).

2.8. Estrógenos

2.8.1. Estrutura e Biossíntese do Estrogênio, da Progesterona e da Testosterona

É sabido que o colesterol é o precursor de todos os hormônios esteróides, destacadamente os hormônios sexuais femininos e masculinos (figura 5). Há três diferentes formas de estrógenos: estradiol, estriol e estrona. Estradiol, também conhecido como 17β -estradiol ou E2, é o estrógeno mais potente. Em geral, o estriol exibe aproximadamente 10% da potência fisiológica do estradiol enquanto a estrona apresenta aproximadamente 1% da potência do estradiol (Johnson & Everitt, 1995).

BIOSSÍNTESE DOS ESTRÓGENOS

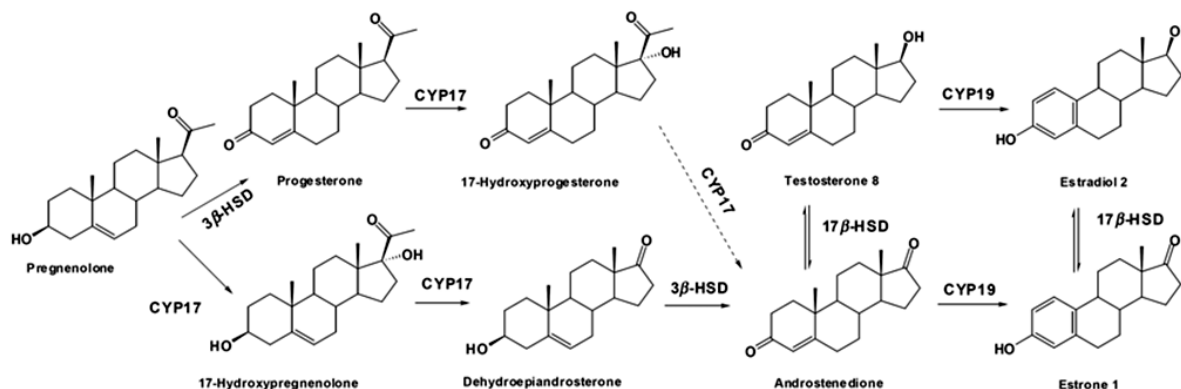


Figura 5: Os estrógenos são derivados de um precursor comum, a pregnenolona, que após a ação de enzimas chaves é convertido em estradiol, estriol e estrona.

A progesterona, também conhecida como P4, é um hormônio esteróide de 21 carbonos envolvido no ciclo menstrual, gravidez e na embriogênese de humanos e de outras espécies o qual é produzido, a partir da puberdade, pelo corpo lúteo e pela placenta durante a gravidez. Em mamíferos, a progesterona, como todos os outros hormônios esteróides, é sintetizada da pregnenolona, que por sua vez é derivada do colesterol. O colesterol sofre oxidação para produzir 20,22-dihidroxicolesterol. Este diol é, então, oxidado, com perda da cadeia lateral que começa na posição C-22 para produzir pregnenolona. Esta reação é catalisada pelo citocromo P450_{scc}. A conversão de pregnenolona em progesterona ocorre em duas etapas. Primeiro, o grupo 3-hidroxila é oxidado a um grupo ceto e, segundo, a dupla ligação é transferida para o C-4, do C-5 por meio de uma reação de tautomerização. Esta reação é catalisada pela isomerase 3-β-hidroxisteróide-desidrogenase/ $\Delta(5)-\Delta(4)$. A progesterona também é o precursor do mineralocorticóide aldosterona, e depois da conversão de 17-hidroxiprogesterona, de cortisol e androstenediona. Androstenediona pode ser convertida em testosterona, estrona e estradiol (Schumacher et al., 2007).

Juntamente com a pregnenolona e a diidroepiandrosterona, a progesterona pertence a grupo dos neuroesteróides. Estes podem ser sintetizados no SNC e também são precursores de outro importante neuroesteróide, a

alopregnanolona. Os neuroesteróides afetam as funções sinápticas, desempenham funções neuroprotetoras e influenciam a mielinização (Schumacher et al., 2004).

A principal hipótese que traça uma relação da P4 com a Doença de Alzheimer baseia-se no fato de que a P4 age como um regulador endógeno do metabolismo da β A. Sabe-se que a patogênese da Doença de Alzheimer está relacionada a uma série de eventos em cascata que finalizam em um produto comum (aumento do pool de β A) que se unem formando oligômeros solúveis, mínimas quantidades de agregado solúvel e eventualmente fibrilas insolúveis. Os neuroesteróides desta forma possuem a capacidade de reduzir este pool de β A porém por vias ainda não bem elucidadas (Klein, Kraft, & Finch, 2001).

A testosterona é um hormônio esteróide oriundo do grupo dos andrógenos que pode ser encontrado nos mamíferos, répteis, aves e outros vertebrados (Cox & John-Alder, 2005) (Reed et al., 2006). Nos mamíferos, a testosterona é primariamente secretada pelos testículos (células de Leydig) e pelas células da teca, nos ovários, apesar de que pequena quantidade também seja secretada pelas glândulas adrenais e placenta (Mooradian, Morley, & Korenman, 1987). Nos homens, a testosterona está envolvida no desenvolvimento de tecidos reprodutivos tais como testículos e próstata bem como promove o aparecimento das características secundárias masculinas: aumento da massa muscular e crescimento capilar (Mooradian, Morley, & Korenman, 1987). Em média, um adulto do sexo masculino produz cerca de dez vezes mais testosterona do que um adulto do sexo feminino, mas as fêmeas são, do ponto de vista comportamental (em vez de uma perspectiva anatômica ou biológica), mais sensíveis à testosterona (Dabbs & Dabbs, 2000).

Aproximadamente 7% da testosterona é reduzida a 5α -dihidrotestosterona (DHT) pela citocromo P450 5α -redutase (Randall, 1994). Cerca de 3% é convertida em estradiol pela aromatase (CYP19A1) (Meinhardt & Mullis, 2002), uma enzima presente no cérebro, fígado e tecido adiposo (Mooradian, Morley, & Korenman, 1987). DHT é a forma mais potente da testosterona, enquanto o estradiol possui atividades diferentes (feminização) em comparação com a testosterona (masculinização). Tanto a testosterona quanto a DHT podem ser

desativadas ou eliminadas por enzimas que hidroxilam nas posições 6, 7, 15 ou 16 da cadeia carbônica (Trager, 1977).

Como a testosterona afeta o corpo todo, o cérebro também é afetado por esta "diferenciação" sexual (Swaab & Garcia-Falgueras, 2009) onde a enzima aromatase converte a testosterona em estradiol, que é responsável por masculinização do cérebro nos ratos do sexo masculino. Nos seres humanos, a masculinização do cérebro fetal parece, pela observação da preferência por sexo em pacientes com doenças congênitas de formação androgênica ou de função do receptor de andrógeno, estar associada com receptores androgênicos funcionais (Wilson, 2001).

Existem algumas diferenças entre um cérebro masculino e feminino (possivelmente pela ação de diferentes níveis de testosterona), sendo um deles a de tamanho: o cérebro humano masculino é, em média, maior (Cosgrove, Mazure, & Staley, 2007). Em um estudo dinamarquês a partir de 2003, os homens apresentaram um comprimento total de fibras mielinizadas de 176.000 km aos 20 anos de idade, enquanto nas mulheres o comprimento total foi de 149.000 km (Marnier et al., 2003). No entanto, as mulheres possuem um maior número de conexões entre as células dendríticas cerebrais (Rabinowicz et al., 1999).

A literatura sugere que a atenção, a memória e as habilidades espaciais são importantes funções cognitivas afetadas pela testosterona no homem. Evidências preliminares sugerem que baixos níveis de testosterona podem ser um fator de risco para o declínio cognitivo e, possivelmente, para a Doença de Alzheimer (Hogervorst et al., 2004) (Moffat et al., 2004). Grande parte da literatura, no entanto, sugere uma curva ou até mesmo a relação quadrática entre o desempenho espacial e a testosterona circulante (Moffat & Hampson, 1996), onde tanto a hipo quanto a hipersecreção de andrógenos circulantes possuem efeitos negativos sobre a cognição modulando a agressividade. É importante ressaltar que a depleção de testosterona é uma consequência normal do envelhecimento nos homens. Uma consequência disso é um aumento do risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer (Pike, Rosario, & Nguyen, 2006) (Rosario et al., 2004).

2.8.2. Esteróides, Neuroproteção e Plasticidade Neuronal

De acordo com a literatura, os efeitos neuroprotetores dos estrógenos residem principalmente em sua ação antioxidante, defensiva e preservadora de neurônios. Os estrógenos demonstram possuir um efeito antioxidante contra diversas substâncias geradoras de radicais livres em vários tecidos e tipos celulares (Behl et al., 2000). Exemplos disto, os estrógenos podem reduzir a proteína β A, o halopedirol e os peróxidos intracelulares induzidos por H_2O_2 e atenuam também a peroxidação lipídica evocada pela proteína β A, a toxicidade pelo glutamato e a exposição ao $FeSO_4$ (Green, Yang, & Simpkins, 2000). Talvez a via bioquímica mais conhecida para os efeitos neuroprotetores dos estrógenos seja a mediada pela MAPK-ERK1 (Singer et al., 1999). É provável que a via MAPK não seja totalmente responsável pelos efeitos neuroprotetores dos estrógenos, pois há também a via Akt/proteína quinase B, a qual age aumentando a expressão de uma proteína anti-apoptótica bcl-2, que por sua vez pode ser mediada por mecanismos responsivos via cAMP (CREB) (Pugazhenthii et al., 2000).

2.8.3. Estrógenos, Envelhecimento e Doença de Alzheimer

Teoricamente todos os mamíferos e outros vertebrados exibem um declínio gradual na capacidade de reprodução durante o processo de envelhecimento (Maffucci & Gore, 2006). A menopausa consiste em um período no qual os ciclos menstruais tornam-se irregulares e eventualmente se encerram. Geralmente ocorre por volta dos 45 – 55 anos de idade. A quantidade de folículos ovarianos diminui durante a vida reprodutiva das mulheres, e conseqüentemente os níveis de FSH aumentam (Lee et al., 1988). Conseqüentemente, quando os níveis foliculares declinam abaixo de um nível crítico, mudanças no ciclo menstrual começam a aparecer. Os níveis de inibina, um peptídeo que diminui a secreção de FSH, declinam como resultado da diminuição do *pool* folicular (Burger et al., 1998), aumentando ainda mais os níveis de FSH (Sherman & Korenmann, 1975). A próxima fase no progresso da menopausa é caracterizada por ciclos anovulatórios acompanhados pela elevação na produção de estrógenos (Santoro et al., 1996). Quando em três ciclos consecutivos não há menstruação, a mulher encontra-se na fase final da

transição da menopausa (WHO S. G., 1996) e geralmente, o último ciclo menstrual ocorre dentro de quatro anos após este evento (Taffe et al., 1997).

2.8.4. Doença de Alzheimer e Efeitos Hormonais

Sabe-se que a incidência da doença aumenta rapidamente com o avanço da idade e que a Doença de Alzheimer afeta proporcionalmente mais as mulheres do que os homens (NITRINI, 1999). Postula-se que o declínio dos níveis de hormônios gonodais em mulheres pós-menopausa pode contribuir para a diferença observada entre os sexos. Na década de 90 foi anunciado que a terapia de reposição de estrogênio (TER) aplicada às mulheres pós-menopausa poderia amenizar os sintomas cognitivos da Doença de Alzheimer, desta forma prevenindo a doença (Baldereschi et al., 1998) (Paganini-Hill & Henderson, 1996). A grande parte dos estudos epidemiológicos sobre TER até então desenvolvidos indicam que a TER é capaz de melhorar as funções cognitivas neste grupo de mulheres e diminuir a incidência da Doença de Alzheimer. Entretanto, alguns estudos têm sugerido que a TER pode aumentar a prevalência da Doença de Alzheimer (Shumaker et al., 2003).

Apesar de que a contribuição da TER no desempenho cognitivo e na patogênese da Doença de Alzheimer em mulheres não estar ainda claro, os modelos animais promovem um meio de se examinar os efeitos básicos do estrogênio nas funções cerebrais. De fato, um número de modelos animais utilizando diferentes metodologias tem demonstrado que o estrogênio modula a morfologia neuronal no hipocampo, uma região cerebral importante para certas formas de memória e também o local de extensivo dano neural na Doença de Alzheimer (Woolley et al., 1990) (Toran-Allerand, Singh, & Setalo, 1999). O estrogênio também aumenta as funções sinápticas no hipocampo e modula diversos sistemas neurotransmissores (Luine, Khylichevskaya, & McEwen, 1975).

Em uma gama variada de estudos, principalmente conduzidos com ratos e camundongos jovens e de meia idade, nos quais o estado de menopausa fora mimetizado por ovariectomia, o tratamento com estrogênio melhorou algumas formas de aprendizado e memória – mais especificamente trabalhos com

memória espacial (Bimonte & Denenberg, 1999) (Daniel et al., 1997) (Daniel & Dohanich, 2001) (Miller et al., 1999). Além do mais, o tratamento com estrogênio parece ser efetivo no aumento do aprendizado e da memória também em murinos fêmeas com idade avançada (Frick, Fernandez, & Bulinski, 2002). Entretanto, alguns outros estudos não têm demonstrado o efeito observado anteriormente relacionado ao tratamento com administração de estrogênio (Fugger et al., 1998). Apesar de o estrogênio não estar bem estabelecido para o tratamento da Doença de Alzheimer, ele parece ser capaz de retardar os eventos patológicos durante o estágio tardio desta doença. Um possível mecanismo postulado seria a inibição do acúmulo de β A (Jaffe et al., 1994).

INTERAÇÕES ENTRE O CÉREBRO E O SISTEMA REPRODUTOR ENDÓCRINO

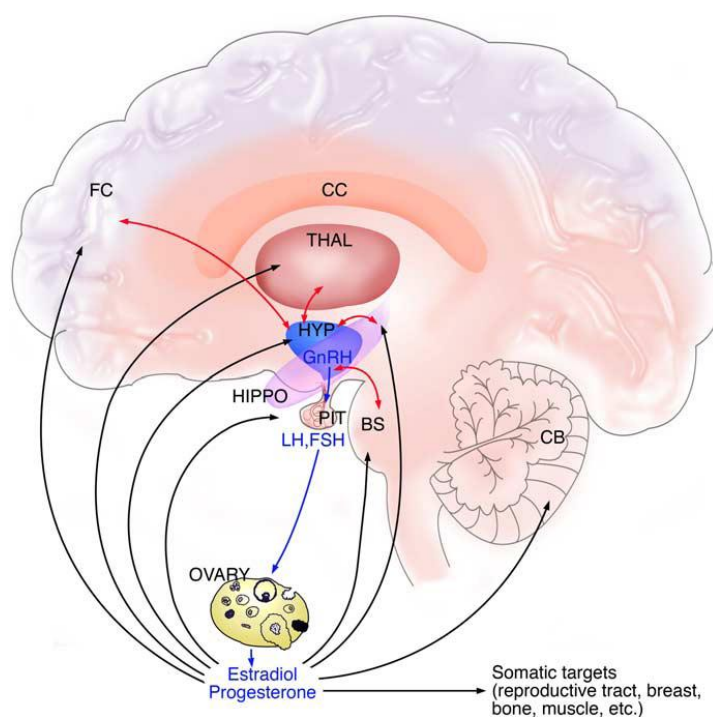


Figura 6: O eixo hipotálamo-pituitária-gônadas (HPG) de fêmeas está demonstrado com os três níveis de regulação das funções reprodutivas. Neurônios GnRH no hipotálamo (azul) liberam o hormônio nos vasos capilares, o qual age na glândula pituitária (rocho). Os gonadorofos liberam LH e FSH na circulação sistêmica. LH e FSH agem no ovário (rosa). Comunicações adicionais entre regiões cerebrais ditas reprodutivas e não-reprodutivas ocorrem via circuito neural ligando o hipotálamo à outras regiões do SNC (setas azuis claras). BS, células cerebrais; CB, cerebelo; CC, corpo caloso; FC, córtex frontal; HIPPO, hipocampo; HYP, hipotálamo; PIT, pituitária; THAL, tálamo (Yin & Gore, 2006).

2.9. Modelos Animais para a Doença de Alzheimer

Diversos modelos animais transgênicos expressando mutações na PPA, PSEN ou em ambas têm sido gerados no intuito de melhor caracterizar os efeitos destas mutações na produção/clearance da β A e no desenvolvimento de amiloidopatias. Estes modelos diferem entre si no que diz respeito à construção do transgene, número de cópias e linhagem de origem. Estas diferenças impactam no estágio e na localização do depósito amilóide (Games et al., 1995) (Hsaio et al., 1996) (Lamb et al., 1997) (Lehman et al., 2003a) (Lehman, Kulnane, & Lamb, 2003b) (Sturchler-Pierrat et al., 1997).

Os dois modelos comumente estudados, PDAPP (Games et al., 1995) e Tg2576 (Hsaio et al., 1996), superexpressam mutações PPA^{V717F} e PPA^{SWE}, respectivamente. O modelo R1.40 contém todo o *locus* do genoma humano para a PPA e superexpressa a PPA^{SWE} sob elementos regulatórios humanos endógenos (Lamb et al., 1997) (Lamb et al., 1993). Significativamente, camundongos transgênicos expressando mutações DAF na PPA ou PSEN exibem aumento nos níveis de β A e deposição amilóide de uma maneira que se assemelha aos efeitos observados dessas mutações em seres humanos. Além do mais, estes animais têm sido inestimável para a compreensão das interações genéticas que podem afetar a deposição de amilóide e também de outras características patológicas.

Camundongos duplamente mutantes para PPA/PSEN exibem placas patológicas de forma precoce e extensa, sugerindo que as mutações na PSEN dominem sobre as da PPA (Borchelt et al., 1997) (Lamb et al., 1999). Há de ressaltar que componentes genéticos ainda não identificados participam na Doença de Alzheimer modulando a quantidade e o estágio da deposição amilóide, como o que ocorre em camundongos R1.40 PPA^{SWE} (Vide Tabela 1) (Lehman et al., 2003a).

TABELA 1
MODELOS DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS PARA A PPA

Modelo Transgênico	PDAPP	Tg2576(PPA ^{SWE})	APP23	J20	R1.40
Transgene	PDGF-PPA ^{V717F}	Hamster <i>Prion (PrP)</i> -PPA ^{SWE}	Timidina (Thy-1)-PPA ^{SWE}	PDGF-PPA ^{V717F/SWE}	Genoma Humano PPA ^{SWE}
Linhagem de Origem	Mix C57BL/6, DBA, Swiss-Webster	Mix C57BL/6, SJL	Mix C57BL/6, DBA/2	C57BL/6	C57BL/6
Níveis de mRNA APP^{MUT}/APP	10x ^b	6x ^c	7x ^d	0,6x ^b	4-6x ^b
Estágio de deposição amilóide em meses	6-9	9-12	7-9	5-7	12-14
Referência	(Games et al., 1995)	(Hsaio et al., 1996) (Carlson et al., 1997)	(Sturchler-Pierrat et al., 1997)	(Hsia et al., 1999) (Mucke et al., 2000)	(Lamb et al., 1999)

^a Todos os animais transgênicos super-expressam um cDNA PPA sob o promotor indicado com a exceção do R1.40;

^b Expressa todas as três isoformas da PPA (PPA695, 751 e 770);

^c Expressa PPA695;

^d Expressa PPA751.

2.10. O estudo da ApoE no metabolismo lipídico em animais

A ApoE possui um papel chave no metabolismo lipoproteico e está envolvida na depuração dos quilomicrons e das partículas de VLDL remanescentes do fígado (Mahley & Innerarity, 1983). Conseqüentemente, camundongos com ausência da ApoE (ApoEKO) fornecem um modelo factível para o estudo dos eventos hiperlipidêmicos, ateroscleróticos co-relacionados ao papel do colesterol em diversas doenças, como por exemplo as amiloidopatias. Sabe-se que a concentração plasmática de colesterol em camundongos selvagens sob dieta padrão é de aproximadamente 80mg/dL sendo este primariamente carregado pela HDL. Camundongos possuem uma quantidade pequena de LDL e de outras partículas aterogênicas, tais como VLDL remanescentes. Esta alta

razão entre HDL/LDL é mantida mesmo quando os camundongos são alimentados com dietas similares as das consumidas pelos humanos na sociedade ocidental. Isto é consideravelmente contraditório em um cenário onde os humanos carregam a maioria do colesterol plasmático através da LDL (110 mg/dL) (Havel & Kane, 1989). Já está bem estabelecido nos seres humanos que uma relação baixa de HDL para LDL confere um alto risco de aterosclerose e doença cardiovascular posterior (Miller, 1982). Assim, o perfil lipoproteico protetor contra a aterosclerose exibido em camundongos pode explicar em parte a ausência destas condições patológicas (figura 7).

Apesar da diferença nos perfis lipídicos, o transporte e o metabolismo do colesterol são similares nas duas espécies (camundongos/humanos), sugerindo que alterações induzidas adequadamente no metabolismo lipoproteico plasmático pode também levar à aterosclerose em camundongos. O desenvolvimento das técnicas envolvendo a manipulação de células tronco embrionárias, na década de 80, permitiram a obtenção de camundongos homocigotos com gene defeituoso para a ApoE (Piedrahita et al., 1992) (Plump et al., 1992).

Apesar de extremamente raro, humanos que não possuem ApoE exibem elevados níveis de colesterol plasmático (Schaefer et al., 1986). Igualmente à estes indivíduos, camundongos ApoEKO acumulam partículas ricas em colesterol no plasma onde pode-se observar níveis superiores a 400 mg/dL, mesmo quando a alimentação apresenta-se com baixos índices de lipídios.

PAPEL DA APOE NA REGULAÇÃO LIPÍDICA

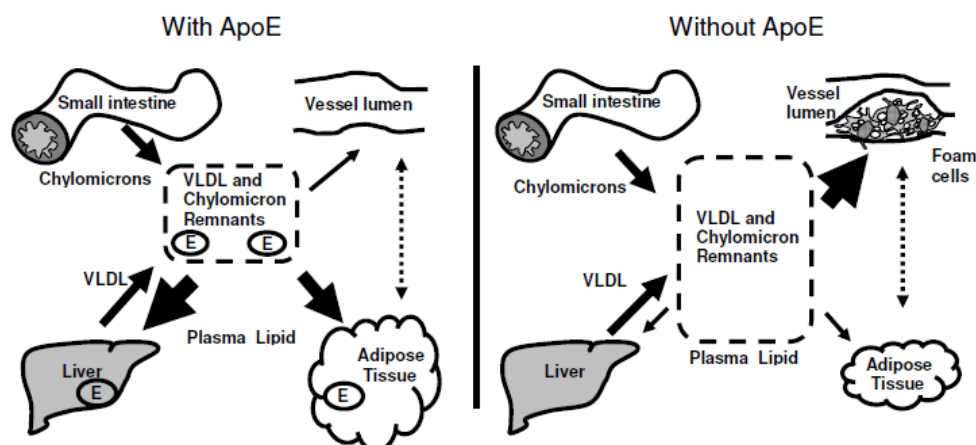


Figura 7: Papel da ApoE na regulação lipídica. A internalização de triglicerídeos mediada pela ApoE no fígado e no tecido adiposo contribui para a manutenção dos níveis normais plasmáticos de lipídios (painel à esquerda). A internalização deficiente de triglicerídeos no fígado e no tecido adiposo na ausência de ApoE contribui para o acúmulo de VLDL e de quilomícrons remanescentes no plasma e conseqüentemente em células espumosas na parede dos vasos sanguíneos (painel à direita). As setas representam as mudanças na acumulação lipídica em diferentes tecidos na presença ou na ausência de ApoE (Pendse et al., 2009).

Estudos conduzidos em humanos e em modelos animais demonstraram que as mutações identificadas na Doença de Alzheimer de estágio precoce diretamente impactam na produção de βA e influenciam o estágio e a extensão do depósito amilóide. Embora a função da APOE no metabolismo lipídico seja bem conhecida, o seu papel na patogênese da Doença de Alzheimer é ainda obscuro. A regulação do processamento da PPA pelos níveis de colesterol, como anteriormente discutido, pode ser uma via pela qual a APOE participa na Doença de Alzheimer. Há três alelos comuns da APOE na população caucasiana; entretanto, somente o alelo $\epsilon 4$ está associado com o aumento no risco da Doença de Alzheimer. O alelo $\epsilon 2$ está presente em uma freqüência de 10%, enquanto o $\epsilon 4$ é encontrado em 15% da população. Análises seqüenciais identificaram o alelo $\epsilon 4$ como sendo o alelo ancestral da APOE que pode ser encontrado em todas as linhagens de camundongos até grandes símios (chipanzés, gorilas, macacos, etc.). O alelo mais comum na população caucasiana é o $\epsilon 3$ cuja freqüência é aproximadamente de 75%. Contudo, na população Asiática o que possui maior prevalência é o $\epsilon 4$ (Farrer et al., 1997)

(Ueki et al., 1993). Os três alelos da APOE codificam três isoformas protéicas que diferem entre si em duas posições na seqüência de aminoácidos. As isoformas E2 e E3 diferem na posição 158, com a substituição de uma cisteína em E2 por uma arginina em E3, resultando na formação de uma ponte dissulfeto entre as moléculas de E2. As isoformas E3 e E4 diferem na posição 112, com a substituição de uma arginina na E4 por uma cisteína na E3 (Utermann et al., 1977). Esta substituição resulta na falha da E4 em formar homodímeros e heterodímeros. As substituições dos aminoácidos apresentadas, em combinação com a presença do aminoácido na posição 161 (Dong & Weisgraber, 1996) (Dong et al., 1994) (Saito et al., 2003) confere sutis diferenças na função das três isoformas com relação aos seus ligantes e também às interações realizadas com seus receptores. A alteração padrão das ligações promove implicações diretas no metabolismo do colesterol e corrobora para o aparecimento da Doença de Alzheimer (vide tabela 2).

TABELA 2
ALELOS DA APOE E SEUS FENÓTIPOS

Alelo da APOE	ε2	ε3	ε4
Substituições dos aminoácidos na posição 112/158	Cis/Cis	Cis/Arg	Arg/Arg
Ligação aos receptores LDL/LRP	1%/40% ^a	Normal	Normal
Lipoproteína associada na periferia	HDL	HDL	VLDL
Níveis do colesterol no plasma	Normal/Baixo	Normal	Alto
Abundância da APOE no plasma	Alta	Normal	Baixa
Doenças Associadas	Hiperlipoproteinemia Tipo III; Angiopatia amilóide cerebral com acidente vascular encefálico.	Nenhuma	Doença Cardiovascular; Doença de Alzheimer.

^aRelativo à capacidade de ligação da ε3.

2.11. O papel da APOE no Sistema Nervoso Central

Conjuntamente com o seu papel no metabolismo do colesterol periférico, a APOE possui funções no metabolismo do colesterol no Sistema Nervoso Central (SNC). A APOE é a lipoproteína primária do SNC produzida pelos astrócitos (Pitas et al., 1987) (Xu et al., 1999). Estas células representam uma população de células da glia ativa mitoticamente e que está envolvida na manutenção neuronal e na resposta inflamatória. A APOE tem sido localizada nos neurônios provavelmente devido à captação destas células (Han et al., 1994a) (Han et al., 1994b). A APOE é encontrada em todas as regiões cerebrais de camundongos e em níveis aumentados no córtex e no hipocampo (Fujita et al., 1999). Diversas pesquisas têm objetivado quantificar os níveis de APOE segregando por regiões cerebrais, concentrando-se na abundância de APOE no cérebro de indivíduos com Doença de Alzheimer em relação aos controles, independentemente do genótipo da APOE (Artiga et al., 1998a) (Bertrand et al., 1995) (Harr et al., 1996) (Pirttila et al., 1996). A maioria dos estudos não possuem amostras representativas para o alelo $\epsilon 2$, pois este não é tão comum na população, em especial na Doença de Alzheimer. Beffer et al. publicaram um dos estudos mais abrangentes demonstrando que em cérebros controles a presença de um alelo $\epsilon 4$ diminuía a quantidade total de APOE (Beffert et al., 1999c). Além disso, vários polimorfismos na região promotora da APOE foram identificados cuja ação aumenta e diminui a expressão do gene e do conjunto de proteínas (Artiga et al., 1998b) (Beffert et al., 1999c) (Lambert et al., 1998) (Laws et al., 2002). Estes polimorfismos possuem a capacidade de influenciar a abundância da APOE independentemente da seqüência codificada, isto é, da expressão do alelo (Town et al., 1998). Além do mais, estes Polimorfismos de Nucleotídeo Único (PNUs) – ou SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), estão em desequilíbrio de ligação com os alelos da APOE. Portanto, a análise da abundância da APOE em relação ao alelo APOE é confundida pela influência potencial de SNPs promotores.

Outra apolipoproteína no SNC inclui a ApoJ (Clusterina), também produzida pelos astrócitos, e a APOAI, que possui a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. Estas lipoproteínas desempenham um papel discreto no metabolismo do colesterol no SNC do que a APOE. O impacto dos níveis da

APOE sob a APOJ ainda não está bem esclarecido dadas as mesmas complicações enumeradas acima na obtenção de amostras (Bertrand et al., 1995) (Harr et al., 1996).

2.12. A ApoE e a proteína β A

Diversos estudos têm demonstrado os efeitos específicos de cada alelo da APOE na quantidade e também na espécie de β A produzido na Doença de Alzheimer. O alelo $\epsilon 4$ está correlacionado com o aumento da β A em indivíduos não-demenciais (Morishima-Kawashima et al., 2000) e aumentos específicos nos níveis de βA_{1-40} em portadores de Doença de Alzheimer (Beffert et al., 1999c) (Gearing, Mori, & Mirra, 1996). Ainda não se sabe se estas observações representam uma clivagem alternada em indivíduos com o alelo $\epsilon 4$ ou diferenças nas interações E4- β A. A APOE tem sido postulada em facilitar o *clearance*, a fibrilização e o depósito de β A.

Análises *in vitro* tanto da APOE quanto da β A revelaram diferenças isofórmicas específicas na ligação da APOE na β A. LaDu e colaboradores demonstraram que E2 e E3 formam complexos mais estáveis à β A do que E4 e que este efeito é lipídico dependente (LaDu et al., 1994).

3. OBJETIVOS

Sabe-se que a Doença de Alzheimer é mais comum em mulheres do que em homens e que o decréscimo dos níveis de estrogênio na menopausa pode explicar o fato desta observação. Além dos níveis hormonais há diversos componentes gênicos envolvidos com a Doença de Alzheimer. O amplamente estudado é o que está relacionado à ApoE.

Portanto o presente trabalho postula, como objetivo geral, **verificar a influência da ApoE e dos hormônios sexuais femininos sobre os aspectos moleculares envolvidos na formação da placa senil no sistema nervoso central de camundongos fêmeas C57 e ApoE KO**. Além deste também se pretende:

- Analisar histologicamente a presença de depósitos amilóides no tecido cerebral.
- Quantificar os níveis de β A, proteína Tau e proteína Tau porção referente à fosforilação de serina localizada na posição 199 (Tau [pS199]) no plasma, na urina e no extrato cerebral.
- Mensurar os níveis plasmáticos de 17β -estradiol (E2), progesterona (P4), testosterona e fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF).
- Avaliar o perfil lipídico e glicêmico através da mensuração plasmática de colesterol total, triglicerídeos, lipoproteína de densidade alta (c-HDL), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de densidade baixa (LDL) e glicose.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais - CEUA, da Universidade Federal do Espírito Santo em 20 de abril de 2010 sob o número 021/2009 em anexo. É importante ressaltar que esta dissertação de mestrado é parte integrante do projeto “*Papel da ApoE e do estrogênio na expressão de biomarcadores da Doença de Alzheimer: estudos pré-clínicos usando modelos animais geneticamente modificados e diagnóstico molecular*” em uma co-parceria entre o Laboratório de Biologia Celular do Envelhecimento (LBCE) do Núcleo de Biotecnologia do Departamento de Morfologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo e o Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de la Sabana - Chía – Colômbia.

4.1. Animais, Procedimentos e Tratamentos

Foram utilizados 14 camundongos fêmeas do tipo *Mus musculus* da linguagem C57BL/6J (doravante chamados apenas C57) e 14 camundongos fêmeas do tipo *Mus musculus* transgênicos *knockout* para o gene da apolipoproteína E (ApoEKO), reibridizados para a linhagem parental C57BL/6J por ao menos cinco gerações, gentilmente cedidos pela Prof. Dr. Silvana dos Santos Meyrelles (Departamento de Ciências Fisiológicas, CCS-UFES). Estes animais foram crescidos até 180 dias de vida (aproximadamente seis meses), pesando cerca de 20 ± 4 gramas. Os animais foram mantidos em gaiolas com até 4 animais/grupo em ambiente com regime de ciclo claro/escuro (12h/12h), com temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e ração *ad libitum* composta por 66% de carboidratos, 23% de proteínas, 4% de lipídios, 6% de fibras e 1% de vitaminas e sais minerais, além de água à vontade. A idade de seis meses foi escolhida pelo fato de, nesta idade, os animais alcançarem a fase *lag* de seu crescimento, permitindo-se separar o fenômeno da somatopausa da menopausa induzida pela ovariectomia. Estudos realizados no LBCE/UFES corroboram a escolha da idade conforme descrito nas figuras 8 e 9 que demonstraram o curso temporal do crescimento de animais ApoEKO e C57 (WT - *wild type*) em termos de peso corporal (g) e comprimento de cauda (cm), respectivamente.

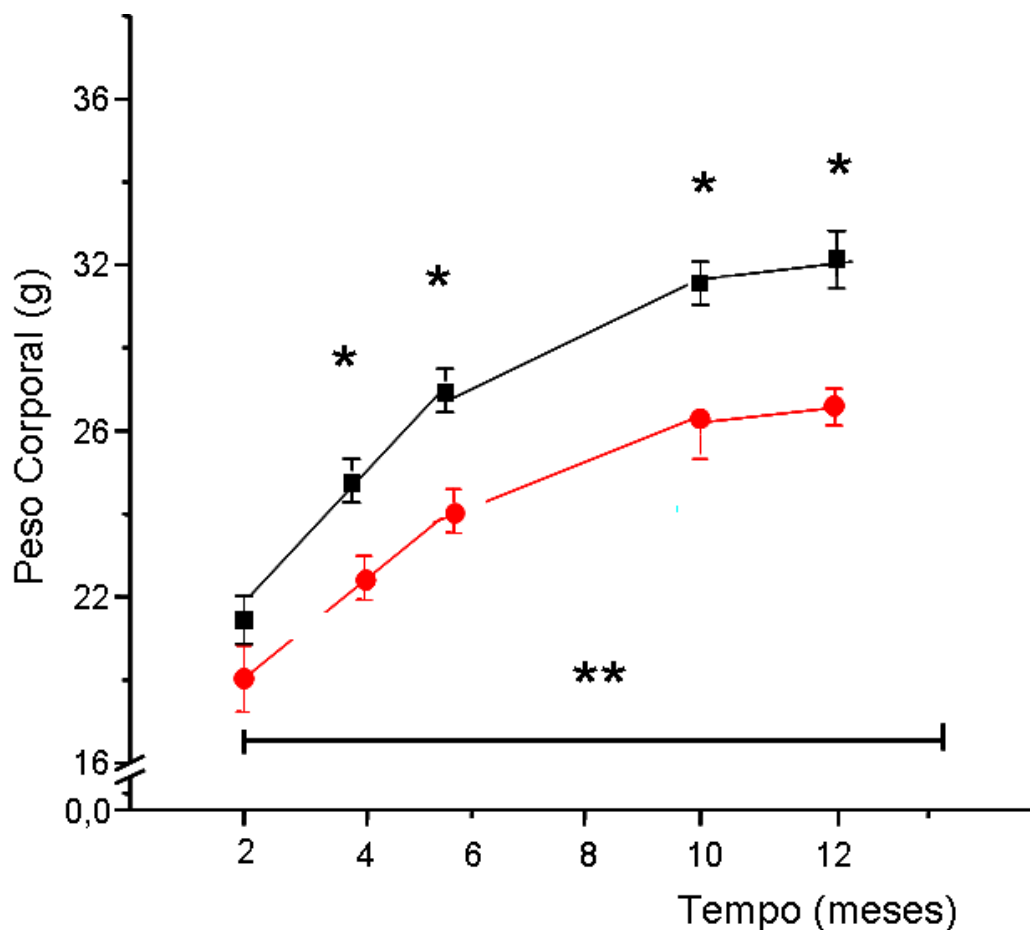


Figura 8: Curso temporal do crescimento dos animais APOEKO (círculos vermelhos) e WT (quadrados pretos) em termos de peso corporal (g). Os animais APOEKO são significativamente mais leves que os animais WT ($n = 6$, $p < 0,05$). Contudo, a taxa de crescimento de ambos os grupos experimentais é progressiva, linear ($r = 0,95$ para ambos os grupos) e de valores semelhantes ($1,0 \pm 0,1$ g/mês para WT vs. $0,9 \pm 0,1$ g/mês para APOEKO). * Estatisticamente significativo quando comparado inter-grupos. ** Estatisticamente significativo quando intra-grupos.

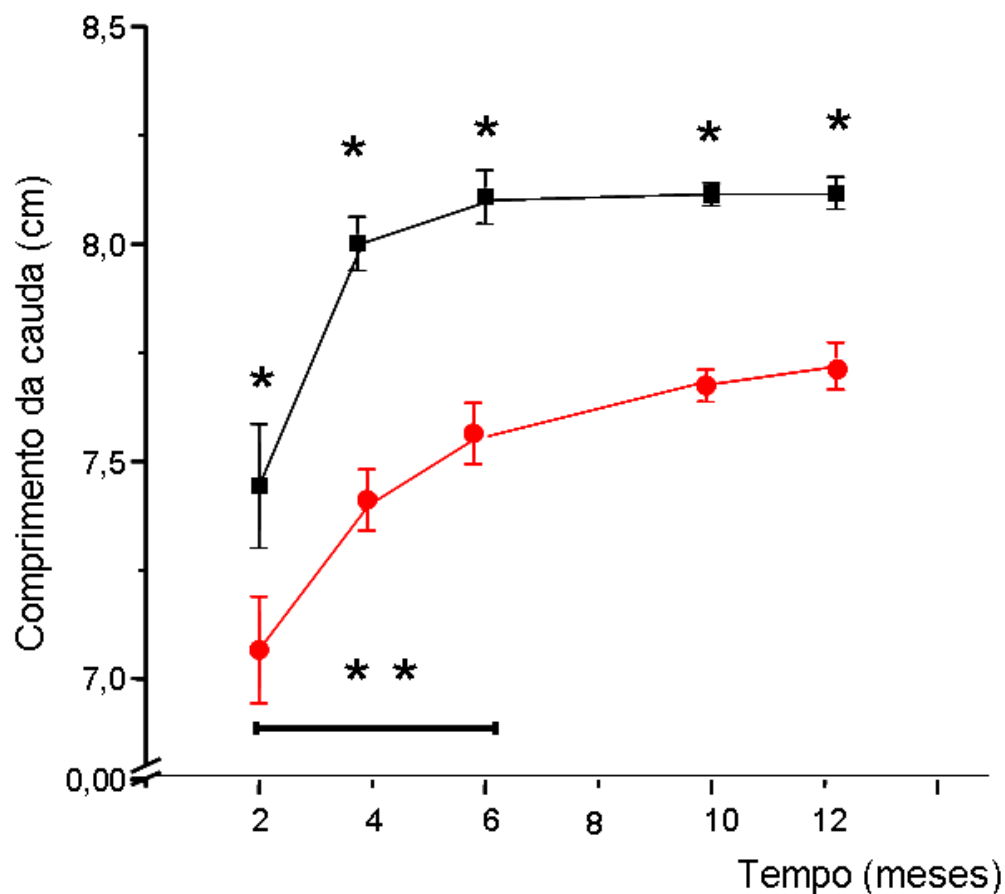


Figura 9: Curso temporal do crescimento dos animais APOEKO (círculos vermelhos) e WT (quadrados pretos) em termos de comprimento da cauda (cm). Os animais APOEKO são também significativamente menores que os animais WT ($n = 6$, $p < 0,05$). Não obstante a taxa de crescimento de ambos os grupos experimentais diminua progressivamente, esta é maior nos animais APOEKO ($r^2 = 0,91$ vs. $0,50$ para WT). Interessante notar que os animais WT e APOEKO não apresentam crescimento significativo após o quarto mês, sugerindo que estes animais estão parando de crescer.* Estatisticamente significativo quando comparado inter-grupos. ** Estatisticamente significativo quando intra-grupos.

4.2. Procedimentos cirúrgicos

No 180º dia após o nascimento, os animais (C57 e ApoEKO) foram previamente pesados, segregados em gaiolas individuais identificadas e posteriormente anestesiados com a administração intraperitoneal (i.p.) de solução contendo ketamina e xilazina (9/5 v/v) na dose de 10 mcg/g de peso. Após a constatação visual da completa indução anestésica, metade do número total dos animais foi submetida à extração bilateral completa dos ovários e de 2/3 dos cornos uterinos no sentido crânio-caudal (**Ovariectomia/OVX**). À outra metade dos animais realizou-se apenas incisão bilateral com a exposição da cavidade abdominal, porém não se retiraram os ovários e tampouco os cornos uterinos (**cirurgia fictícia/SHAM**). Ainda sob efeito anestésico todos os animais receberam dupla identificação utilizando brincos azuis, no caso dos C57, e brincos vermelhos, no caso dos ApoE, além de cortes sistematizados e padronizados nas orelhas direita e/ou esquerda. Após a realização de ambos os procedimentos cirúrgicos foi administrada benzilpenicilina na dose de 2mcg/g de peso pela via subcutânea como medida profilática ao aparecimento de infecções. Todos os animais permaneceram em gaiolas individuais durante o período de cinco dias para o acompanhamento de qualquer intercorrência no pós-operatório. O procedimento cirúrgico foi realizado em todos os animais sempre no mesmo horário.

IDENTIFICAÇÃO ANATÔMICA DO APARELHO REPRODUTOR FEMININO DE CAMUNDONGOS

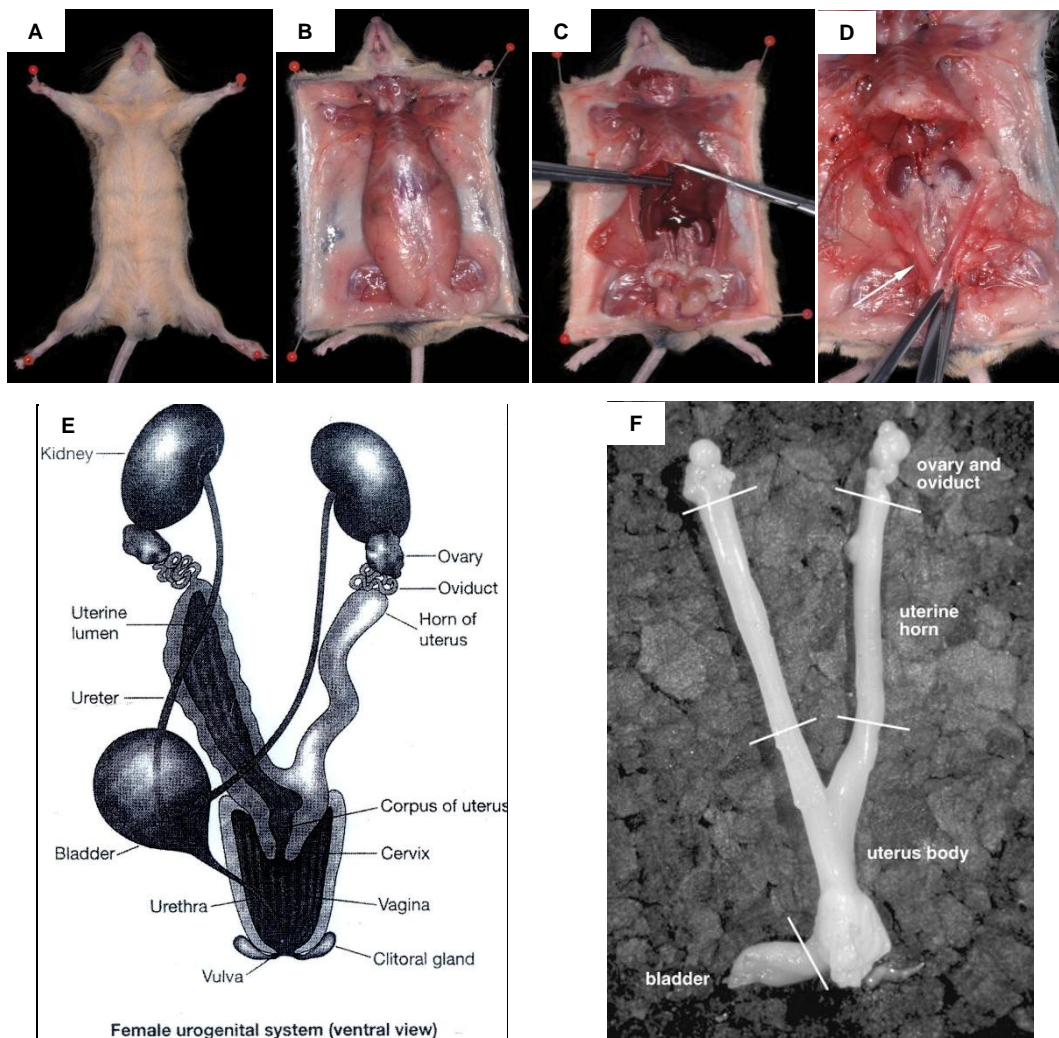


Figura 10: Estruturas anatômicas do aparelho reprodutor feminino de camundongos enfatizando a identificação do útero e cornos uterinos. A-D: Cavidade abdominal; E: Aparelho genito-urinário; F: Segmentação ao aparelho reprodutor feminino (corpo uterino, cornos uterinos, oviductos e ovários) Seta branca (D): Cornos uterinos (Covelli, 2009).

4.3. Grupos experimentais

Findo o prazo do período pós-operatório os animais foram segregados em quatro grupos distintos de acordo com o procedimento cirúrgico realizado:

- **C57**
 - **SHAM:** grupo de animais submetidos à cirurgia fictícia;
 - **OVX:** grupo de animais submetidos à ovariectomia;

- **ApoEKO**
 - **SHAM:** grupo de animais submetidos à cirurgia fictícia;
 - **OVX:** grupo de animais submetidos à ovariectomia;

Semanalmente o peso corporal dos animais era monitorado e os dados plotados em planilha específica. No 60º dia após o procedimento cirúrgico (240º dia de vida) os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para a mensuração da quantidade de água ingerida, do volume urinário produzido e do peso corporal, em um intervalo de 24 horas. Previamente à coleta dos líquidos corpóreos anteriormente citados, os animais permaneceram 24 horas nas gaiolas metabólicas, processo este denominado de ambientação.

Ao final das 24 horas os animais foram sacrificados administrando-se ketamina e xilazina (9/5 v/v) i.p. em uma dose de 10 mcg/g de peso como indutor anestésico e relaxante muscular, respectivamente.

Após a visualização completa da quietação do animal era realizada a esternotomia e recolhidas alíquotas de sangue do ventrículo esquerdo, aproximadamente um mL, com o auxílio de seringas previamente ambientadas com heparina. Em seguida as amostras foram centrifugadas à 4°C por 20 minutos à 12.000 rpm e o sobrenadante (plasma) segregado e acondicionado à -80°C em microtubos para futuras análises bioquímicas. Os úteros e cornos uterinos foram extraídos, pesados e armazenados em solução fixadora tamponada (PBS/Formalina 4%) à 4°C para a realização de análises morfométricas. No que tange aos cérebros, para a realização de Técnicas Histoquímicas, os mesmos foram seccionados após a extração da calota craniana e os dois hemisférios cerebrais resultantes foram armazenados individualmente em solução fixadora tamponada (PBS/Formalina 4%) à 4°C sem distinção de lado esquerdo/direito. O sacrifício foi realizado em todos os animais sempre no mesmo horário.

4.4. Histomorfometria dos Úteros e dos Cornos Uterinos

Os úteros e os cornos uterinos foram retirados da solução fixadora; lavados em água deionizada por 30 minutos; desidratados progressivamente em uma série crescente de alcoóis: 1 hora em álcool 70% (1x); 1 hora em álcool 96° GL (1x)

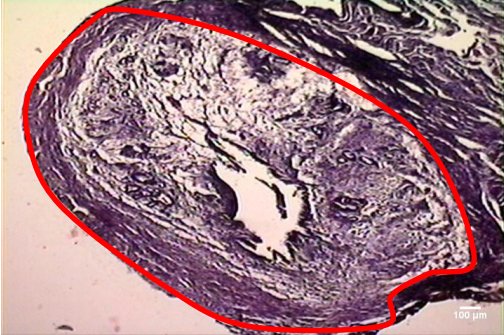
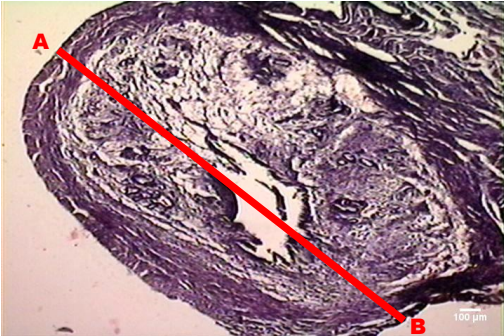
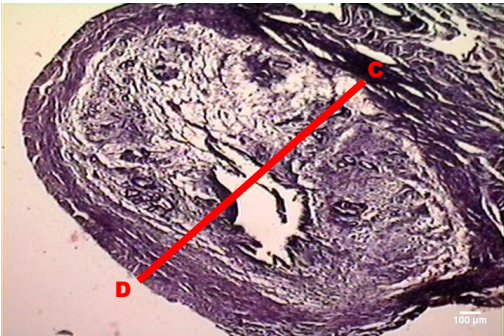
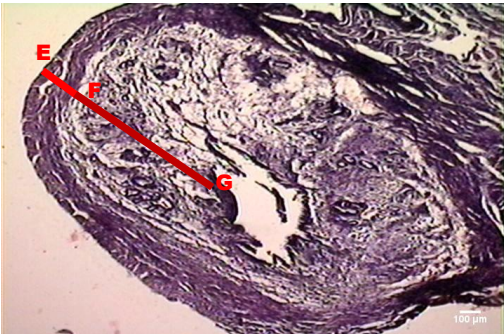
e 1 hora em álcool absoluto (3x); diafanizados com Xilol durante 30 minutos (3x); banhados em parafina a 56°C por 30 minutos (3x) e incluídos em blocos de parafina. Estes foram cortados em seções de 10 µm de espessura utilizando micrótomo. As seções obtidas foram montadas em lâminas previamente tratadas com solução de gelatina 1% e permaneceram durante 24 horas em estufa a 56°C. Os cortes foram desparafinados utilizando Xilol por 2 minutos (2x); álcool absoluto por 1 minuto (2x); álcool 95% por 1 minuto (2x); álcool 70% por 1 minuto (2x) e hidratados com água deionizada em 3 etapas por 2 minutos. Em seguida foram corados com hematoxilina e eosina para a identificação das estruturas histológicas. A análise morfométrica dos úteros e dos cornos uterinos foi conduzida através da captura de imagens do endométrio e do miométrio com o auxílio de microscópio de luz com magnificação final de 40X e 100X. Foram realizadas medições de cinco variáveis conforme Tabela 3 e 4. Para cada animal, foram preparadas duas lâminas e os cornos uterinos foram divididos em quatro quadrantes, de tal maneira que foram obtidas oito medições para cada variável estudada em cada animal do estudo (Gomes et al., 2009).

Conforme Tabela 3 foi utilizado o aumento final de 100 X para determinar a espessura do endométrio (distância entre a borda superficial do epitélio luminal e a porção mais interna do miométrio) e do miométrio (as duas camadas musculares).

TABELA 3
VARIÁVEIS MENSURADAS NA ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS ÚTEROS E CORNOS UTERINOS.

	Magnificação
Área do Corno Uterino (µm ²)	40 X
Porção Maior do Diâmetro do Corno Uterino (µm)	40 X
Porção Menor do Diâmetro do Corno Uterino (µm)	40 X
Miométrio (µm)	100 X
Endométrio (µm)	100 X

TABELA 4
PADRÕES MÉTRICOS ADOTADOS PARA ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS ÚTEROS E
CORNOS UTERINOS.

40X	
Área do Corno Uterino (Círculo em Vermelho)	
Porção Maior do Diâmetro do Corno Uterino (Ponto A – B)	
Porção Menor do Diâmetro do Corno Uterino (Ponto C – D)	
100X	
Miométrio (Ponto E – F)	
Endométrio (Ponto F – G)	

4.5. Análises Histoquímicas

Para a condução das Técnicas Histoquímicas os hemisférios cerebrais foram armazenados em solução fixadora tamponada (PBS/Formalina 4%) à 4°C por 4 semanas (Litchfield & Nagy, 2001). Após este período um hemisfério cerebral foi submetido ao protocolo de **Cajal** (Behmer et al., 2003), enquanto que no outro hemisfério foram realizados os protocolos de **Bielschowsky** (Mirra, Hart, & Terry, 1993) e **Tioflavina S** (Guntern et al., 1992). Tanto **Cajal** quanto o protocolo de **Bielschowsky** baseiam-se no fato de que os componentes do tecido nervoso são corados pela prata. No protocolo de **Cajal** o sal de prata que se liga às estruturas nervosas é reduzido pela ação de um único agente oxidante com o intuito de se visualizar a prata metálica. No protocolo de **Bielschowsky** as fibras nervosas também são sensíveis à solução de prata. Contudo as seções são tratadas com prata amoniacal e depois são reduzidas e clarificadas por uma série de etapas com agentes oxidantes com o intuito de se visualizar a prata metálica. Os axônios, placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares ficam pretos, as placas e proteína amilóide vascular ficam geralmente marrom e/ou marrom escura e o *background* amarelo e/ou marrom. Já a coloração através da **Tioflavina S** está fundamentada na grande afeição desta substância fluorescente pelos componentes da placa amilóide, sobretudo a β A. Assim as placas senis e os emaranhados neurofibrilares ficam fluorescentes e o *background* preto.

4.5.1. Técnica de Cajal

Após a retirada de um dos hemisférios da solução fixadora, o tecido cerebral foi tratado com 1,5% de Nitrato de Prata (AgNO_3) a 37°C no escuro, por 05 dias, até que o tecido desenvolvesse uma cor semelhante ao do tabaco. A fim de retirar o excesso de AgNO_3 , o tecido foi lavado com H_2O deionizada por 02 horas. Para a redução química da prata metálica e posterior visualização dos constituintes celulares do tecido estudado, utilizou-se Hidroquinona à 2% em Formalina neutra 5% por 24 horas. Posteriormente o tecido foi desidratado progressivamente em uma série crescente de álcoois: 1 hora em álcool 70% (1x); 1 hora em álcool 96° GL (1x) e 1 hora em álcool absoluto (3x). Em seguida os hemisférios permaneceram durante 30 minutos (3x) em Xilol, foram

banhados em parafina a 56°C por 30 minutos (3x) e incluídos em bloco de parafina. Subseqüentemente os blocos foram cortados em micrótomo obtendo-se seções de 10 µm de espessura. As seções obtidas foram montadas em lâminas previamente impregnadas com solução de gelatina 1% e acondicionadas à 56°C *overnight* para secagem. Em seguida as lâminas foram desparafinizadas utilizando Xilol por 2 minutos (2x); álcool absoluto por 1 minuto (2x); álcool 95% por 1 minuto (2x); álcool 70% por 1 minuto (2x) e hidratadas com água deionizada em 3 etapas por 2 minutos sendo seladas com lamínula e resina sintética média – Bálsamo do Canadá.

4.5.2. Técnica de Bielschowsky

Os hemisférios selecionados foram retirados da solução fixadora; lavados em água deionizada por 30 minutos; desidratados progressivamente em uma série crescente de alcoóis: 1 hora em álcool 70% (1x); 1 hora em álcool 96° GL (1x) e 1 hora em álcool absoluto (3x); diafanizados com Xilol durante 30 minutos (3x); banhados em parafina a 56°C por 30 minutos (3x) e incluídos em blocos de parafina. Estes foram cortados em seções de 10 µm de espessura utilizando micrótomo. As seções obtidas foram montadas em lâminas previamente tratadas com solução de gelatina 1% e permaneceram durante 24 horas em estufa a 56°C. Os cortes foram desparafinados utilizando Xilol por 2 minutos (2x); álcool absoluto por 1 minuto (2x); álcool 95% por 1 minuto (2x); álcool 70% por 1 minuto (2x) e hidratados com água deionizada em 3 etapas por 2 minutos. Posteriormente as lâminas foram tratadas com 20% de AgNO₃ no escuro à ± 37°C durante 20 minutos, lavadas em água deionizada em 3 etapas durante 2 minutos e tratadas com prata amoniacal no escuro durante 10 minutos à ± 37°C. Para o preparo da solução de prata amoniacal foi adicionado, gota a gota, uma alíquota da solução de hidróxido de amônio PA (28-30%) a uma solução de AgNO₃ a 20% até que o precipitado marrom inicialmente formado desaparecesse completamente. Em seguida foram adicionadas outras 2 gotas de solução de hidróxido de amônia PA (28-30%) para a efetiva solubilização da prata. Após o tratamento com prata amoniacal as seções foram colocadas em solução de Trabalho durante 5 minutos. A solução Trabalho foi preparada utilizando-se 8 gotas de hidróxido de amônia

PA (28-30%) e 8 gotas de solução Estoque (20,0 mL de formaldeído 37-40%; 0,5 g de ácido cítrico; 2 gotas de ácido nítrico; qsp 100,0 mL de água deionizada) para um total de 50,0 mL de água deionizada. As lâminas foram checadas sob microscópio a fim de verificar o tempo adequado de incubação na solução Trabalho. Posteriormente as seções foram imersas em solução recém preparada de água amoniacal (para cada 50,0 mL de água destilada foram adicionadas 8 gotas de hidróxido de amônia PA (28-30%)) por 2 minutos e lavadas em água deionizada em 3 etapas. A reação de redução da prata foi bloqueada com solução HYPO (tiosulfato de sódio a 5%) durante 5 minutos. A cada 15 lâminas todas as soluções utilizadas eram renovadas. Todas as lâminas posteriormente foram lavadas em água deionizada em 3 etapas, desidratadas progressivamente em uma série crescente de álcoois: 1 hora em álcool 70% (1x); 1 hora em álcool 96° GL (1x) e 1 hora em álcool absoluto (3x); diafanizados com Xilol durante 30 minutos (3x), limpas e montadas com resina média – Bálsamo do Canadá.

4.5.3. Coloração pela Tioflavina S

Os hemisférios selecionados foram retirados da solução fixadora; lavados em água deionizada por 30 minutos; desidratados progressivamente em uma série crescente de álcoois: 1 hora em álcool 70% (1x); 1 hora em álcool 96° GL (1x) e 1 hora em álcool absoluto (3x); diafanizados com Xilol durante 30 minutos (3x); banhados em parafina a 56°C por 30 minutos (3x) e incluídos em blocos de parafina. Estes foram cortados em seções de 10 µm de espessura utilizando micrótomo. As seções obtidas foram montadas em lâminas previamente tratadas com solução de gelatina 1% e permaneceram durante 24 horas em estufa a 56°C. Os cortes foram desparafinados utilizando Xilol por 2 minutos (2x); álcool absoluto por 1 minuto (2x); álcool 95% por 1 minuto (2x); álcool 70% por 1 minuto (2x) e hidratados com água deionizada em 3 etapas por 2 minutos. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de Permanganato de Potássio 0,25% por 20 minutos; enxaguadas com água deionizada por 1 minuto; submetidas à solução Bleaching (Branqueamento) por 2 minutos; enxaguadas com água deionizada por 1 minuto; mergulhadas na solução Blocking (Bloqueio) por 20 minutos; enxaguadas com água deionizada

por 1 minuto; imersas em solução de Ácido acético 0,25% por 5 segundos e enxaguadas novamente com água deionizada por 5 minutos. Após a completa secagem das lâminas as seções foram imersas em solução de Tioflavina S (0,0125% de Tioflavina S em q.s.p. 100,0 mL de Etanol 50%) por 5 minutos; secas à temperatura ambiente; lavadas 2X com solução de etanol 50%; enxaguadas com água deionizada 2X por 1 minuto e montadas com lamínula empregando-se geléia de glicerina (16% de gelatina; 53% de glicerina; q.s.p. 100,0 mL água deionizada) como agente selante.

A solução Bleaching foi preparada adicionando-se 1,0g de Metabissulfito de Potássio e 1,0g de Ácido Oxálico em q.s.p. 100,0 mL de água deionizada. Para o preparo da solução Blocking foram utilizados 1,0g de Hidróxido de sódio e 3,0 mL de Peróxido de Hidrogênio 30% em q.s.p. 100,0 mL de água deionizada. As soluções Bleaching e Blocking foram descartadas sempre após a passagem de cada lâmina sendo substituída por outras *fresh*.

4.5.4. Processamento das amostras

Os hemisférios cerebrais contidos nos microtubos foram retirados do freezer à -80°C e imediatamente armazenados à -20°C por 2 horas. Em seguida os mesmos foram retirados e imersos em gelo. Cada amostra foi homogeneizada em solução contendo tampão PBS (pH 7,4); citrato de sódio 50 mM (pH 6,4); Tween 20 (0,03%); TRITON® X-100 1%; SDS 0,2%; sacarose 5% e glicina 50 mM, totalizando 10 mL de lisado cerebral por extração. Após a homogeneização, todas as amostras foram submetidas à centrifugação a 22.000g, à 4°C, durante 20 minutos e o sobrenadante foi recolhido. Alíquotas do homogeneizado foram utilizadas para a determinação da concentração de proteína pelo método de Bradford (Sigma Aldrich) (Bradford, 1976) em triplicata.

As amostras de plasma e de urina as quais permaneceram à -80°C sofreram descongelamento progressivo à -20°C por 2 horas e em seguida imersas em gelo.

Posteriormente todas as amostras foram diluídas com “tampão EIA” fornecido pelo fabricante, na proporção de 1:5 (plasma), 1:10 (urina) e 1:20 (lisado

cerebral). Foram adicionados 100 µL de cada amostra em cada poço e a microplaca incubada *overnight* à 4°C em recipiente fechado e ao abrigo da luz. Decorrido este tempo os poços foram lavados sete vezes com tampão de lavagem; adicionaram-se 100 µL de solução de anticorpo marcado em cada poço; incubou-se a microplaca por 1 hora à 4°C em recipiente fechado e ao abrigo da luz; lavou-se a mesma nove vezes em tampão de lavagem e adicionaram-se 100 µL de solução de cromógeno. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, em recipiente fechado e ao abrigo da luz, a reação foi paralisada com a adição de 100 µL de solução de parada em cada poço. Em seguida a microplaca foi lida em leitor de microplaca com comprimento de onda em 450 nm.

4.6. Análises Bioquímicas

Foram realizadas mensurações no plasma de parâmetros bioquímicos conforme tabela 5.

TABELA 5
ANÁLISES BIOQUÍMICAS REALIZADAS NO PLASMA

	Analito	Método	λ (nm)
Plasma	Glicose	GOD-Trinder (Ponto Final)	490 – 520
	Colesterol	Enzimático (Trinder)	500
	Triglicerídeos	Enzimático (Trinder)	505
	C-HDL	Ácido fosfotúngstico e Cloreto de Magnésio	490 – 540
	VLDL	Equação de Friedewald	--
	LDL	Equação de Friedewald	--

As dosagens de VLDL e LDL foram obtidas indiretamente aplicando-se a equação de Friedewald para amostras com valores de triglicerídeos menores do que 400mg/dL (Friedewald, Levy, & Fredrickson, 1972). Assim:

$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol Total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

$$\text{Colesterol VLDL} = \text{Triglicerídeos}/5$$

4.6.1. Urina de 24H

O volume urinário de 24 horas foi mensurado através da quantidade de urina produzida por cada animal no 59º dia após o procedimento cirúrgico (239º dia de vida) quando os mesmos foram colocados em gaiolas metabólicas.

4.7. ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay)

4.7.1. Dosagem da Proteína β A, proteína Tau e proteína Tau [pS199]

Os reagentes utilizados para a mensuração dos níveis totais de proteína β -amilóide (1-40) foram adquiridos da *Immuno-Biological Laboratories* (27720) e para a dosagem da proteína Tau e proteína Tau [pS199] da *Invitrogen Corporation* (KMB7011 e KMB7041, respectivamente).

4.7.2. Dosagem de E2, P4, Testosterona e BDNF

Os reagentes utilizados para a mensuração das concentrações de E2 (E0461Mu), P4 (E0454Mu), testosterona (E0458Mu) e de BDNF (E0011Mu) foram adquiridos da *Uschn Life Science Inc. Wuhan*.

Todas as amostras utilizadas tanto nas dosagens bioquímicas quanto nas de *ELISA* foram analisadas em triplicata e simultaneamente aos ensaios realizados, para cada teste foi construída a curva de calibração utilizando soluções padrão fornecidas pelos fabricantes.

4.8. Equipamentos

4.8.1. Microtomia

Os hemisférios cerebrais e os cornos uterinos foram seccionados em micrótomo modelo *American Optical*® 820.

4.8.2. Microscopia

As seções cerebrais coradas pela aplicação dos protocolos de **Cajal**, **Bielschowsky** além dos cornos uterinos corados com hematoxilina e eosina foram analisadas com microscópio de luz marca *Olympus*® **AX 70** usando os

aumentos de 40X, 100X e 200X com videocâmara colorida acoplada ao microscópio para captura das imagens de marca **Hitachi® VK-C150**. As seções cerebrais oriundas da aplicação da técnica com **Tioflavina S** foram observadas em microscópio de fluorescência marca **Nikon® A1R MP Multiphoton Confocal** sob filtro verde (500-565 nm) nas magnificações 40X, 100X e 200X.

4.8.3. Análise Histológica e Densitométrica

Utilizou-se o programa **ImageJ 1.42q National Institute of Health – USA** para analisar as imagens capturadas pelos sistemas ópticos.

4.8.4. Dosagens Bioquímicas

Utilizou-se um analisador bioquímico semi-automático modelo **BioPlus2000®** e reagentes da empresa **Labtest Diagnóstica S. A.** Antes da dosagem de cada analito foram empregados substâncias padrão e controles para padronizar o equipamento e controlar as corridas analíticas, respectivamente.

4.8.5. Leitor de Microplaca

Utilizou-se o leitor de microplaca ThermoPlate-Reader NM composto de 04 filtros de absorvância em 405, 450, 492 e 630nm.

4.9. Análise Estatística

Para a confecção de planilhas e para a realização dos testes estatísticos os dados foram analisados utilizando-se os programas **GraphPad Prism 5 for Windows Version 5.00, Microsoft® Office Excel® 2007 (12.0.6514.5000)** e **OriginPro® 8 SR0 v8.0724(B724)**. Os resultados foram apresentados de acordo com a média \pm erro padrão da média (EPM). Foram utilizados testes não-paramétricos. Para grupos independentes utilizou-se o teste de Mann-Whitney. As diferenças observadas durante a análise foram consideradas estatisticamente significativas quando a probabilidade encontrada foi menor que 0,05 (5%). O valo de p designa o valor da probabilidade (de zero a um) de se obter o efeito observado, dado que a hipótese nula é verdadeira.

5. RESULTADOS

5.1. Validação do modelo experimental ovariectomizado

É sabido que a remoção cirúrgica dos ovários em animais de laboratório mimetiza o fenômeno da menopausa em mulheres, sendo largamente utilizado para a investigação dos efeitos biológicos da falta dos hormônios sexuais femininos (HSFs) em mamíferos. Contudo, como todo processo cirúrgico experimental, este procedimento deve ser validado. Portanto, a fim de se verificar a eficácia da OVX realizou-se uma série de experimentos para comprovar o procedimento cirúrgico bem como os efeitos fisiológicos da baixa dos HSFs nos grupos experimentais. Analisaram-se, portanto, a redução no peso úmido dos úteros e a involução endometrial nos animais OVX, através da histomorfometria comparativa dos cornos uterinos extraídos após o sacrifício dos animais. Os cornos uterinos foram seccionados, corados, pesados e medições foram realizadas conforme descrito na seção materiais e métodos.

5.1.1. Mensuração dos níveis plasmáticos de 17 β -estradiol (E2), de 17-hidroxiprogesterona (P4) e de Testosterona

Sabe-se que os principais Hormônios Sexuais produzidos pelos ovários murinos são o 17 β -estradiol (E2) e a 17-hidroxiprogesterona (P4), com pequenas quantidades de androgênios secretadas, tais como a testosterona e a androstenediona. A figura 11 mostra os dados referentes aos valores plasmáticos mensurados, pós-sacrifício, de 17 β -estradiol (E2) de animais que foram ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. O teste *t de Student* demonstrou que houve uma diminuição significativa dos níveis plasmáticos de E2 nos grupos C57 OVX ($p < 0,0001$) e APOE OVX ($p < 0,0001$) quando comparados aos controles C57 SHAM e APOE SHAM, respectivamente.

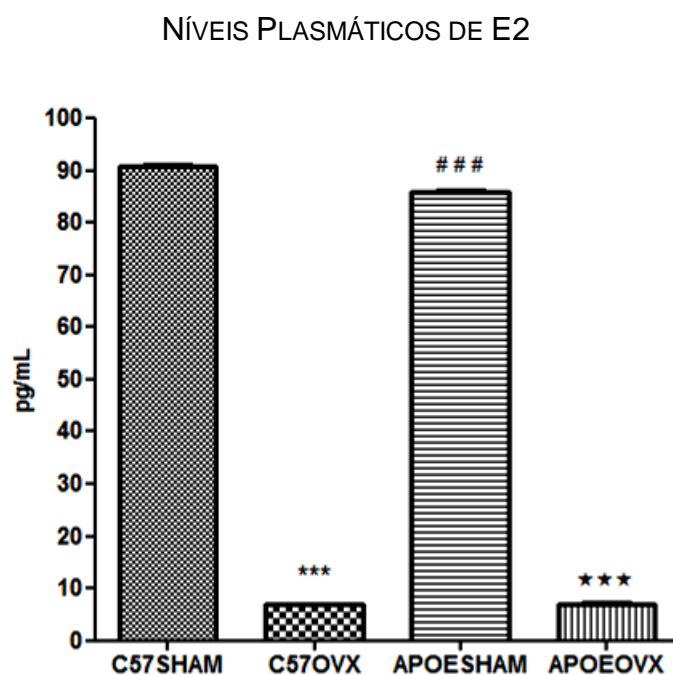


Figura 11: Valores plasmáticos de 17 β -estradiol (E2) de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em pg/mL, representam a média \pm EPM ($n = 4$ por grupo). *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle C57 SHAM; ### $p < 0,0001$ comparado ao grupo C57 SHAM; *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle APOE SHAM. Utilizou-se teste *t de Student* não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

A figura 12 mostra os dados referentes aos valores plasmáticos mensurados, pós-sacrifício, de 17-hidroxiprogesterona (P4) de animais que foram ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. O teste *t* de Student demonstrou que houve uma diminuição significativa dos níveis plasmáticos de P4 nos grupos C57 OVX ($p < 0,0001$) e APOE OVX ($p < 0,0001$) quando comparados aos controles C57 SHAM e APOE SHAM, respectivamente.

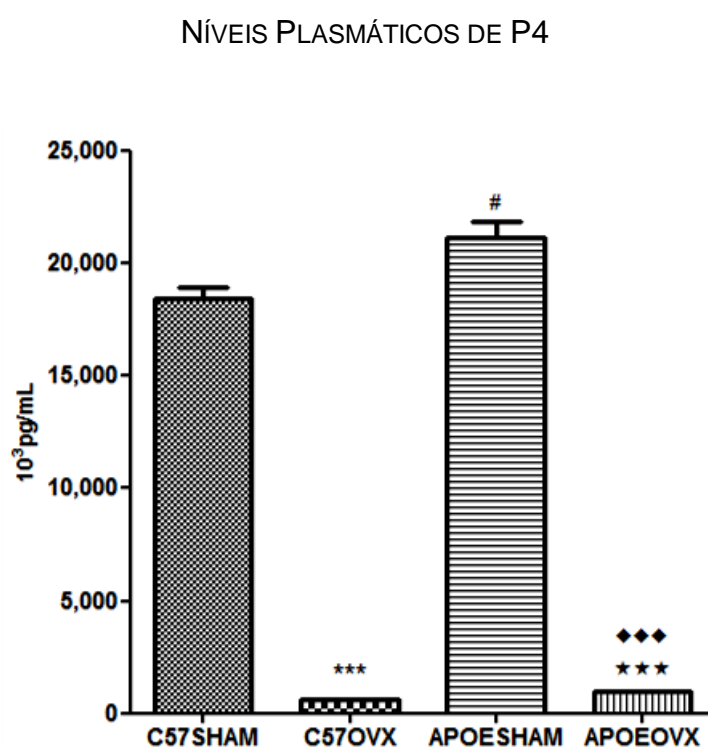


Figura 12: Valores plasmáticos de 17-hidroxiprogesterona (P4) de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em pg/mL, representam a média \pm EPM ($n = 4$ por grupo). *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle C57 SHAM; # $p = 0,0224$ comparado ao grupo C57 SHAM; ◆◆◆ $p < 0,0001$ comparado ao grupo C57 OVX; *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle APOE SHAM. Utilizou-se teste *t* de Student não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

A figura 13 mostra os dados referentes aos valores plasmáticos mensurados, pós-sacrifício, de testosterona dos animais submetidos à ovariectomia/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. O teste *t de Student* demonstrou que houve uma diminuição significativa dos níveis plasmáticos de testosterona nos grupos C57 OVX ($p < 0,0001$) e APOE OVX ($p < 0,0001$) quando comparados aos controles C57 SHAM e APOE SHAM, respectivamente.

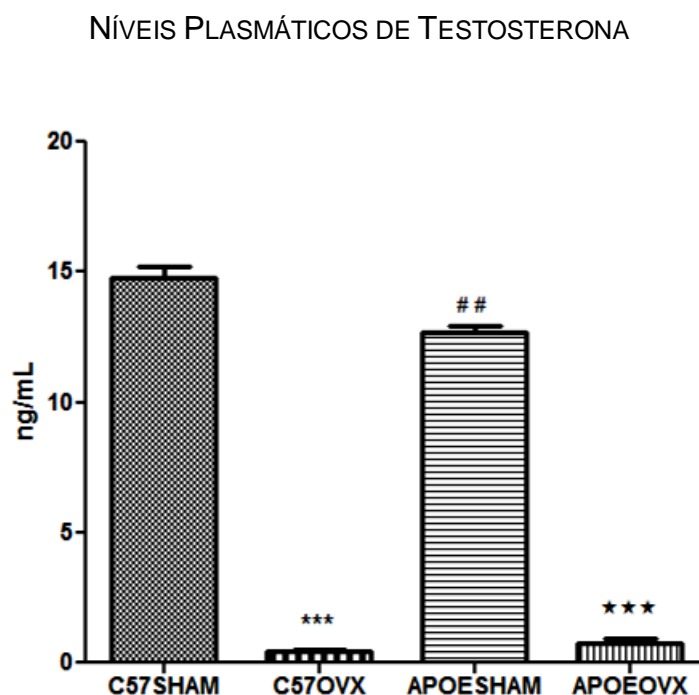


Figura 13: Valores plasmáticos de testosterona de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em ng/mL, representam a média \pm EPM ($n = 4$ por grupo). *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle C57 SHAM; ## $p = 0,0075$ comparado ao grupo C57 SHAM; *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle APOE SHAM. Utilizou-se teste *t de Student* não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

5.1.2. Efeitos Sistêmicos da Baixa Hormonal na OVX: Involução Uterina e Queda na Densidade Mineral Óssea (DMO)

A figura 14 e a tabela 6 mostram os dados referentes ao peso úmido dos úteros e dos cornos uterinos extraídos de animais que foram ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. O teste *t de Student* mostrou que tanto os animais do grupo C57 OVX quanto os do grupo ApoE OVX apresentaram uma redução significativa do peso úmido uterino ($p < 0,001$; $p = 0,0120$, respectivamente) em comparação aos grupos controle C57 SHAM e ApoE SHAM, respectivamente. É importante salientar que ao aplicar o teste *t de Student* nos resultados apurados dos pesos úmidos dos úteros dos animais dos grupos C57 SHAM e ApoE SHAM houve uma redução significativa deste parâmetro nos animais do grupo ApoE ($p = 0,0011$).

PESO ÚMIDO DOS ÚTEROS E DOS CORNOS UTERINOS

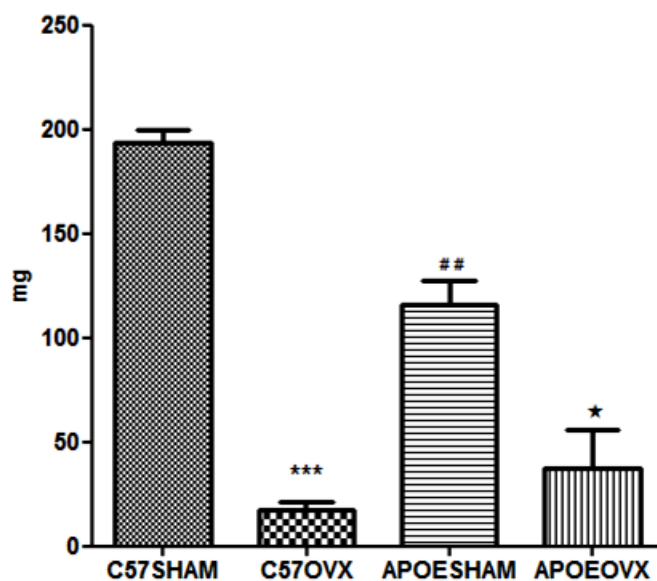
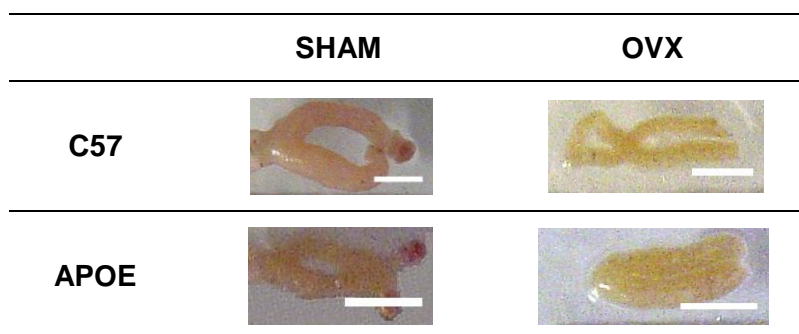


Figura 14: Peso úmido dos úteros e dos cornos uterinos de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em miligramas (mg), representam a média \pm EPM ($n = 7$ por grupo). *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle C57 SHAM; ## $p = 0,0011$ comparado ao grupo C57 SHAM; * $p = 0,0120$ comparado ao grupo controle APOE SHAM. Utilizou-se teste *t de Student* não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

TABELA 6
PRANCHA DOS CORNOS UTERINOS EXTRAÍDOS AOS OITO MESES DE VIDA



Barra de escala: 5 mm

A figura 15 mostra os dados referentes aos valores mensurados do endométrio de animais que foram ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Ao aplicar o teste *t de Student* observou-se uma diminuição significativa do tamanho linear do endométrio em animais ovariectomizados, C57 OVX ($p < 0,01$) e APOE OVX ($p < 0,05$), quando comparados aos respectivos controles.

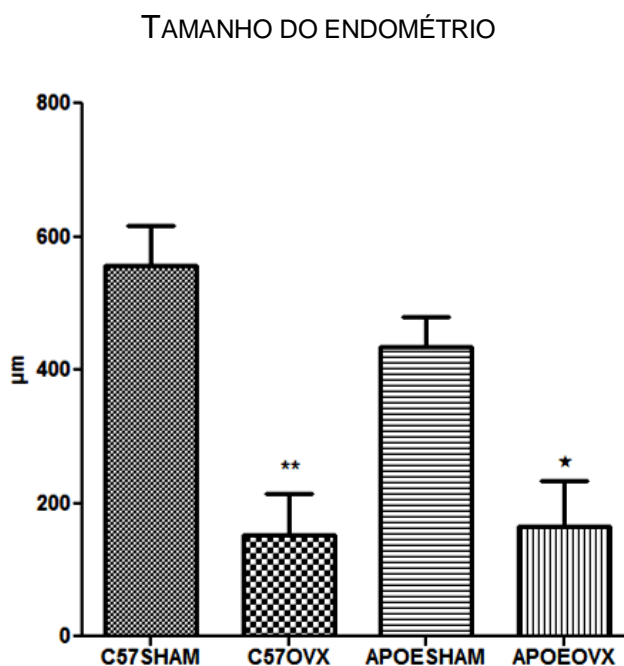


Figura 15: Medidas lineares do endométrio de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em micrômetros (μm), representam a média \pm EPM ($n = 7$ por grupo). ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle C57 SHAM; * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle APOE SHAM. Utilizou-se teste *t de Student* não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

A análise histomorfométrica também compreendeu a mensuração da área, do diâmetro (maior e menor) e do miométrio de seções do útero/cornos uterinos conforme previamente já exposto. Ao analisar os valores morfométricos dos animais OVX frente aos animais controles SHAM observou-se que há uma diminuição significativa de todos os valores dos parâmetros avaliados principalmente no que tange à área do corno uterino e ao endométrio, sendo este de fundamental importância para o desenvolvimento do trabalho proposto (figura 16). Contudo, conforme tabelas 7 e 8, os valores de miométrio vistos em camundongos APOE OVX não foram significativos quando comparados aos seus respectivos controles SHAM.

TABELA 7
VALORES MÉDIOS \pm EPM DOS PADRÕES MÉTRICOS MENSURADOS NA ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS CORNOS UTERINOS

	C57		APOE	
	<i>SHAM</i>	<i>OVX</i>	<i>SHAM</i>	<i>OVX</i>
Área do Corno Uterino ($10^6\mu\text{m}^2$)	2,53 $\pm 0,21$	0,61 $\pm 0,18$	2,42 $\pm 0,26$	0,89 $\pm 0,49$
Porção Maior do Diâmetro do Corno Uterino ($10^4\mu\text{m}$)	0,2204 $\pm 0,0073$	0,1047 $\pm 0,0209$	181,73 $\pm 65,87$	0,1020 $\pm 0,0254$
Porção Menor do Diâmetro do Corno Uterino ($10^4\mu\text{m}$)	0,1341 $\pm 0,0083$	0,0590 $\pm 0,0111$	0,1403 $\pm 0,0051$	0,0735 $\pm 0,0259$
Miométrio ($10^2\mu\text{m}$)	2,07 $\pm 0,33$	0,90 $\pm 0,22$	3,49 $\pm 0,71$	1,73 $\pm 0,19$
Endométrio ($10^2\mu\text{m}$)	5,56 $\pm 0,59$	1,52 $\pm 0,62$	4,34 $\pm 0,45$	1,65 $\pm 0,68$

TABELA 8

VALORES DE p DOS PADRÕES MÉTRICOS UTILIZADOS PARA A ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS CORNOS UTERINOS

	SHAM versus OVX		C57 versus APOE	
	C57	APOE	SHAM	OVX
Área do Corno Uterino	0,0005	0,0341	0,7446 ^{ns}	0,6141 ^{ns}
Porção Maior do Diâmetro do Corno Uterino	0,0020	0,0330	0,0331	0,9362 ^{ns}
Porção Menor do Diâmetro do Corno Uterino	0,0017	0,0449	0,5464 ^{ns}	0,6269 ^{ns}
Miométrio	0,0261	0,0566 ^{ns}	0,1235 ^{ns}	0,0306
Endométrio	0,0034	0,0170	0,1547 ^{ns}	0,8942 ^{ns}

PRANCHA DE SEÇÕES DOS CORNOS UTERINOS

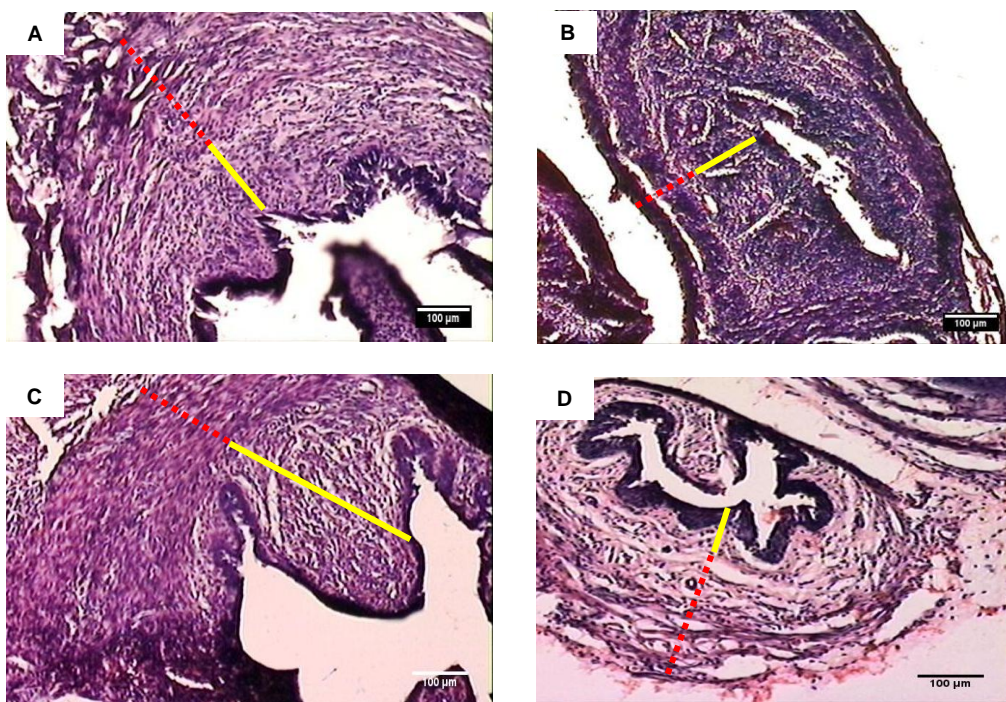


Figura 16: Imagens representativas de seções dos cornos uterinos em plano coronal coradas por hematoxilina e eosina. Barras vermelhas pontilhadas representam o miométrio e barras amarelas contínuas mostram o endométrio. A: C57 SHAM; B: C57 OVX; C: APOE SHAM; D: APOE OVX (n= 7 por grupo). Magnificação de 100X. Barra de escala: 100μm.

Estudos realizados pelo LBCE demonstram que a OVX também promove a queda da densidade mineral óssea, conforme figura 17, reiterando o efeito fisiológico dos estrógenos sob diferentes tecidos e corroborando para a escolha do modelo utilizado neste trabalho (Bortoli et al., 1996).

Nota 1: Na execução deste projeto não foram realizadas análises de DMO nos animais utilizados. Os dados apresentados referem-se às análises conduzidas anteriormente no LBCE. A DMO foi determinada pelo exame de absorciometria por dupla emissão de raio X (*Dual-energy X-ray Absorptiometry - DXA*) (Discovery 4500A, Hologic) realizado em uma sala específica de exames do Centro de Diagnóstico e Pesquisa de Osteoporose do Espírito Santo (CEDOES). Os esqueletos eram visualizados tridimensionalmente através de *software* Discovery 12.4 e analisados com o programa APEX 13.0 pelo Dr. Sérgio Ragi Eis.

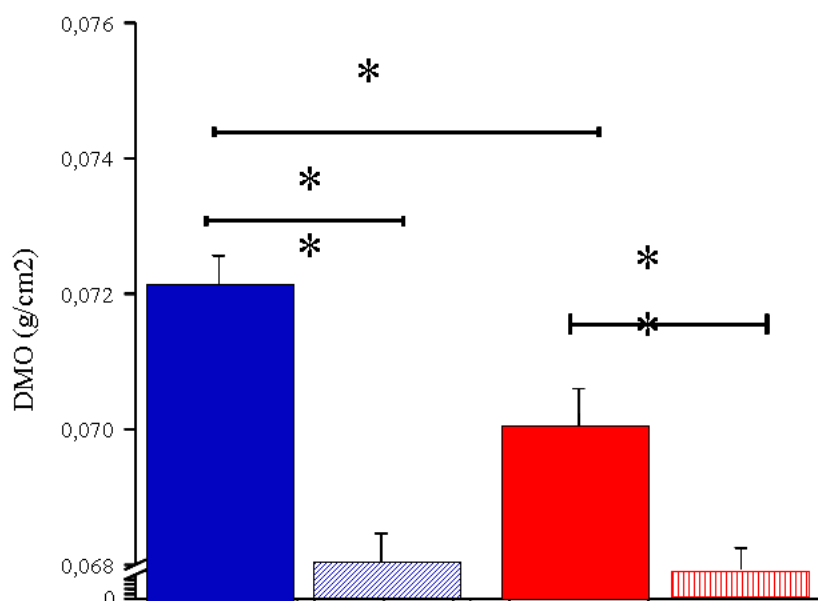


Figura 17: Efeito da ovariectomia (OVX) nos animais APOEKO e WT. Em preto cheio os animais WT SHAM-operados e, em caixa preta hachurada, e os animais WT OVX. Percebe-se claramente um decréscimo - estatisticamente significativo - depois da OVX no animais WT. Os animais APOEKO (caixas vermelhas cheia ou hachuradas) não apresentam decréscimo da DMO após OVX. Contudo, esta diferença é significativa quando comparados WT OVX e APOEKO OVX ($n = 5$, $p < 0,05$). * Estatisticamente significativo quando comparado inter-grupos. ** Estatisticamente significativo quando intra-grupos.

5.2. Dosagens Bioquímicas

5.2.1. Mensuração da concentração plasmática de Glicose

A figura 18 demonstra as concentrações plasmáticas mensuradas, pós-sacrifício, de Glicose dos animais submetidos à ovariectomia/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. O teste *t de Student* revelou que houve um aumento significativo dos níveis plasmáticos de Glicose no grupo C57 OVX quando comparado ao grupo controle C57 SHAM ($p=0,0058$).

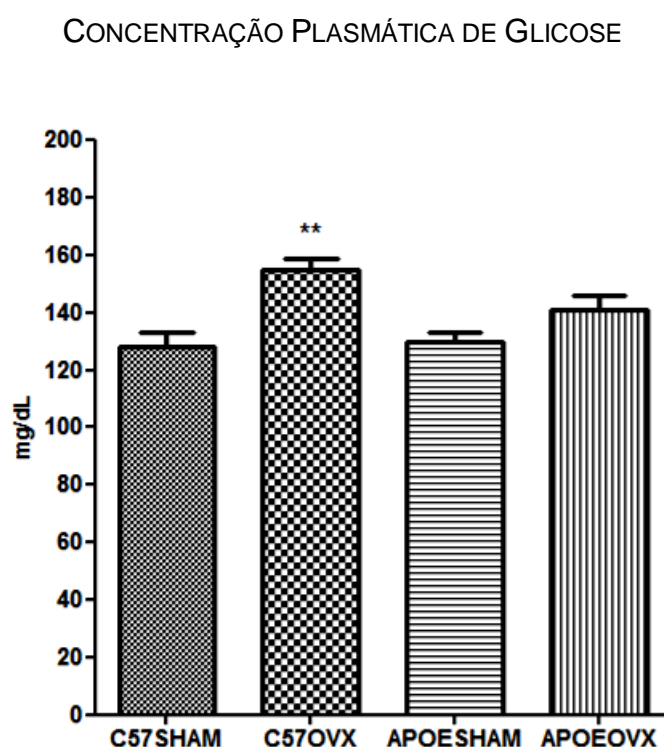


Figura 18: Níveis plasmáticos de Glicose de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em mg/dL, representam a média \pm EPM ($n= 4$ por grupo). ** $p=0,0058$ comparado ao grupo controle C57 SHAM. Utilizou-se teste *t de Student* não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

5.2.2. Mensuração da concentração plasmática de Colesterol Total

A figura 19 demonstra as concentrações plasmáticas mensuradas, pós-sacrifício, de Colesterol Total dos animais submetidos à ovariectomia/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. O teste *t de Student* revelou que tanto os animais do grupo C57 OVX quanto os do grupo ApoE OVX apresentaram um aumento significativo da concentração plasmática de Colesterol Total ($p < 0,0001$; $p = 0,0003$, respectivamente) em comparação aos grupos controle C57 SHAM e ApoE SHAM, respectivamente.

CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE COLESTEROL TOTAL

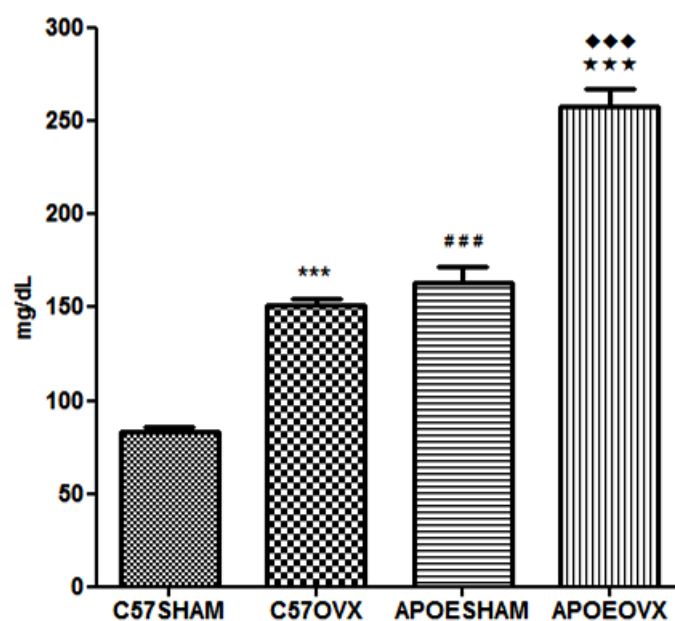


Figura 19: Níveis plasmáticos de Colesterol Total de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em mg/dL, representam a média \pm EPM ($n = 4$ por grupo). *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle C57 SHAM; ### $p < 0,0001$ comparado ao grupo C57 SHAM; ◆◆◆ $p = 0,0003$ comparado ao grupo C57 OVX; *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle APOE SHAM. Utilizou-se teste *t de Student* não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

5.2.3. Mensuração da concentração plasmática de Triglicerídeos

A figura 20 demonstra as concentrações plasmáticas mensuradas, pós-sacrifício, de Triglicerídeos dos animais submetidos à ovariectomia/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. O teste *t de Student* revelou que tanto os animais do grupo C57 OVX quanto os do grupo ApoE OVX apresentaram um aumento significativo da concentração plasmática de Triglicerídeos ($p=0,0002$; $p=0,0090$, respectivamente) em comparação aos respectivos grupos controle C57 SHAM e ApoE SHAM.

CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TRIGLICERÍDEOS

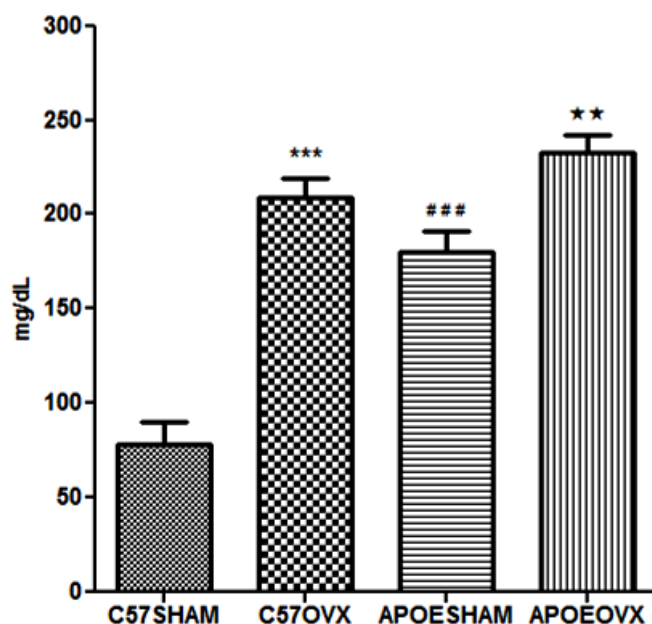


Figura 20: Níveis plasmáticos de Triglicerídeos de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em mg/dL, representam a média \pm EPM ($n= 4$ por grupo). *** $p=0,0002$ comparado ao grupo controle C57 SHAM; ### $p=0,0007$ comparado ao grupo C57 SHAM; ** $p=0,0090$ comparado ao grupo controle APOE SHAM. Utilizou-se teste *t de Student* não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

5.2.4. Mensuração da concentração plasmática de c-HDL

A figura 21 demonstra as concentrações plasmáticas mensuradas, pós-sacrifício, de c-HDL dos animais submetidos à ovariectomia/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Ao aplicar o teste *t de Student* notou-se que ambos os animais do grupo C57 OVX e do grupo ApoE OVX apresentaram um aumento significativo da concentração plasmática de c-HDL ($p=0,0011$; $p=0,0017$, respectivamente) em comparação aos respectivos grupos controle C57 SHAM e ApoE SHAM.

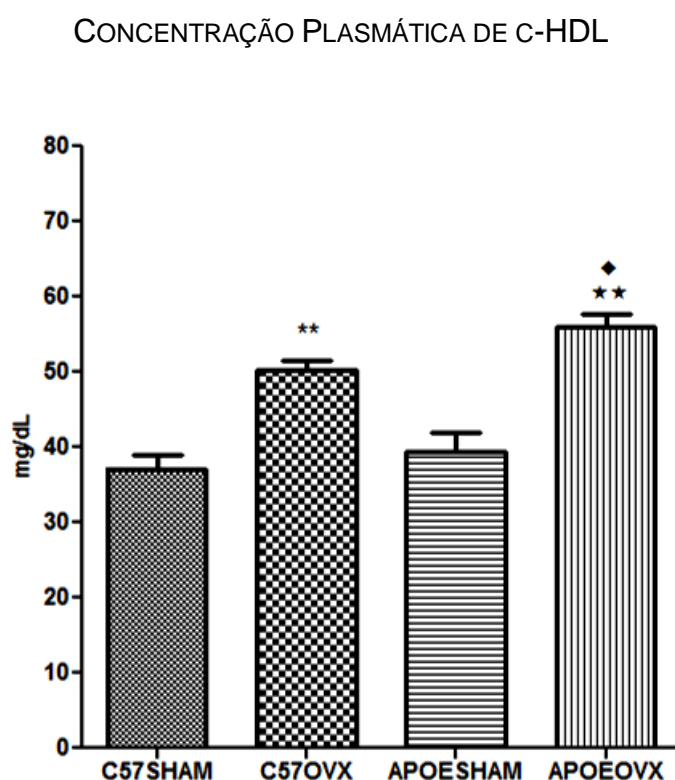


Figura 21: Níveis plasmáticos de c-HDL de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em mg/dL, representam a média \pm EPM ($n= 4$ por grupo). ** $p=0,0011$ comparado ao grupo controle C57 SHAM; * $p=0,0422$ comparado ao grupo C57 OVX; ** $p=0,0017$ comparado ao grupo controle APOE SHAM. Utilizou-se teste *t de Student* não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

5.2.5. Mensuração da concentração plasmática de LDL

A figura 22 demonstra as concentrações plasmáticas, pós-sacrifício, de LDL dos animais submetidos à ovariectomia/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores foram obtidos indiretamente pela aplicação da equação de Friedewald para concentrações de triglicerídeos inferiores a 400 mg/dL. Ao executar o teste *t* de Student observou-se que ambos os animais do grupo C57 OVX e do grupo ApoE OVX apresentaram um aumento significativo da concentração plasmática de LDL ($p=0,0056$; $p=0,0035$, respectivamente) em comparação aos respectivos grupos controle C57 SHAM e ApoE SHAM.

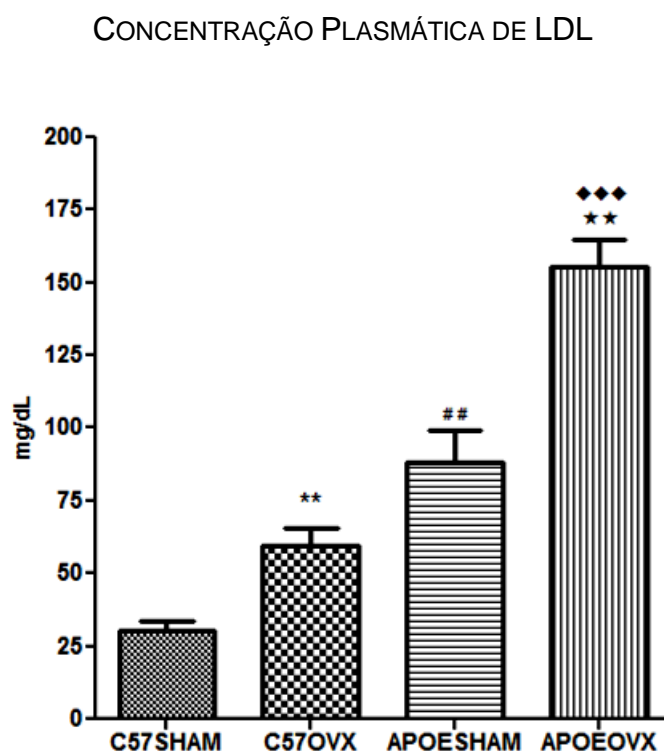


Figura 22: Níveis plasmáticos de LDL de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em mg/dL, representam a média \pm EPM ($n=4$ por grupo). ** $p=0,0056$ comparado ao grupo controle C57 SHAM; ## $p=0,0022$ comparado ao grupo C57 SHAM; *** $p=0,0001$ comparado ao grupo C57 OVX; ** $p=0,0035$ comparado ao grupo controle APOE SHAM. Utilizou-se teste *t* de Student não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

5.2.6. Mensuração da concentração plasmática de VLDL

A figura 23 demonstra as concentrações plasmáticas, pós-sacrifício, de VLDL dos animais submetidos à ovariectomia/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores foram obtidos indiretamente pela aplicação da equação de Friedewald para concentrações de triglicerídeos inferiores a 400 mg/dL. Ao executar o teste *t* de Student observou-se que ambos os animais do grupo C57 OVX e do grupo ApoE OVX apresentaram um aumento significativo da concentração plasmática de VLDL ($p=0,0002$; $p=0,0090$, respectivamente) em comparação aos respectivos grupos controle C57 SHAM e ApoE SHAM.

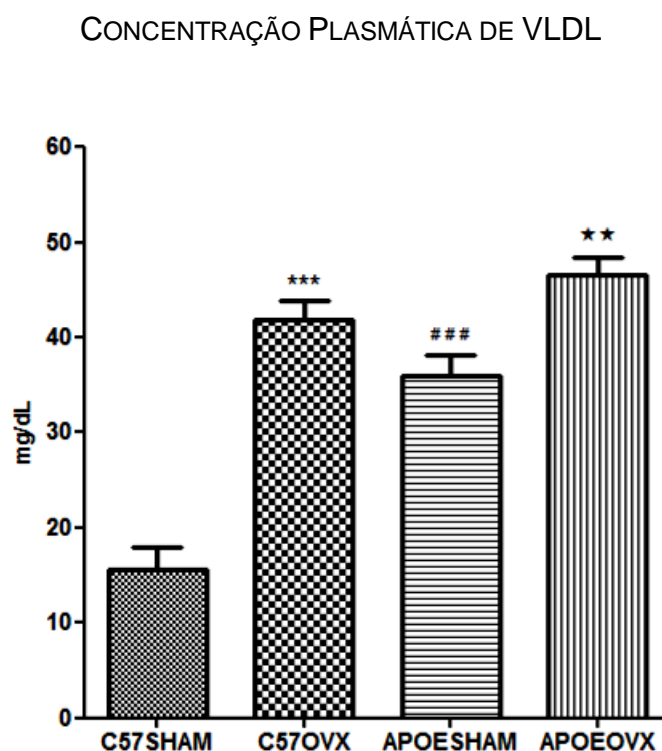


Figura 23: Níveis plasmáticos de VLDL de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em mg/dL, representam a média \pm EPM ($n= 4$ por grupo). *** $p=0,0002$ comparado ao grupo controle C57 SHAM; ### $p=0,0007$ comparado ao grupo C57 SHAM; ** $p=0,0090$ comparado ao grupo controle APOE SHAM. Utilizou-se teste *t* de Student não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

5.3. Quantificação de Proteínas por meio de ELISA

5.3.1. Mensuração das concentrações plasmáticas da proteína β A, proteína Tau Total e proteína Tau [pS199].

A figura 24 demonstra as concentrações plasmáticas, pós-sacrifício, de **proteína β A** dos animais submetidos à ovariectomia/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. O teste *t de Student* mostrou que ambos os animais do grupo C57 OVX e do grupo ApoE OVX apresentaram um aumento significativo da concentração plasmática de proteína β A ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$, respectivamente) em comparação aos respectivos grupos controle C57 SHAM e ApoE SHAM.

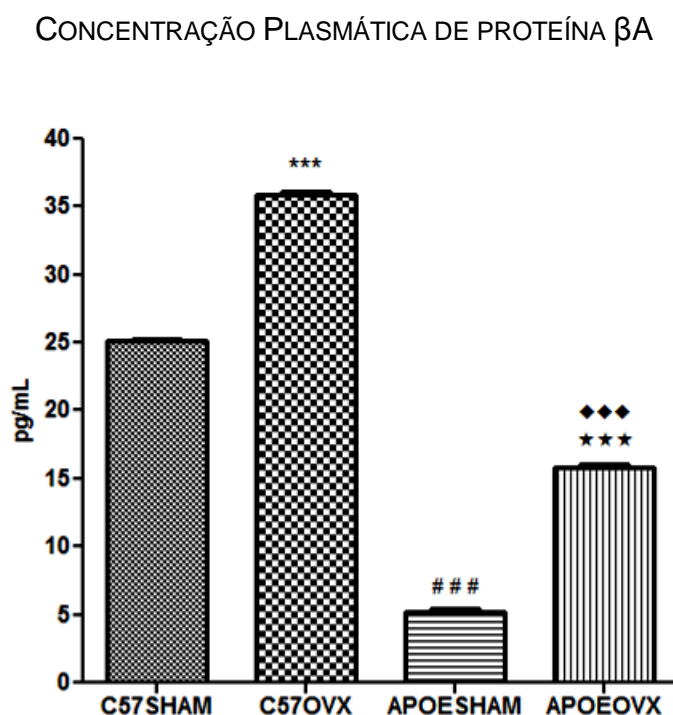


Figura 24: Níveis plasmáticos de proteína β A de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em pg/mL, representam a média \pm EPM ($n = 4$ por grupo). *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle C57 SHAM; ### $p < 0,0001$ comparado ao grupo C57 SHAM; **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo C57 OVX; *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle APOE SHAM. Utilizou-se teste *t de Student* não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

A figura 25 demonstra as concentrações plasmáticas, pós-sacrifício, de **proteína Tau Total** dos animais submetidos à ovariectomia/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. O teste *t* de Student mostrou que ambos os animais do grupo C57 OVX e do grupo ApoE OVX apresentaram um aumento significativo da concentração plasmática de proteína Tau Total ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$, respectivamente) em comparação aos respectivos grupos controle C57 SHAM e ApoE SHAM.

CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE PROTEÍNA TAU TOTAL

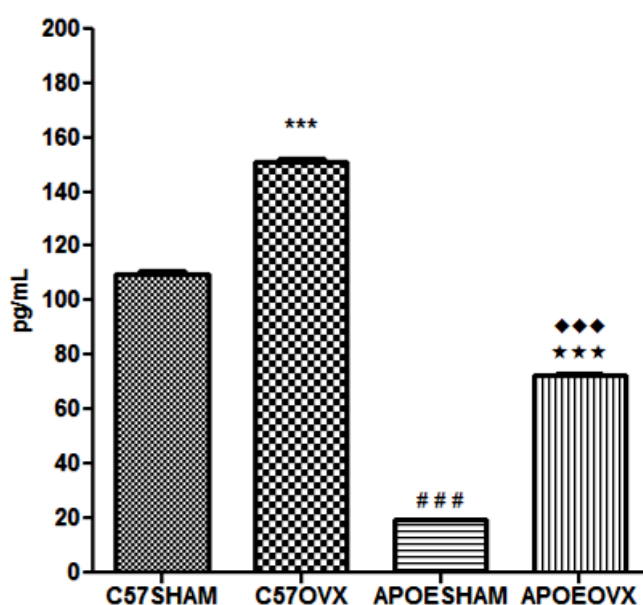


Figura 25: Níveis plasmáticos de proteína Tau Total de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em pg/dL, representam a média \pm EPM ($n = 4$ por grupo). *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle C57 SHAM; ### $p < 0,0001$ comparado ao grupo C57 SHAM; ◆◆ $p < 0,0001$ comparado ao grupo C57 OVX; *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle APOE SHAM. Utilizou-se teste *t* de Student não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

A figura 26 demonstra as concentrações plasmáticas, pós-sacrifício, de **proteína Tau [pS199]** dos animais submetidos à ovariectomia/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. O teste *t* de Student mostrou que ambos os animais do grupo C57 OVX e do grupo ApoE OVX apresentaram um aumento significativo da concentração plasmática de proteína Tau [pS199] ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$, respectivamente) em comparação aos respectivos grupos controle C57 SHAM e ApoE SHAM.

CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE PROTEÍNA TAU [pS199]

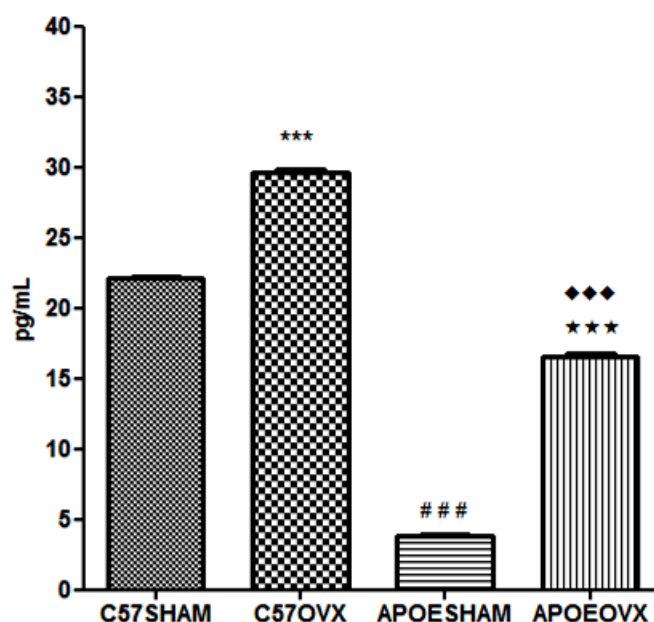


Figura 26: Níveis plasmáticos de proteína Tau [pS199] de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em pg/dL, representam a média \pm EPM ($n = 4$ por grupo). *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle C57 SHAM; ### $p < 0,0001$ comparado ao grupo C57 SHAM; ◆◆◆ $p < 0,0001$ comparado ao grupo C57 OVX; *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle APOE SHAM. Utilizou-se teste *t* de Student não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

5.3.2. Mensuração das concentrações no extrato cerebral da proteína β A, proteína Tau Total e proteína Tau [pS199].

A figura 27 demonstra as concentrações no extrato cerebral de **proteína β A** dos animais submetidos à ovariectomia/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. O teste *t de Student* mostrou que ambos os animais do grupo C57 OVX e do grupo ApoE OVX apresentaram um aumento significativo da concentração de proteína β A ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$, *respectivamente*) em comparação aos respectivos grupos controle C57 SHAM e ApoE SHAM.

CONCENTRAÇÃO NO EXTRATO CEREBRAL DE PROTEÍNA β A

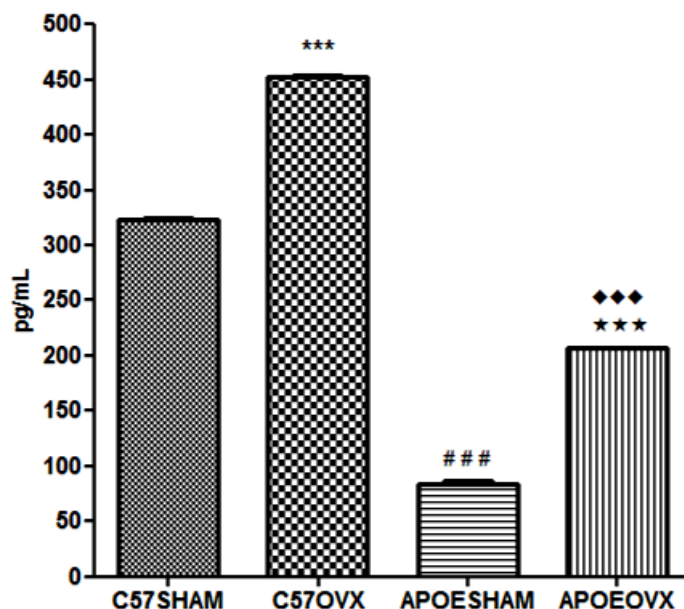


Figura 27: Concentração, no extrato cerebral, de proteína β A de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em pg/mL, representam a média \pm EPM ($n = 4$ por grupo). *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle C57 SHAM; ### $p < 0,0001$ comparado ao grupo C57 SHAM; **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo C57 OVX; *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle APOE SHAM. Utilizou-se teste *t de Student* não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

A figura 28 demonstra as concentrações no extrato cerebral de **proteína Tau Total** dos animais submetidos à ovariectomia/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. O teste *t de Student* mostrou que ambos os animais do grupo C57 OVX e do grupo ApoE OVX apresentaram um aumento significativo da concentração de proteína Tau Total ($p=0,0012$; $p<0,0001$, respectivamente) em comparação aos respectivos grupos controle C57 SHAM e ApoE SHAM.

CONCENTRAÇÃO NO EXTRATO CEREBRAL DE PROTEÍNA TAU TOTAL

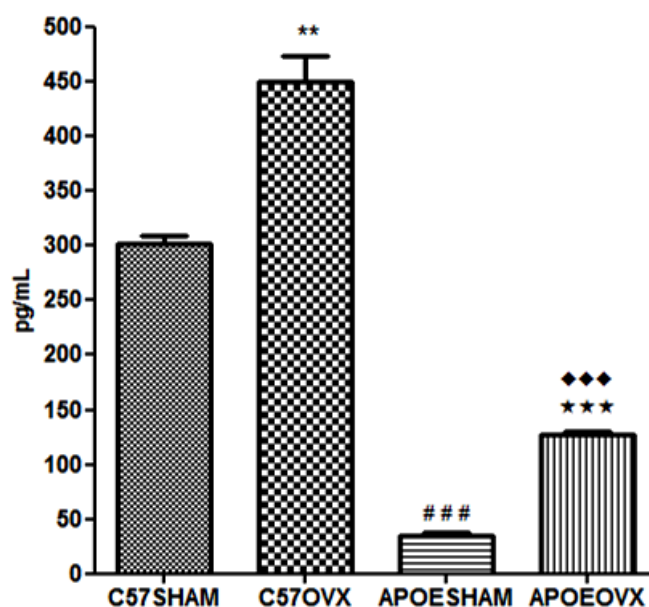


Figura 28: Concentração, no extrato cerebral, de proteína Tau Total de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em pg/mL, representam a média \pm EPM ($n= 4$ por grupo). ** $p=0,0012$ comparado ao grupo controle C57 SHAM; ### $p<0,0001$ comparado ao grupo C57 SHAM; **** $p<0,0001$ comparado ao grupo C57 OVX; *** $p<0,0001$ comparado ao grupo controle APOE SHAM. Utilizou-se teste *t de Student* não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

A figura 29 demonstra as concentrações no extrato cerebral de **proteína Tau [pS199]** dos animais submetidos à ovariectomia/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. O teste *t de Student* mostrou que ambos os animais do grupo C57 OVX e do grupo ApoE OVX apresentaram um aumento significativo da concentração de proteína Tau [pS199] ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$, respectivamente) em comparação aos respectivos grupos controle C57 SHAM e ApoE SHAM.

CONCENTRAÇÃO NO EXTRATO CEREBRAL DE PROTEÍNA TAU [pS199]

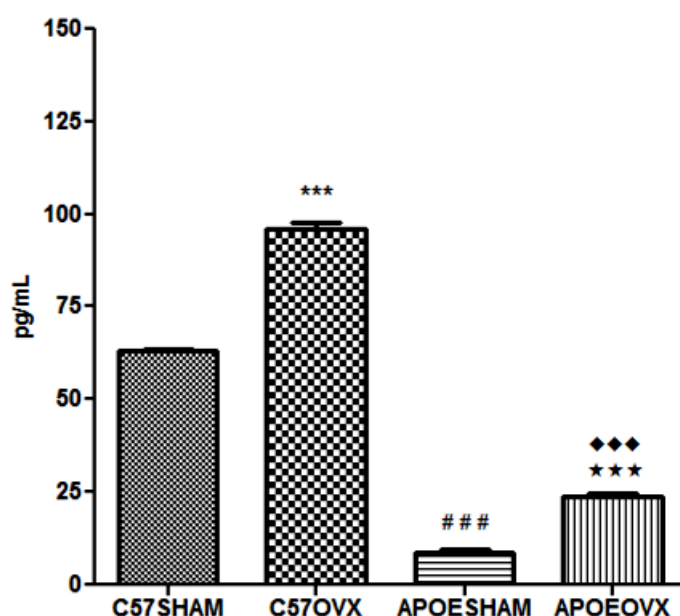


Figura 29: Concentração, no extrato cerebral, de proteína Tau [pS199] de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em pg/mL, representam a média \pm EPM ($n = 4$ por grupo). *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle C57 SHAM; ### $p < 0,0001$ comparado ao grupo C57 SHAM; **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo C57 OVX; *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle APOE SHAM. Utilizou-se teste *t de Student* não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

5.3.3. Mensuração das concentrações da proteína β A, proteína Tau Total e proteína Tau [pS199] em urina de 24H

A figura 30 demonstra as concentrações em urina de 24H de **proteína β A** dos animais submetidos à ovariectomia/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. O teste *t de Student* mostrou que ambos os animais do grupo C57 OVX e do grupo ApoE OVX apresentaram um aumento significativo da concentração de proteína β A ($p=0,0011$; $p<0,0001$, *respectivamente*) em comparação aos respectivos grupos controle C57 SHAM e ApoE SHAM.

CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA β A EM URINA DE 24H

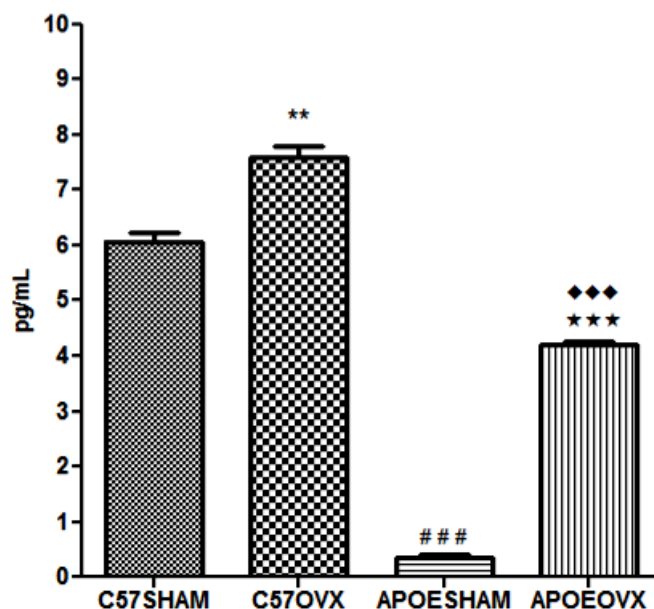


Figura 30: Concentração, em urina de 24H, de proteína β A de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em pg/mL, representam a média \pm EPM ($n= 4$ por grupo). ** $p=0,0011$ comparado ao grupo controle C57 SHAM; ### $p<0,0001$ comparado ao grupo C57 SHAM; **** $p<0,0001$ comparado ao grupo C57 OVX; *** $p<0,0001$ comparado ao grupo controle APOE SHAM. Utilizou-se teste *t de Student* não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

A figura 31 demonstra as concentrações em urina de 24hs de **proteína Tau Total** dos animais submetidos à ovariectomia/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. O teste *t de Student* mostrou que ambos os animais do grupo C57 OVX e do grupo ApoE OVX apresentaram um aumento significativo da concentração de proteína Tau Total ($p < 0,0001$; $p = 0,0006$, respectivamente) em comparação aos respectivos grupos controle C57 SHAM e ApoE SHAM.

CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TAU TOTAL EM URINA DE 24H

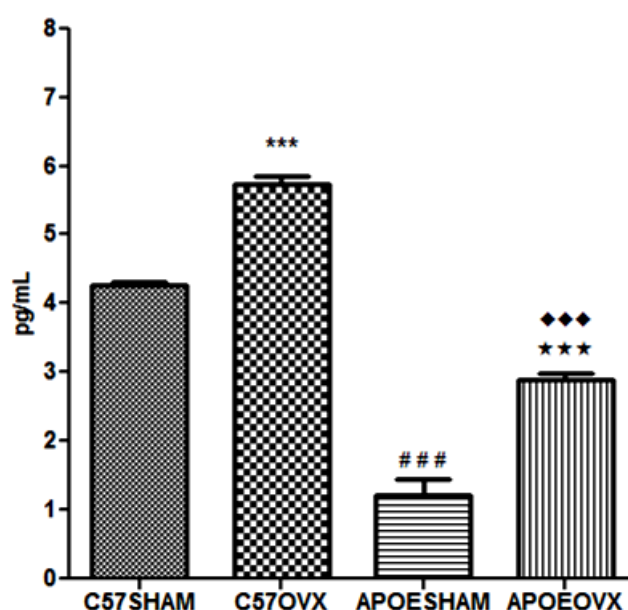


Figura 31: Concentração, em urina de 24H, de proteína Tau Total de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em pg/mL, representam a média \pm EPM ($n = 4$ por grupo). *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle C57 SHAM; ### $p < 0,0001$ comparado ao grupo C57 SHAM; *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo C57 OVX; *** $p = 0,0006$ comparado ao grupo controle APOE SHAM. Utilizou-se teste *t de Student* não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

A figura 32 demonstra as concentrações em urina de 24H de **proteína Tau [pS199]** dos animais submetidos à ovariectomia/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. O teste *t de Student* mostrou que ambos os animais do grupo C57 OVX e do grupo ApoE OVX apresentaram um aumento significativo da concentração de proteína Tau [pS199] ($p=0,0005$; $p=0,0031$, respectivamente) em comparação aos respectivos grupos controle C57 SHAM e ApoE SHAM.

CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TAU [pS199] EM URINA DE 24H

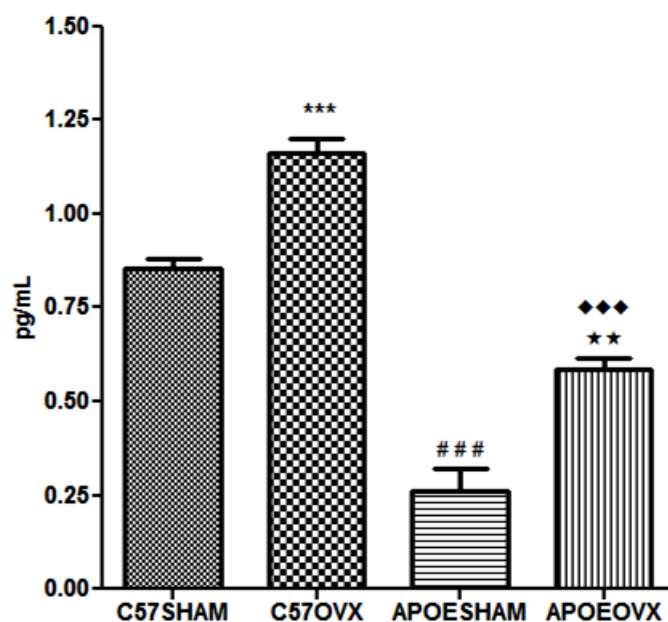


Figura 32: Concentração, em urina de 24H, de proteína Tau [pS199] de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em pg/mL, representam a média \pm EPM ($n=4$ por grupo). *** $p=0,0005$ comparado ao grupo controle C57 SHAM; ### $p<0,0001$ comparado ao grupo C57 SHAM; **** $p<0,0001$ comparado ao grupo C57 OVX; ** $p=0,0031$ comparado ao grupo controle APOE SHAM. Utilizou-se teste *t de Student* não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

5.3.4. Mensuração das concentrações da proteína BDNF no plasma e no extrato cerebral

A figura 33 demonstra as concentrações plasmáticas, pós-sacrifício, da proteína BDNF dos animais submetidos à ovariectomia/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. O teste *t de Student* mostrou que ambos os animais do grupo C57 OVX e do grupo ApoE OVX apresentaram um decréscimo significativo da concentração de proteína BDNF ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$, respectivamente) em comparação aos respectivos grupos controle C57 SHAM e ApoE SHAM.

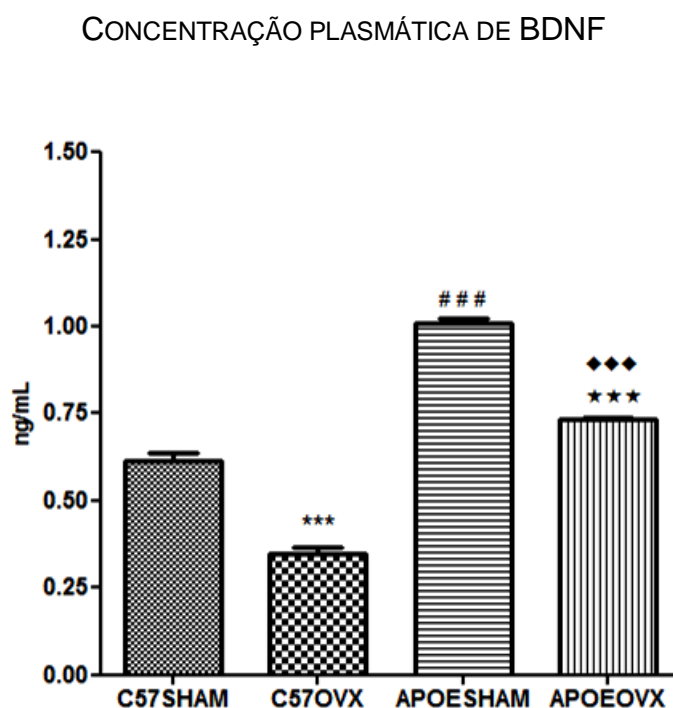


Figura 33: Concentração plasmática de proteína BDNF de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em ng/mL, representam a média \pm EPM ($n = 4$ por grupo). *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle C57 SHAM; ### $p < 0,0001$ comparado ao grupo C57 SHAM; ◆◆◆ $p < 0,0001$ comparado ao grupo C57 OVX; *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle APOE SHAM. Utilizou-se teste *t de Student* não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

A figura 34 demonstra as concentrações no extrato cerebral da proteína BDNF dos animais submetidos à ovariectomia/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. O teste *t de Student* mostrou que ambos os animais do grupo C57 OVX e do grupo ApoE OVX apresentaram um decréscimo significativo da concentração de proteína BDNF ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$, respectivamente) em comparação aos respectivos grupos controle C57 SHAM e ApoE SHAM.

CONCENTRAÇÃO DE BDNF NO EXTRATO CEREBRAL

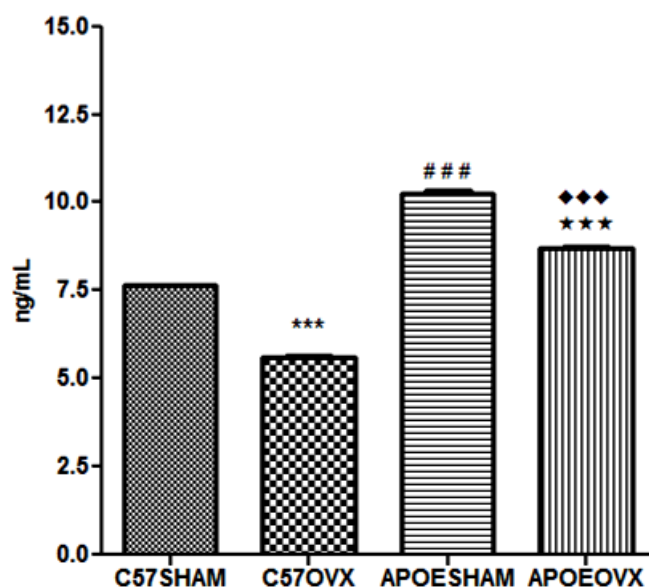


Figura 34: Concentração de proteína BDNF no extrato cerebral de camundongos ovariectomizados/sham-operados aos seis meses de vida e sacrificados aos oito meses de vida. Os valores, em ng/mL, representam a média \pm EPM ($n = 4$ por grupo). *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle C57 SHAM; ### $p < 0,0001$ comparado ao grupo C57 SHAM; ◆◆◆ $p < 0,0001$ comparado ao grupo C57 OVX; *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle APOE SHAM. Utilizou-se teste *t de Student* não pareado bi-caudal com intervalo de confiança de 95% e o teste de Mann-Whitney para grupos independentes.

5.4. Análise qualitativa de depósitos amilóides no tecido cerebral.

A presença ou a ausência de placas senis no tecido cerebral foi avaliada qualitativamente através das técnicas de Cajal, Bielschowsky e Tioflavina em seções de 10µm de espessura que estavam compreendidas entre 2,40mm e -2,40mm do Bregma (Figuras 35 e 36).

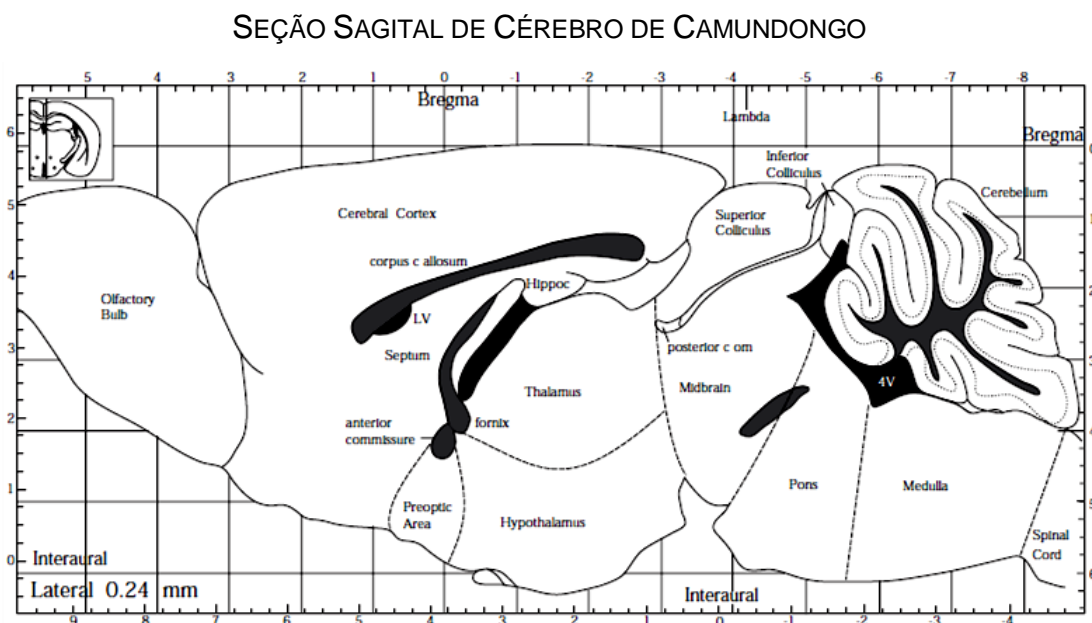


Figura 35: Esquema representativo de cérebro de camundongo em plano sagital a 0,24mm lateralmente à linha mediana. Os ventrículos estão em preto. As posições das marcas do Bregma, lambda e interaural estão indicadas. Linhas verticais e horizontais indicam a localização anteroposterior em relação ao plano coronal. (Paxinos & Franklin, 2001)

SEÇÃO CORONAL DE CÉREBRO DE CAMUNDONGO

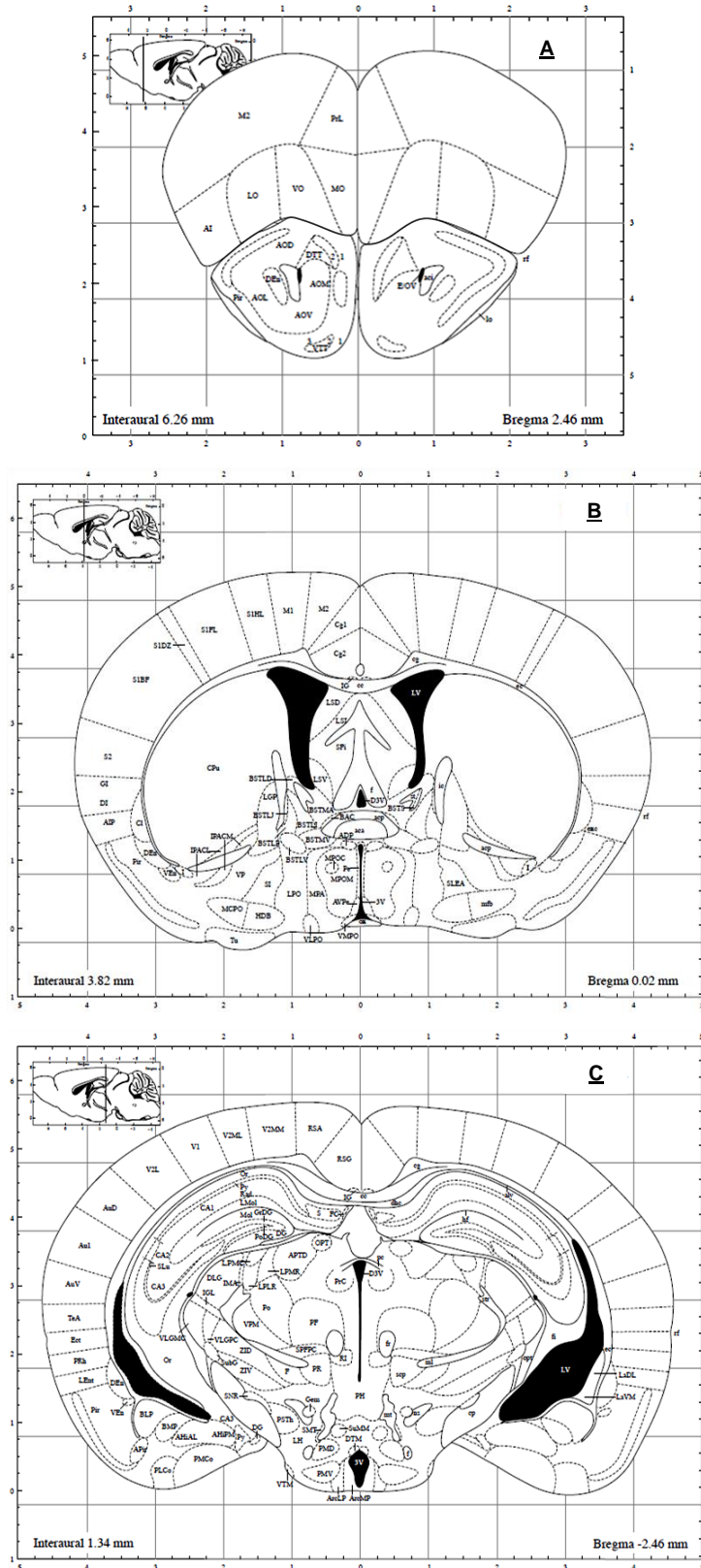


Figura 36: Esquema representativo de cérebro de camundongo em plano coronal à (A) 2,46mm, (B) 0,02mm e (C) -2,46mm do Bregma (Paxinos & Franklin, 2001).

Concomitantemente ao processamento histológico foram utilizados controles positivos (dados não mostrados) que se compunham de seções cerebrais obtidas de camundongos transgênicos para a PPA sacrificados aos oito meses. Sabe-se que estes camundongos exibem grandes quantidades de depósitos amilóides, sobretudo no hipocampo e no córtex cerebral (Borchelt et al., 1997).

Ao analisar os cortes histológicos obtidos observou-se que tampouco pela técnica de Cajal quanto pela técnica de Bielschowsky não houve a visualização da formação de depósitos amilóides conforme figuras 37 e 38.

Contudo ao submeter às seções com Tioflavina S observou-se que havia marcação fluorescente característica de depósito amilóide tanto no controle positivo (dados não mostrados) quanto nas amostras experimentais em nível de córtex cerebral e hipocampo conforme figura 39.

SEÇÕES DO CÓRTEX CEREBRAL E DO HIPOCAMPO CORADAS PELA TÉCNICA DE CAJAL

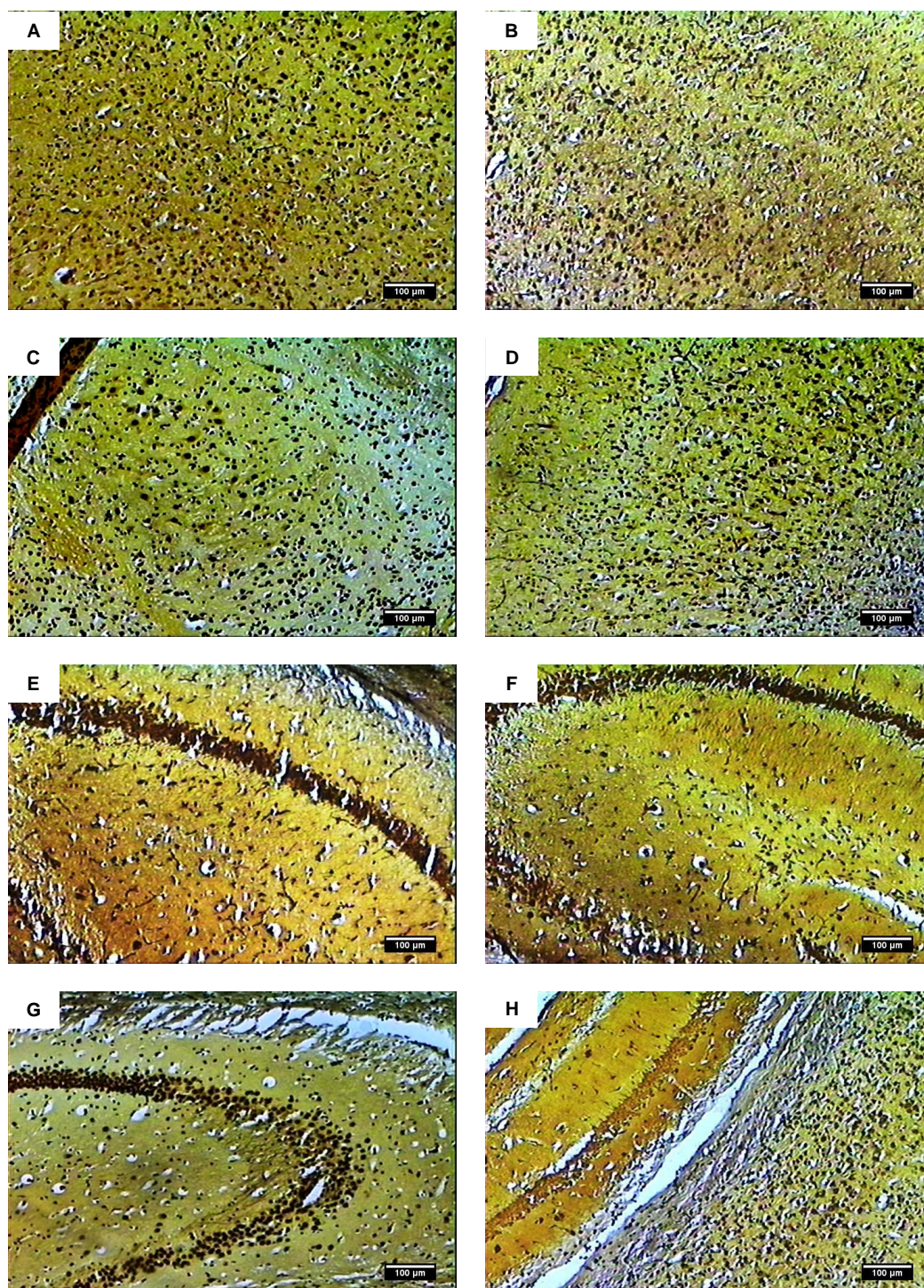


Figura 37: Imagens representativas de seções do córtex cerebral (A-D) e do hipocampo (E-H) em plano coronal coradas pela técnica de Cajal. A/E: C57 SHAM; B/F: C57 OVX; C/G: APOE SHAM; D/H: APOE OVX (n= 3 por grupo). Magnificação de 100X. Barra de escala: 100µm.

SEÇÕES DO CÓRTEX CEREBRAL E DO HIPOCAMPO CORADAS PELA TÉCNICA DE BIELSCHOWSKY

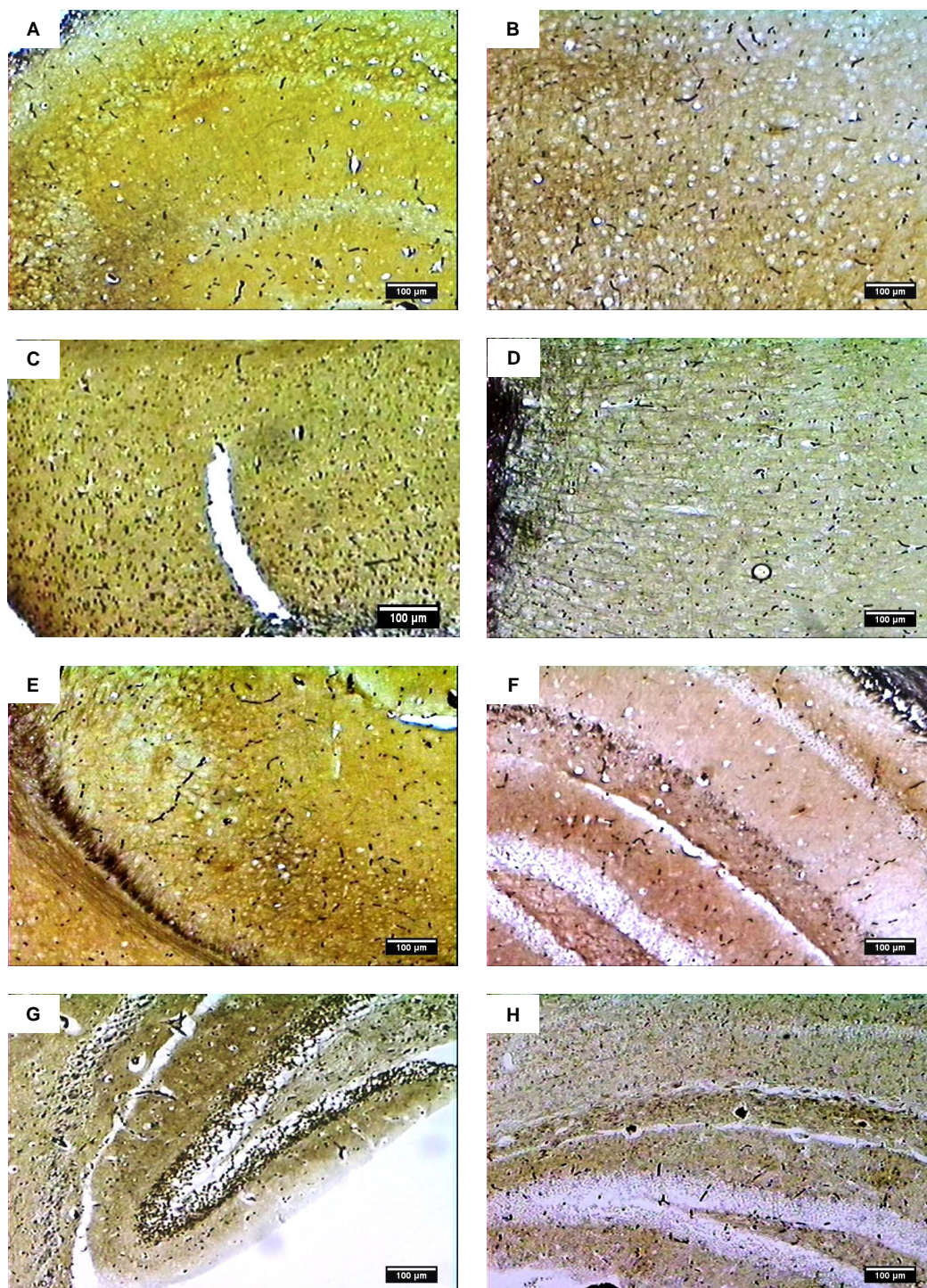


Figura 38: Imagens representativas de seções do córtex cerebral (A-D) e do hipocampo (E-H) em plano coronal coradas pela técnica de Bielschowsky. A/E: C57 SHAM; B/F: C57 OVX; C/G: APOE SHAM; D/H: APOE OVX (n= 3 por grupo). Magnificação de 100X. Barra de escala: 100µm.

SEÇÕES DO CÓRTEX CEREBRAL E DO HIPOCAMPO CORADAS COM TIOFLAVINA S

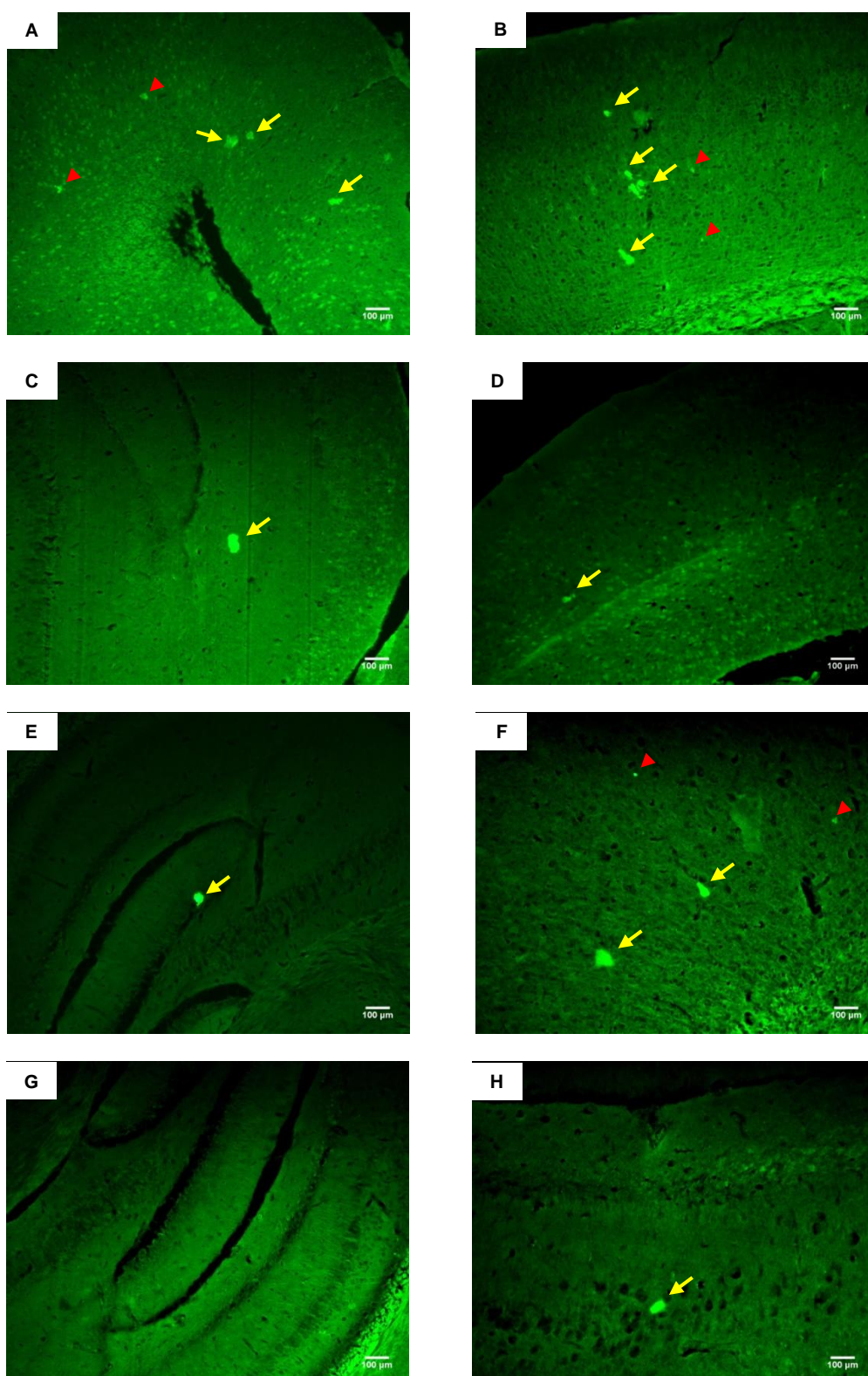


Figura 39: Imagens representativas de seções do córtex cerebral (A-D) e do hipocampo (E-H) em plano coronal coradas por Tioflavina S. Setas em amarelo mostram o depósito amilóide e setas em vermelho pontos inespecíficos fluorescentes. A/E: C57 SHAM; B/F: C57 OVX; C/G: APOE SHAM; D/H: APOE OVX (n= 3 por grupo). Magnificação de 153X. Barra de escala: 100μm.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo um fator crucial que precede a análise dos resultados obtidos é a comprovação de que os grupos de animais ovariectomizados mimetizavam, do ponto de vista histomorfofisiológico, a menopausa em mulheres. Portanto no que se refere à validação do modelo observou-se que primeiramente o peso úmido dos úteros e dos cornos uterinos de animais C57 e ApoE que foram ovariectomizados, reduziu significativamente em relação aos animais sham-operados. Estes dados em uma primeira análise sugerem que a ovariectomia promoveu a redução dos tecidos que revestem e compõem estas estruturas morfológicas. Sabe-se que o miométrio está envolvido na sustentação muscular da estrutura uterina e o endométrio na nidação do óvulo fecundado e também está susceptível diretamente à ação dos estrógenos. Assim os resultados histomorfológicos do presente trabalho demonstram que o tamanho linear do endométrio reduziu significativamente em ambos os animais C57 e ApoE. Isto ficou melhor evidenciado quando foram realizadas as dosagens das concentrações de E2 no plasma destes animais. Os níveis de E2 apresentaram uma redução significativa de aproximadamente nove vezes em animais ovariectomizados com relação aos sham-operados. Isto denota que com a retirada dos ovários houve uma redução expressiva dos níveis de E2 circulantes o que levou à retração endométrica. É importante ressaltar que os valores basais observados nos grupos ovariectomizados advêm possivelmente da produção ínfima de estrogênio por outros tecidos, como por exemplo, o tecido adiposo (Wajchenberg, 2000).

6.1. Níveis Glicêmicos e Estradiol (E2)

Com relação aos níveis glicêmicos os animais C57 que foram ovariectomizados apresentaram um aumento significativo de glicose plasmática. Há evidências crescentes tanto em humanos como em roedores, que ligam o E2 à manutenção da homeostase glicêmica. Por exemplo, mulheres no período pós-menopausa desenvolvem obesidade visceral e resistência à insulina e possuem risco aumentado de desenvolver diabetes mellitus do tipo 2 (Louet, LeMay, & Mauvais-Jarvis, 2004). Contudo a terapia de reposição hormonal leva a uma redução na incidência de diabetes. Em diversos modelos de

camundongos especificamente para diabetes do tipo 2, camundongos fêmeas que sofreram ovariectomia apresentam hiperglicemia e quando houve a perfusão de E2 visualizou-se a reversão do quadro hiperglicêmico. De acordo com Louet *et al.* a secreção e ação de E2 em camundongos parecem estar implicadas na biologia do tecido adiposo e na prevenção da obesidade, na estimulação do metabolismo de ácidos graxos no fígado, na supressão da produção de glicose hepática, na proteção/sobrevivência das células β pancreáticas e na secreção de insulina em condições de estresse oxidativo (Louet, LeMay, & Mauvais-Jarvis, 2004).

6.2. Perfil lipídico e Estradiol (E2)

Todas as frações lipídicas analisadas neste trabalho apresentarem-se elevadas no plasma em animais ovariectomizados. É importante ressaltar que os animais pertencentes ao grupo ApoE KO apresentaram os maiores valores plasmáticos o que comprova o objetivo já esperado destes, o de serem úteis como modelos ateroscleróticos. Diversos estudos têm relacionado os níveis de colesterol aos de E2. Exemplos destes, Marcha *et al* demonstraram que em experimentos onde foram utilizados camundongos deficientes para o receptor de LDL (LPR) e que sofreram ovariectomia, a reposição posterior de E2 reduziu as áreas ateroscleróticas em regiões da aorta. A reposição de E2 também diminuiu os níveis plasmáticos de triglicerídeos (Marsha *et al.*, 1999). É evidente que neste trabalho não foram efetuadas reposições de E2, mas fica claro que a depleção de E2 provocada pela ovariectomia aumenta direta e significativamente os níveis lipídicos. Também neste trabalho não foram realizados estudos histológicos de áreas ateroscleróticas, mas é plausível cogitar que estes animais apresentem tal achado o que corroboraria o já exposto até então.

6.3. Estrógenos e Proteína β A

A concentração da proteína β A foi mensurada no lisado cerebral, no plasma e na urina de 24H. Nos três compartimentos biológicos analisados observou-se, peremptoriamente, que a concentração de β A foi sempre maior em animais C57 OVX seguida dos C57 SHAM, ApoE OVX e ApoE SHAM.

Interessantemente a análise dos três compartimentos simultaneamente demonstrou que os níveis de β A no lisado cerebral foram aproximadamente treze vezes superiores aos encontrados no plasma em todos os grupos. Já na urina, os valores achados representaram, aproximadamente, a quarta parte dos níveis visualizados no plasma e a quinquagésima parte, aproximadamente, dos níveis de β A apresentados no lisado cerebral, novamente, em todos os grupos. Estes dados permitem afirmar que a proteína β A, assim como os demais componentes protéicos, é carregada por todo o organismo e pode estar presente em todos os líquidos corporais inclusive na urina.

A relação proporcional observada no lisado cerebral, no plasma e na urina permite-nos afirmar que a produção de proteína β A está em um nível em que já pode ser visualizada também na urina. Os níveis surpreendentemente maiores no plasma sugerem que há uma maior clivagem da PPA e conseqüente geração de β A. Os dados histológicos das seções cerebrais demonstraram que a produção de β A já é suficiente para a formação de placas senis. As placas possuem diversas fases de maturação. Este trabalho não objetivou a classificação destas, mas a simples visualização destas estruturas é suficiente para afirmar que há uma clivagem exacerbada de PPA.

Apesar de que não fora realizada a contagem das placas senis nas seções cerebrais, semi-quantitativamente os animais do grupo C57 OVX apresentam um maior número destas formações, seguido dos do grupo C57 SHAM, ApoE OVX e ApoE SHAM. A seqüência semi-quantitativa anteriormente citada é a mesma encontrada quando analisamos as concentrações da proteína β A nos diferentes grupos.

É importante ressaltar que a barreira hemato-encefálica (BHE) normalmente não permite a livre troca de solutos polares tais como a β A entre o cérebro e o sangue ou vice-versa devido à presença de junções (*tight junctions*) entre as células endoteliais cerebrais que formam um monocamada celular contínua. Por outro lado, em cérebros de indivíduos normais o fluxo em massa não específico do fluido intersticial cerebral parece ser responsável por 10-15% da depuração de β A (Shibata et al., 2000). Diversos estudos sugerem que não tão somente o fluido intersticial e/ou o líquido cefalorraquidiano sejam responsáveis por essa depuração. Estes relatam que o peptídeo β A é removido do SNC

através de um sistema de transporte específico mediado por receptores na BHE (Tanzi et al., 1987).

Assim conjectura-se que a depleção de E2 influenciou no aumento de produção de β A que, por conseguinte pôde ser visualizada em forma de placas senis. Schonknecht e colaboradores relataram que os níveis de E2 no líquido cefalorraquidiano eram menores em indivíduos com Doença de Alzheimer que nos controles e que, no grupo com Doença de Alzheimer, os níveis de E2 encontravam-se de maneira inversamente proporcional com os níveis de β A₁₋₄₂ (Schonknecht et al., 2001). De acordo com estes achados, diversos estudos com culturas celulares têm demonstrado que E2 diminui a produção de β A, presumivelmente estimulando a via não-amiloidogênica de clivagem da PPA via α -secretase (Xu et al., 1998) (Greenfield et al., 2002). O significado fisiológico destes efeitos tem sido confirmado em estudos *in vivo* que investigaram a relação entre as concentrações circulantes de E2 e os níveis cerebrais de β A (Vincent & Smith, 2000).

A depleção endógena de E2 provocada pela ovariectomia resulta em um aumento significativo de β A solúvel nos cérebros de camundongos (Savage et al., 1998) e em cobaias (Petanceska et al., 2000). É importante ressaltar que estes efeitos observados são parcialmente revertidos por reposição com E2. Além disso, E2 reduz o pool de β A solúvel (Levin-Allerhand et al., 2002) e os depósitos de β A em modelos para a Doença de Alzheimer, ressaltando o papel do E2 como um regulador importante da patogênese da Doença de Alzheimer (Zheng et al., 2002). Inesperadamente, dois estudos publicados utilizando modelos transgênicos para a Doença de Alzheimer demonstraram pouca (Green et al., 2005) ou nenhuma evidência (Heikkinen et al., 2004) de que o E2 reduz o pool insolúvel de β A. Diversos fatores podem contribuir para estes resultados negativos, incluindo as linhagens transgênicas utilizadas, os níveis detectáveis de β A e a diferença entre os níveis de estrógenos circulantes no plasma e no cérebro (Yue et al., 2005). Investigações mais recentes da regulação da formação da β A pelos esteróides sexuais têm utilizado modelos ovariectomizados (com depleção endógena de E2 e P4), combinado com reposição de E2, mas não de P4 (Green et al., 2005). Enquanto a reposição de

E2 é benéfica na regulação do metabolismo de β A, a interação entre E2 e P4 é de maior relevância clínica.

6.4. Proteína Tau e Tau[pS199]

A Tau é uma proteína associada à microtúbulos de vital importância para a estabilização do citoesqueleto neuronal ao interagir com a actina, ancorando enzimas tais como quinases e fosfatases, além de regular o transporte de vesículas intraneurônios. Quando a proteína Tau é hiperfosforilada há o desarranjo da microarquitetura citoesquelética neuronal. Uma das fosforilações relacionadas à Doença de Alzheimer é a de uma serina na posição 199 da proteína Tau.

Os dados obtidos para a dosagem da proteína Tau Total e Tau [pS199] no lisado cerebral, no plasma e na urina de 24H foram similares aos encontrados para a proteína β A no que tange à distribuição quantitativa intra e intergrupos. Os animais do grupo C57 OVX apresentaram níveis significativamente maiores do que os do grupo C57 SHAM, que conseguinte foram maiores do que os do grupo ApoE OVX. Os animais do grupo ApoE SHAM obtiveram os menores níveis comparativamente aos demais grupos. Isto exposto sugere-se que o comportamento fisiológico apresentado por estas proteínas assemelha-se ao padrão de modulação co-dependente de E2 visualizado no caso da proteína β A. A visualização da hiperfosforilação da proteína Tau configura-se na formação de emaranhados neurofibrilares (intracelular) o que precede a morte celular. Apesar de que neste trabalho não foram realizadas técnicas de identificação destas estruturas podemos supor que há uma forte tendência da visualização das mesmas com apelo para a morte neuronal, mesmo que de forma discreta. Isto se deve ao fato de que ao analisar os resultados mensurados de BDNF este se apresenta em uma relação inversamente proporcional tanto com relação à proteína Tau e Tau [pS199], quanto β A. Níveis baixos de BDNF foram encontrados em indivíduos com Alzheimer. Assim concentrações reduzidas de BDNF em grupos ovariectomizados indicam que o E2 modula de certa forma a hiperfosforilação das proteínas de citoesqueleto, sobretudo a Tau, e corrobora para a morte neuronal.

Estudos realizados demonstram que a ausência da ApoE é de suma importância para a precipitação dos eventos da cascata da hipótese amilóide. Reiterando a discussão já realizada dos dados plotados neste trabalho podemos perceber que a utilização de camundongos ApoEKO possibilitou diversas análises. Percebeu-se que a ausência desta importante proteína modula, por si só, a elevação dos níveis de β A, a elevação dos níveis de Tau/Tau[pS199] e a diminuição de BDNF sem discriminação do compartimento analisado. Também pode-se notar que a ausência da ApoE em uma situação de depleção estrogênica há a visualização do mesmo cenário. Conjuntamente, a ApoE e os estrógenos influenciam na cascata de eventos que precipitarão na morte neuronal, no caso da formação de emaranhados neurofibrilares, e no bloqueio das sinapses nervosas de áreas motoras e cognitivas, no caso das placas senis.

6.5. Perfil Lipídico e Proteína β A.

Uma diversa gama de experimentos realizados com cultura celular tem demonstrado que o processamento celular da PPA e produção de β A pode ser modulada pelo metabolismo do colesterol. Klein e colaboradores foram os primeiros a investigar esta correlação ao adicionar colesterol complexado com metil- β -ciclodextrina à cultura celular HEK demonstrando que o colesterol diminuía a secreção de PPA (Bodovitz & Klein, 1996). Em 1998 Simons *et al* utilizaram uma combinação de um inibidor de HMG-CoA redutase (*3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase*) e metil- β -ciclodextrina para diminuir os níveis de colesterol em 70% em neurônios do hipocampo (Simons *et al.*, 1998). Isto causou uma diminuição dramática na produção de β A. Estudos posteriores similarmente aos tratamentos anteriormente mencionados confirmaram os resultados (Fears *et al.*, 1999) (Fassbender, Simons, & Bergmann, 2001). O sistema aparenta exibir certa reciprocidade com respeito aos níveis de colesterol, pois a adição de colesterol exógeno em culturas celulares regula a produção de β A (Fears *et al.*, 1999). Mecanismo por detrás desta regulação parece depender em parte da ativação da β -secretase, pois a depleção de colesterol reduz CTF β (Fassbender, Simons, & Bergmann, 2001). A regulação do processamento da PPA pelo colesterol não é limitada somente pela

atividade da β -secretase. Por exemplo, a atividade da α -secretase é também controlada pelo colesterol, pois níveis baixos de colesterol estimula a produção de sAPP α (Kojro et al., 2001).

A terceira enzima envolvida no processamento da PPA, γ -secretase, pode também ser afetada pelo colesterol. Trabalhos demonstraram que a interrupção do tráfico de colesterol causa a redistribuição das presinilinas e um aumento associado na geração de β A (Burns et al., 2003). Entretanto, de todas as enzimas reguladoras do processamento da PPA, a atividade da γ -secretase parece ser a última afetada pelo colesterol (Runz et al., 2002).

O metabolismo do colesterol, por suas diferentes vias de tráfego – intra e/ou extracelular, pode também modular o processamento da PPA. Há diferentes *pools* de colesterol, ésteres de colesterol (ECs), ou colesterol livre (CL) presentes nas células. Em adição, o processamento da PPA também ocorre em diferentes compartimentos. A modulação enzimática específica em compartimentos particulares ou a modulação da distribuição da PPA entre as diferentes vesículas pode alterar a geração de β A e PPAs. Por exemplo, a enzima responsável pelo controle da interconversão destes *pools* de colesterol é a enzima acetil-CoA acetiltransferase (ACAT), e tem sido demonstrado que a atividade desta enzima pode regular a geração de β A, sugerindo que possivelmente a distribuição de colesterol intracelular é mais importante do que a quantidade total de colesterol (Puglielli, Konopka, & Pack-Chung, 2001). É possível que outros tipos de modulação relacionada ao colesterol possam também agir na mudança da distribuição vesicular dos componentes que afetam o processamento da PPA.

Numerosos estudos sugerem que o colesterol também modula o processamento da PPA *in vivo*. Diferentemente dos estudos *in vitro* quando se analisa um organismo vivo deve haver a distinção das quantidades de colesterol presentes no plasma das no cérebro. Deve-se também ponderar com relação ao modelo animal que está sendo utilizado nos experimentos, pois o metabolismo lipídico difere entre as espécies tais como camundongos, cobaias e humanos. Exemplos disso, camundongos geralmente exibem altos níveis de LDL enquanto humanos tendem a apresentar altos níveis de HDL. Apesar destas diferenças, diversos grupos têm demonstrado que mudanças no

metabolismo do colesterol podem ser induzidas farmacologicamente (ex. estatinas) ou pela alimentação rica em gorduras. Isto tem sido observado em primatas (Schmechel, Sullivan, & Mace, 2002) e também em modelos de camundongos transgênicos para a Doença de Alzheimer (Li, Cao, & Garber, 2003) (Shie, Jin, & Cook, 2002). Por exemplo, Refolo *et al.* demonstrou que ambos CTF β e β A estavam aumentados no SNC de camundongos que foram alimentados com dieta rica em colesterol, enquanto a produção de sPPA α estava diminuída, sugerindo que o colesterol afeta o processamento da PPA (Refolo, Pappolla, & Malester, 2000).

Outros estudos *in vivo* demonstraram que o tratamento de cobaias ou de camundongos transgênicos com drogas redutoras dos níveis de colesterol resultou na diminuição dos níveis de β A e também aumentou a produção de sPPA α e diminuiu a de CTF β (Fassbender, Simons, & Bergmann, 2001) e PPA (Refolo, Pappolla, & Malester, 2000). Cada um destes estudos apresenta exemplos convincentes do impacto do metabolismo do colesterol no processamento da PPA *in vivo*. Apesar dos resultados destes estudos indicarem que a hipercolesterolemia leva a um aumento do processamento amiloidogênico da PPA, enquanto a redução nos níveis de colesterol possui o efeito contrário, alguns estudos têm demonstrado evidências contraditórias. Howland *et al.*, ao examinar os efeitos de uma dieta rica em colesterol em camundongos transgênicos para a Doença de Alzheimer, encontrou que os níveis de sAPP α , sAPP β e de β A estavam reduzidos (Howland, Trusko, & Savage, 1998) (George, Holsinger, & McLean, 2004). A razão exata para estas aparentes discrepâncias ainda não está clara. Possíveis diferenças que poderiam contribuir para estes resultados conflitantes poderiam residir nos transgenes presentes nos modelos animais, no background genético dos camundongos, na variabilidade das idades e também na diferença do sexo dos animais utilizados. Interessantemente, o estudo conduzido por George *et al.* demonstrou que a produção de AICD estava aumentada em camundongos que foram alimentados com dieta rica em colesterol. Este fragmento aparenta agir como um ativador transcripcional e pode induzir a apoptose neuronal, levando à possível especulação de que o colesterol pode afetar a progressão da

Doença de Alzheimer via a regulação da produção de AICD (Cao & Sudhof, 2001) (Gao & Pimplikar, 2001).

Os dados dos estudos mencionados anteriormente estão expostos na tabela 9 onde estudos *in vitro* sugerem que o aumento dos níveis de colesterol resulta na estimulação da via amiloidogênica da PPA, enquanto níveis baixos de colesterol possuem o efeito contrário. A maioria dos estudos *in vivo* demonstra o mesmo padrão, entretanto há alguns que contradizem as tendências (CL: Colesterol).

TABELA 9
SUMÁRIO DOS EFEITOS DA MODULAÇÃO DO COLESTEROL NA MODULAÇÃO DO PROCESSAMENTO DA PPA E NA PRODUÇÃO DE β A

	Modulação do Colesterol	Efeitos	Referência
<i>In vitro</i>	↑ CL	CL exógeno	↓ produção de sPPA α (Rogaeva, Premkumar, & Grubber, 1999)
		CL exógeno	↑ produção de β A (Frears et al., 1999)
	↓ CL	Estatinas	↓ produção de β A (Simons et al., 1998)
		Estatinas	↓ produtos de clivagem pela β -secretase (Frears et al., 1999)
		Estatinas	↓ produção de β A (Fassbender, Simons, & Bergmann, 2001)
		Estatinas	↑ produção de sPPA α
		metil- β -ciclodextrina	↓ produção de β A (Kojro et al., 2001)
<i>In vivo</i>	↑ CL	Primatas alimentados com dieta rica em gorduras	↑ deposição de β A (Schmechel, Sullivan, & Mace, 2002)
		Camundongo transgênico para PPA	↑ deposição de β A (Li, Cao, & Garber, 2003)
			↑ deposição de β A e a (Refolo, Pappolla, &

	alimentados com dieta rica em gorduras	produção de CTF β ↑ deposição de β A ↓ deposição de β A ↓ produção de sPPA α	Malester, 2000) (Shie, Jin, & Cook, 2002) (Howland, Trusko, & Savage, 1998)
		↓ deposição de β A ↓ produção de sPPA α ↑ AICD	(George, Holsinger, & McLean, 2004)
↓ CL	Cobaias tratadas com sinvastatinas	↓ deposição de β A	(Fassbender, Simons, & Bergmann, 2001)
	Camundongo transgênico para PPA tratados com drogas redutoras de colesterol	↓ produção de β A e CTF β ↑ produção de sPPA α ↑ deposição de β A somente em fêmeas	(Refolo, Pappolla, & Malester, 2000) (Park, Hwang, & Hong, 2003)

Os resultados apresentados neste trabalho corroboram com pesquisas já realizadas onde a indução do aumento dos níveis lipêmicos está diretamente relacionada a um aumento de proteína β A além da proteína Tau e Tau[pS199].

7. CONCLUSÃO

No presente trabalho foram avaliados os níveis de diversos parâmetros analíticos envolvidos no aparecimento de achados histopatológicos característicos da Doença de Alzheimer. O cerne da proposta metodológica voltou-se para a investigação dos níveis de certas proteínas no plasma, no lisado cerebral e na urina com o intuito de correlacionar as concentrações visualizadas nestes compartimentos biológicos com a modulação direta sob a proteína β A e a proteína Tau e fração Tau [pS199].

A ovariectomia promoveu a redução de diversos estrógenos, inclusive E2, e a sua depleção modulou os eventos da cascata de geração da proteína β A em seus diferentes níveis. Isto sugere que ou há um aumento da clivagem da PPA diretamente ou, concomitantemente, há uma estimulação amiloidogênica das enzimas envolvidas na clivagem da PPA. Sugere-se também que a diminuição dos níveis endógenos de E2 aumenta todas as frações lipídicas e glicêmicas o que está intrinsecamente relacionada ao *clearance* das proteínas envolvidas na Doença de Alzheimer no plasma, lisado cerebral e urina.


Este estudo corroborou o papel crucial da ApoE sob a ótica sistêmica de formação de placas senis. Isto ficou em evidência quando camundongos ApoE KO apresentaram níveis diminuídos de proteína β A, proteína Tau e fração Tau [pS199] quando comparados ao controles C57. Assim a presença da ApoE modula a formação em maior quantidade de β A e a ausência da ApoE sugere uma atenuação da regulação amiloidogênica.

Tomados conjuntamente, estes resultados sugerem que os hormônios sexuais femininos e a ApoE atuam por vias de sinalização celular distintas que, provavelmente, atuam no *turnover* de algumas moléculas associadas à formação da placa senil e emaranhados neurofibrilares característicos da Doença de Alzheimer.


8. ANEXOS

ANEXO I

CERTIFICADO – COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFES)




UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 021/2009, relativo ao projeto de pesquisa intitulado **“Papel da ApoE e do estrogênio na expressão de biomarcadores da doença de Alzheimer: estudos pré-clínicos usando modelos animais geneticamente modificados e diagnóstico molecular”**, que tem como responsável o docente **Ian Victor Silva**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 19/04/2010. Este certificado expira-se em 30/04/2015.

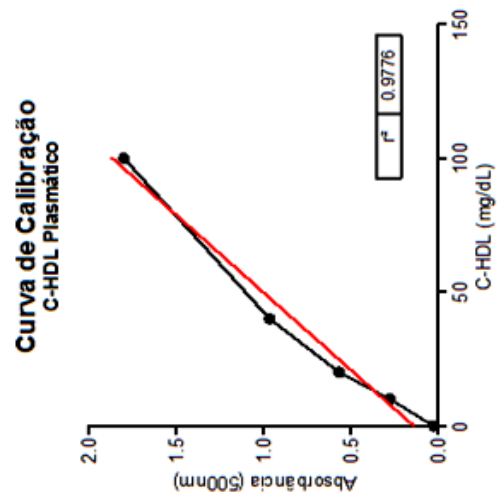
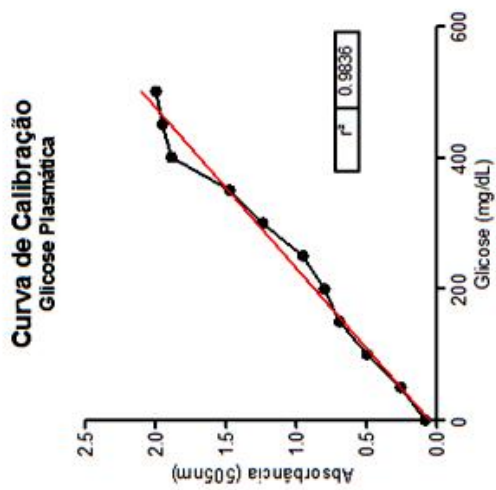
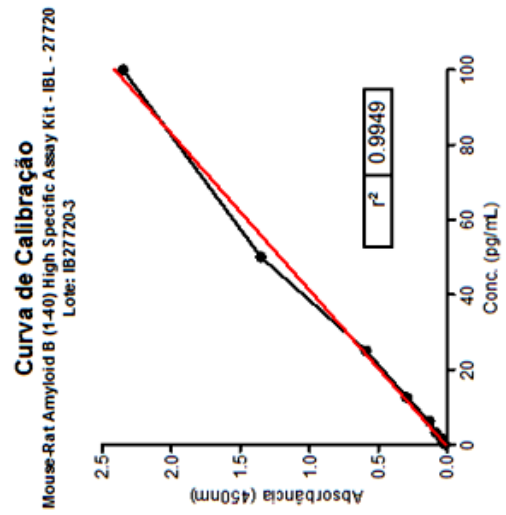
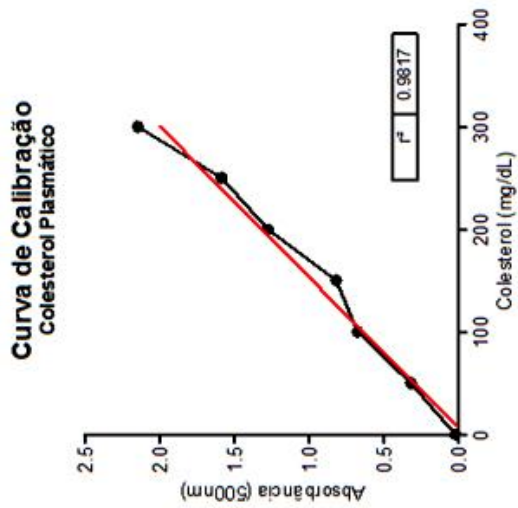
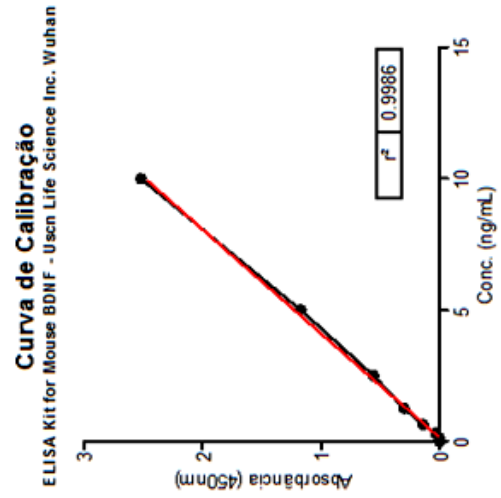
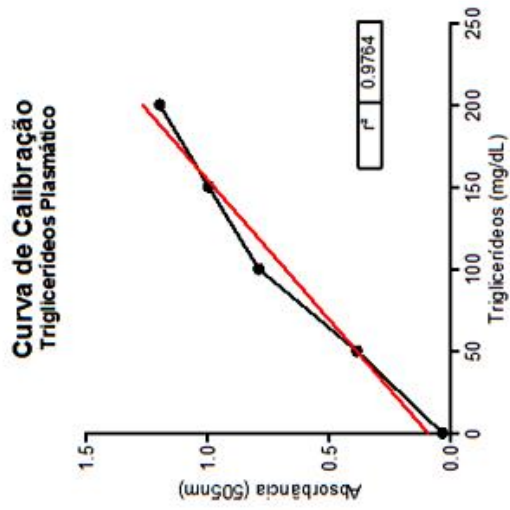


Prof. Dr. Margareth Ribeiro Moysés
Presidente da CEUA/UFES

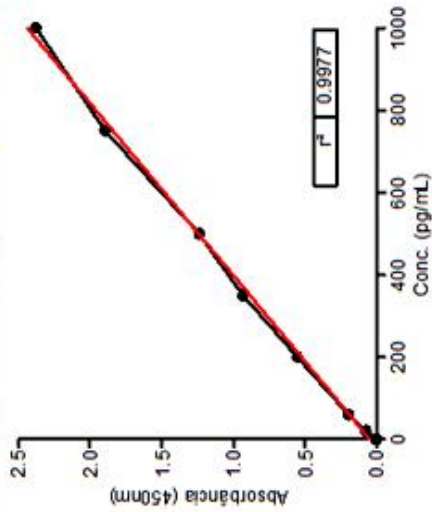
Vitória (ES), 20 de abril de 2010.

ANEXO II

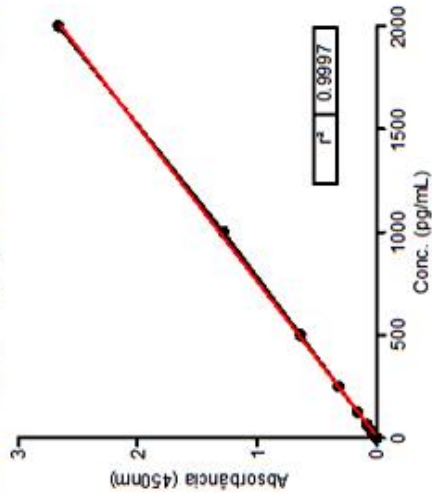
CURVAS DE CALIBRAÇÃO



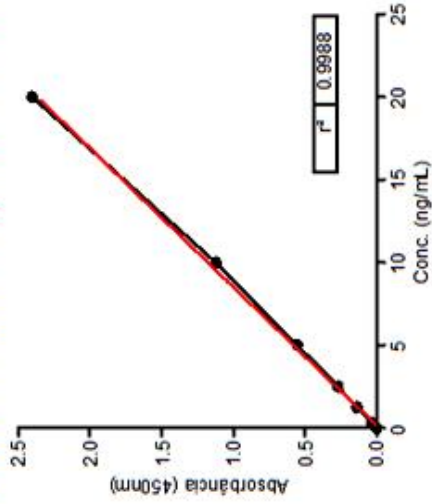
Curva de Calibração
 ELISA Kit for Mouse Estradiol(E2) - Usn Life Science Inc. Wuhan



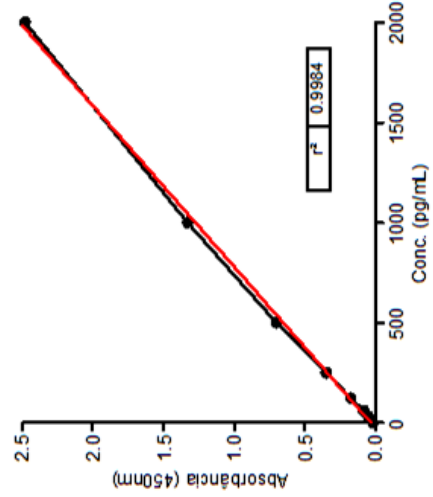
Curva de Calibração
 ELISA Kit for Mouse 17-Hydroxyprogesterone - Usn Life Science Inc. Wuhan



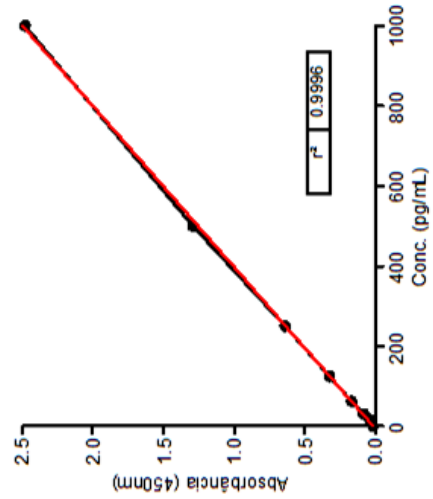
Curva de Calibração
 ELISA Kit for Mouse Testosterone(T) - Usn Life Science Inc. Wuhan



Curva de Calibração
 KMB7011 prf39 revA4 Jun1608 (MsTau [Total])



Curva de Calibração
 KMB7041 pr142 revA4 Jun1608 (Ms Tau [pS199])



9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. A van Es, M., & H van den Berg, L. (2009). Alzheimer's disease beyond APOE. *Nature Genetics* , 41 (10), 1047-1049.
2. Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., et al. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* , 3, pp. 383-421.
3. Ancolio, K., Marambaud, P., Dauch, P., & Checler, F. (1997). Alpha-secretase-derived product of beta-amyloid precursor protein is decreased by presenilin 1 mutations linked to familial Alzheimer's disease. *J Neurochem* , 69, pp. 2494-2499.
4. Andersen, K., Launer, L. J., Dewey, M. E., Letenneur, L., Ott, A., Copeland, J. R., et al. (1999). Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group. *Neurology* , 53, pp. 1992-1997.
5. Andersen, K., Launer, L. J., Ott, A., Hoes, A. W., Breteler, M. M., & Hofman, A. (1995). Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease the risk for Alzheimer's disease? The Rotterdam Study. *Neurology* , 45, pp. 1441-1445.
6. Artiga, M. J., Bullido, M. J., Frank, A., Sastre, I., Recuero, M., Garcia, M. A., et al. (1998a). Risk for Alzheimer's disease correlates with transcriptional activity of the APOE gene. *Hum Mol Genet* , 7, pp. 1887-1892.
7. Artiga, M. J., Bullido, M. J., Sastre, I., Recuero, M., Garcia, M. A., Aldudo, J., et al. (1998b). Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. *FEBS Lett* , 421, pp. 105-108.
8. Asai, M., Hattori, C., Szabo, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S., et al. (2003). Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun* , 301, pp. 231-235.
9. Assoc., A. (2004). Basic Facts for Alzheimer's Disease: Alzheimer's Disease Fact Sheet. p.2.
10. Baker, L., Sambamurti, K., Craft, S., Cherrier, M., Raskind, M., Stanczyk, F., et al. (2003). 17 β -Estradiol reduces plasma A β 40 for HRT-naive postmenopausal women with Alzheimer disease: a preliminary study. *Am J Geriatr Psychiatry* , 11, pp. 239-244.
11. Baldereschi, M. D., Lepore, V., Bracco, L., Maggi, S., & Grigoletto, F. (1998). Estrogen-replacement therapy and Alzheimer's disease in the Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurology* , 50, pp. 996-1002.
12. Barrow, C., & Small, D. (2007). *Abeta peptide and Alzheimer's disease: celebrating a century of research*. London: Springer-Verlag London Limited.

13. Bassan, M., Zamostiano, R., Davidson, A., Pinhasov, A., Giladi, E., Perl, O., et al. (1999) Complete sequence of a novel protein containing a femtomolar-activity-dependent neuroprotective peptide. *J. Neurochem.* 72, 1283–1293.
14. Beard, C. M., Waring, S. C., O'Brien, P. C., Kurland, L. T., & Kokmen, E. (1998). Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and Alzheimer's disease: a case-control study in Rochester, Minnesota, 1980 through 1984. *Mayo Clin Proc* , 73, pp. 951-955.
15. Beffert, U., Arguin, C., & Poirier, J. (1999a). The polymorphism in exon 3 of the low density lipoprotein receptor-related protein gene is weakly associated with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* , 259, pp. 29-32.
16. Beffert, U., Cohn, J. S., Petit-Turcotte, C., Tremblay, M., Aumont, N., Ramassamy, C., et al. (1999c). Apolipoprotein E and beta-amyloid levels in the hippocampus and frontal cortex of Alzheimer's disease subjects are disease-related and apolipoprotein E genotype dependent. *Brain Res* , 843, pp. 87-94.
17. Behl, C., Moosmann, B., Manthey, D., & Heck, S. (2000). The female sex hormone oestrogen as neuroprotectant: activities at various levels. *Novartis Found Symp* , 230, 221-34.
18. Behmer, O. A., de Tolosa, E. M., Neto, A. G., & Rodrigues, C. J. (2003). Manual de técnicas para histologia normal e patológica. Barueri, São Paulo, Brasil: Manole.
19. Bellosta, S., Nathan, B. P., Orth, M., Dong, L. M., Mahley, R. W., & Pitas, R. E. (1995). Stable expression and secretion of apolipoproteins E3 and E4 in mouse neuroblastoma cells produces differential effects on neurite outgrowth. *J Biol Chem* , 270, pp. 27063-27071.
20. Berquó, E. S., & Leite, V. M. (1988). Algumas considerações sobre a demografia da população idosa no Brasil. *Ciência e Cultura* , pp. 679-688.
21. Berriman, J., Serpell, L., & Oberg, K. (2003). Tau filaments from human brain and from in vitro assembly of recombinant protein show cross-beta structure. *Proc Natl Acad Sci USA* , 100, pp. 9034-9038.
22. Bertrand, P., Poirier, J., Oda, T., Finch, C. E., & Pasinetti, G. M. (1995). Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease. *Brain Res Mol Brain Res* , 33, pp. 174-178.
23. Bian, L., Yang, J. D., Guo, T. W., Sun, Y., Duan, S. W., Chen, W. Y., et al. (2004). Insulin-degrading enzyme and Alzheimer disease: a genetic association study in the Han Chinese. *Neurology* , 63, pp. 241-245.
24. Bimonte, H. A., & Denenberg, V. H. (1999). Estradiol facilitates performance as working memory load increases. *Psychoneuroendocrinology* , 24, pp. 161-173.
25. Bjorkhem, I., Lutjohann, D., Diczfalusy, U., Stahle, L., Ahlborg, G., & Wahren, J. (1998). Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24-S-

- hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J Lipid Res* , 39, pp. 1594-1600.
26. Blacker, D., Wilcox, M. A., Laird, N. M., Rodes, L., Horvath, S. M., Go, R. C., et al. (1998). Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* , 19, pp. 357-360.
 27. Blennow, K., De Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's Disease. *Lancet* , pp. 387-403.
 28. Blomqvist, M. E., Chalmers, K., Andreasen, N., Bogdanovic, N., Wilcock, G. K., Cairns, N. J., et al. (2005). Sequence variants of IDE are associated with the extent of beta-amyloid deposition in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging* , 26, pp. 795-802.
 29. Blue, M. L., Williams, D. L., Zucker, S., Khan, S. A., & Blum, C. B. (1983). Apolipoprotein E synthesis in human kidney, adrenal gland, and liver. *Proc Natl Acad Sci USA* , 80, pp. 283-287.
 30. Bodovitz, M. L., & Klein, W. L. (1996). Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* , 271, pp. 4436-4440.
 31. Borchelt, S., Ratovitski, T., van Lare, J., Lee, M. K., Gonzales, V., Jenkins, N. A., et al. (1997). Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* , 19, pp. 939-945.
 32. Borchet, D., Thinakaran, G., & Eckman, C. (1996). Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* , 17 (5), pp. 1005-1013.
 33. Bortoli, M.A. et al., (1996). Variaciones en el contenido de calcio, fosfato, magnesio y sodio en huesos de ratas ovariectomizadas. *Arch Latin Amer Nutr*, 46 (1), pp. 38-41.
 34. Braak, H., & Braak, E. (1997). Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol Aging* , 18, pp. 351-357.
 35. Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* , 82, pp. 239-259.
 36. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* , 72, pp. 248-254.
 37. Bromberger, J. T., Meyer, P. M., Kravitz, H. M., Sommer, B., Cordal, A., Powell, L., et al. (2001). Psychologic distress and natural menopause: a multiethnic community study. *Am J Public Health* , 91, pp. 1435-1442.
 38. Burger, H. G., Cahir, N., Robertson, D. M., Groome, N. P., Dudley, E., & Green, A. (1998). Serum inhibins A and B fall differentially as FSH rises in perimenopausal women. *Clin Endocrinol* , 48, pp. 809-813.

39. Burns, M., Gaynor, K., Olm, V., Mercken, M., LaFrancois, J., Wang, L., et al. (2003). Presenilin redistribution associated with aberrant cholesterol transport enhances beta-amyloid production in vivo. *J Neurosci* , 23, pp. 5645-5649.
40. Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., et al. (1998). Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* , 273, pp. 27765-27767.
41. Buxbaum, J., Choi, E., & Luo, Y. (1998). Calsenilin: a calcium-binding protein that interacts with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. *Nat Med* , 4 (10), pp. 1177-1181.
42. Campbell, S., & Whitehead, M. (1977). Oestrogen therapy and the menopausal syndrome. *Clin Obstet Gynaecol* , 4, pp. 31-47.
43. Cao, X., & Sudhof, T. C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* , 5527, pp. 115-120.
44. Caporaso, G. L., Takei, K., Gandy, S. E., Matteoli, M., Mundigl, O., Greengard, P., et al. (1994). Morphologic and biochemical analysis of the intracellular trafficking of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *J Neurosci* , 14, pp. 3122-3138.
45. Carlson, G. A., Borchelt, D. R., Dake, A., Turner, S., Danielson, V., Coffin, J. D., et al. (1997). Genetic modification of the phenotypes produced by amyloid precursor protein overexpression in transgenic mice. *Hum Mol Genet* , 6, pp. 1951-1959.
46. Chaimowicz, F. (1998). *Os idosos brasileiros no século XXI: demografia, saúde e sociedade*. Postgraduate, Belo Horizonte.
47. Chang, D., Kwan, J., & Timiras, P. (1997). Estrogens influence growth, maturation, and amyloid beta-peptide production in neuroblastoma cells and in a beta-APP transfected kidney 293 cell line. *Advances in Experimental Medicine and Biology* , 429, pp. 261-271.
48. Chartier-Harlin, M. C., Crawford, F., Houlden, H., Warren, A., Hughes, D., Fidani, L., et al. (1991). Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* , 353, pp. 844-846.
49. Chen, F., David, D., Ferrari, A., & Gotz, J. (2004). Posttranslational modifications of tau-Role in human tauopathies and modeling in transgenic animals. *Curr Drug Targests* , 5, pp. 503-515.
50. Chen, F., Yang, D. S., Petanceska, S., Yang, A., Tandon, A., Yu, G., et al. (2000). Carboxyl-terminal fragments of Alzheimer beta-amyloid precursor protein accumulate in restricted and unpredicted intracellular compartments in presenilin 1-deficient cells. *J Biol Chem* , 275, pp. 36794-36802.

51. Citron, M., Vigo-Pelfrey, C., Teplow, D. B., Miller, C., Schenk, D., Johnston, J., et al. (1994). Excessive production of amyloid beta-protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer disease mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* , 91, pp. 11993-11997.
52. Citron, M., Westaway, D., Xia, W., & Carlson, G. (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* , 3 (1), pp. 67-72.
53. Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., et al. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* , 261, pp. 921-923.
54. Cosgrove, K., Mazure, C., & Staley, J. (2007). Evolving knowledge of sex differences in brain structure, function, and chemistry. *Biol Psychiat* , 62 (8), pp. 847-855.
55. Cotman, C., & Berchtold, N. (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* , 25 (6), pp. 295-301.
56. Covelli, V. (15 de Maio de 2009). Acesso em 08 de Julho de 2010, disponível em Guide to the Necropsy of the Mouse Division of Protection of Man and Ecosystems: http://eulep.pdn.cam.ac.uk/Necropsy_of_the_Mouse/printable.php
57. Cox, R., & John-Alder, H. (2005). Testosterone has opposite effects on male growth in lizards (*Sceloporus* spp.) with opposite patterns of sexual size dimorphism. *J Exp Biol* , 208 (Pt24), pp. 4679-4687.
58. Crowther, R., & Wisckik, C. (1985). Image reconstruction of the Alzheimer paired helical filament. *EMBO J* , pp. 3661-3665.
59. Culvenor, J. G., Maher, F., Evin, G., Malchiodi-Albedi, F., Cappai, R., Underwood, J. R., et al. (1997). Alzheimer's disease-associated presenilin 1 in neuronal cells: evidence for localization to the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *J Neurosci Res* , 49, pp. 719-731.
60. Dabbs, M., & Dabbs, J. (2000). *Heroes, rogues, and lovers: testosterone and behavior*. New York: McGraw-Hill.
61. Daniel, J. M., & Dohanich, G. P. (2001). Acetylcholine mediates the estrogen-induced increase in NMDA receptor binding in CA1 of the hippocampus and the associated improvement in working memory. *J Neurosci* , 21, pp. 6949-6956.
62. Daniel, J. M., Fader, A. J., Spencer, A. L., & Dohanich, G. P. (1997). Estrogen enhances performance of female rats during acquisition of a radial arm maze. *Horm Behav* , 32, pp. 217-225.
63. De Strooper, B., Saftig, P., & Craessaerts, K. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* , 391 (6665), pp. 387-390.

64. Dennerstein, L., Dudley, E. C., Hopper, J. L., Guthrie, J. R., & Burger, H. G. (2000). A prospective population-based study of menopausal symptoms. *Obstet Gynecol* , 96, pp. 351-358.
65. Dietschy, J. M., & Turley, S. D. (2002). Control of cholesterol turnover in the mouse. *J Biol Chem* , 277, pp. 3801-3804.
66. Dietschy, J. M., & Turley, S. D. (2004). Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* , 45, pp. 1375-1397.
67. Dong, L. M., & Weisgraber, K. H. (1996). Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins. *J Biol Chem* , 271, pp. 19053-19057.
68. Dong, L. M., Wilson, C., Wardell, M. R., Simmons, T., Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., et al. (1994). Human apolipoprotein E. Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms. *J Biol Chem* , 269, pp. 22358-22365.
69. Drouet, B., Pincon-Raymond, M., Chambaz, J., & Pillot, T. (2000). Molecular basis of Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* , 57 (5), pp. 705-715.
70. Eehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., & Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* , 160, pp. 113-123.
71. Eichenbaum, H. (2000). A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci* , 1, pp. 41-50.
72. Fagan, A. M., Bu, G., Sun, Y., Daugherty, A., & Holtzman, D. M. (1996). Apolipoprotein E-containing high density lipoprotein promotes neurite outgrowth and is a ligand for the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* , 271, pp. 30121-30125.
73. Fagan, A. M., Murphy, B. A., Patel, S. N., Kilbridge, J. F., Mobley, W. C., Bu, G., et al. (1998). Evidence for normal aging of the septo-hippocampal cholinergic system in apoE (-/-) mice but impaired clearance of axonal degeneration products following injury. *Exp Neurol* , 151, pp. 314-325.
74. Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., et al. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *Jama* , 278, pp. 1349-1356.
75. Fassbender, K., Simons, M., & Bergmann, C. (2001). Simvastatin strongly reduces Alzheimer's disease A β 42 and A β 40 levels in vitro and in vivo. *Acad Sci USA* , pp. 5856-5861.
76. Felsenstein, K. M., Hunihan, L. W., & Roberts, S. B. (1994). Altered cleavage and secretion of a recombinant beta-APP bearing the Swedish familial Alzheimer's disease mutation. *Nat Genet* , 6, pp. 251-255.

77. Fernandes, C., Pinto-Duarte, A., Ribeiro, J., & Sebastião, A. (2008). Postsynaptic action of brain-derived neurotrophic factor attenuates alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in hippocampal interneurons. *J Neurosci* , 28 (21), pp. 5611-5618.
78. Fraering, P. C., Ye, W., Strub, J. M., Dolois, G., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., et al. (2004). Purification and characterization of the human gamma-secretase complex. *Biochemistry* , 43, pp. 9774-9789.
79. Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D. A., Sym, M., Apfeld, J., et al. (2002). aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* , 3, pp. 85-97.
80. Fears, E. R., Stephens, D. J., Walters, C. E., Davies, H., & Austen, B. M. (1999). The role of cholesterol in the biosynthesis of beta-amyloid. *Neuroreport* , 10, pp. 1699-1705.
81. Frick, K. M., Fernandez, S. M., & Bulinski, S. C. (2002). Estrogen replacement improves spatial reference memory and increases hippocampal synaptophysin in aged female mice. *Neuroscience* , 115, pp. 547-558.
82. Friedewald, W. T., Levy, R. I., & Fredrickson, D. S. (1972). Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* , 18, pp. 499-502.
83. Friedland, R. P., Fritsch, T., Smyth, K., Koss, E., Lerner, A., Chen, C., et al. (2001). Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members. *Proc Natl Acad Sci USA* , 98 (6), pp. 3440-3445.
84. Fugger, H. N., Cunningham, S. G., Rissman, E. F., & Foster, T. C. (1998). Sex differences in the activational effect of ERalpha on spatial learning. *Horm Behav* , 34, pp. 163-170.
85. Fujita, S. C., Sakuta, K., Tsuchiya, R., & Hamanaka, H. (1999). Apolipoprotein E is found in astrocytes but not in microglia in the normal mouse brain. *Neurosci Res* , 35, pp. 123-133.
86. Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., et al. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* , 373, pp. 523-527.
87. Gao, Y., & Pimplikar, S. W. (2001). The gamma-secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* , 26, pp. 14979-14984.
88. Garcá-Pérez, M. A., Noguera, I., Hermenegildo, C., Martínez-Romero, A., Tarín, J. J., & Cano, A. (2006). Alterations in the phenotype and function of immune cells in ovariectomy-induced osteopenic mice. *Human Reproduction* , 21, pp. 880-887.

89. Gatz, M., Fratiglioni, L., Johansson, B., Berg, S., Mortimer, J. A., Reynolds, C. A., et al. (2005). Complete ascertainment of dementia in the Swedish Twin Registry: the HARMONY study. *Neurobiol Aging* , 26, pp. 439-447.
90. Gearing, M., Mori, H., & Mirra, S. S. (1996). Abeta-peptide length and apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* , 39, pp. 395-399.
91. Genis, I., Fisher, A., Michaelson D. M. (1999) Sitespecific dephosphorylation of tau of apolipoprotein E-deficient and control mice by M1 muscarinic agonist treatment. *J. Neurochem.* 72, 206–213.
92. George, A. J., Holsinger, R. M., & McLean, C. A. (2004). APP intracellular domain is increased and soluble Abeta is reduced with diet-induced hypercholesterolemia in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* , 1, pp. 124-132.
93. Gillies, G. E., & McArthur, S. (2010). Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacol Rev.* , 2, pp. 155-198.
94. Glenner, G. G., & Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* , 120, pp. 885-890.
95. Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* , 349, pp. 704-706.
96. Goedert, M., Spillantini, M., Cairns, N. J., & Crowther, R. A. (1992). Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* , 8, pp. 159-168.
97. Goedert, M., Wischik, C., & Crowther, R. (1988). Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer's disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci USA* , 85, pp. 4051-4055.
98. Goldgaber, D., Lerman, M. I., McBride, W. O., Saffiotti, U., & Gajdusek, D. C. (1987). Isolation, characterization, and chromosomal localization of human brain cDNA clones coding for the precursor of the amyloid of brain in Alzheimer's disease, Down's syndrome and aging. *J Neural Transm Suppl* , 24, pp. 23-28.
99. Gomes, R. C., Oliveira, P. B., Rossi, A. G., Baracat, M. C., Simões, R. S., Baracat, E. C., et al. (2009). Efeitos da hiperprolactinemia sobre o útero de camundongos no proestro. *Rev Bras Ginecol Obstet.* , 31, pp. 385-390.
100. Gordon, I., Grauer, E., Genis, I., Sehayek, E., Michaelson, D. M. (1995) Memory deficits and cholinergic impairments in apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci. Lett.* 199, 1–4.
101. Gozes, I., Bachar, M., Bardea, A., Davidson, A., Rubinraut, S., Fridkin, M., Giladi E. (1997) Protection against developmental retardation in apolipoprotein E-

deficient mice by a fatty neuropeptide: implication for early treatment of Alzheimers disease. *J. Neurobiol.* 33, 329–342.

102. Gozes, I., Perl, O., Giladi, E., Davidson, A., Ashur-Fabian, O., Rubinraut, S., Fridkin, M. (1999) Mapping the active site in vasoactive intestinal peptide to a core of four amino acids: neuroprotective drug design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4143–4148.
103. Green, P. S., Yang, S. H., & Simpkins, J. W. (2000). Neuroprotective effects of phenolic A ring oestrogens. *Novartis Found Symp*, 230, pp. 202-213.
104. Green, P., Bales, K., Paul, S., & Bu, G. (2005). Estrogen therapy fails to alter amyloid deposition in the PDAPP model of Alzheimer's disease. *Endocrinology* , 146, pp. 2774-2781.
105. Greenfield, J., Leung, L., Cai, D., Kaasik, K., Gross, R., Rodriguez-Boulan, E., et al. (2002). Estrogen lowers Alzheimer beta-amyloid generation by stimulating trans-Golgi network vesicle biogenesis. *J Biol Chem* , 277, pp. 12128-12136.
106. Gregg, R. E., Zech, L. A., Schaefer, E. J., & Brewer, H. B. (1981). Type III hyperlipoproteinemia: defective metabolism of an abnormal apolipoprotein E. *Science* , 211, pp. 584-586.
107. Gregg, R. E., Zech, L. A., Schaefer, E. J., Stark, D., Wilson, D., & Brewer, H. B. (1986). Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans. *J Clin Invest* , 78, pp. 815-821.
108. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y. C., Zaidi, M. S., & Wisniewski, H. M. (1986a). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* , 261, pp. 6084-6089.
109. Guntern, R., Bouras, C., Hof, P. R., & Vallet, P. G. (1992). An improved thioflavine S method for staining neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* , 48, pp. 8-10.
110. Guo, Q., Fu, W., & Xie, J. (1998). Par-4 is a mediator of neuronal degeneration associated with the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Nat Med* , 4 (8), pp. 957-962.
111. Guo, Z., Cupples, L. A., Kurz, A., Auerbach, S. H., Volicer, L., Chui, H., et al. (2000). Head injury and the risk of AD in the MIRAGE study. *Neurology* , 54, pp. 1316-1323.
112. Han, S. H., Einstein, G., Weisgraber, K. H., Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Pericak-Vance, M., et al. (1994a). Apolipoprotein E is localized to the cytoplasm of human cortical neurons: light and electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol* , 53, pp. 535-544.
113. Han, S. H., Hulette, C., Saunders, A. M., Einstein, G., Pericak-Vance, M., Strittmatter, W. J., et al. (1994b). Apolipoprotein E is present in hippocampal neurons without neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and in age-matched controls. *Exp Neurol* , 128, pp. 13-26.

114. Harr, S. D., Uint, L., Hollister, R., Hyman, B. T., & Mendez, A. J. (1996). Brain expression of apolipoproteins E, J, and A-I in Alzheimer's disease. *J Neurochem* , 66, pp. 2429-2435.
115. Hartmann, M., Heumann, R., & Lessmann, V. (2001). Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J* , 20 (21), pp. 5887-5897.
116. Havel, R., & Kane, J. (1989). Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins. In: C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly, & D. Valle, *The Metabolic basics of inherited disease*. (pp. 1129-1138). New York, NY, USA: McGraw-Hill.
117. Heikkinen, T., Kalesnykas, G., Rissanen, A., Tapiola, T., Iivonen, S., Wang, J., et al. (2004). Estrogen treatment improves spatial learning in APP + PS1 mice but does not affect beta amyloid accumulation and plaque formation. *Exp Neurol* , 187, pp. 105-117.
118. Hogervorst, E., Bandelow, S., Combrinck, M., & Smith, A. (2004). Low free testosterone is an independent risk factor for Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* , 39 (11-12), pp. 1633-1669.
119. Hotoda, N., Koike, H., Sasagawa, N., & Ishiura, S. (2002). A secreted form of human ADAM9 has an alpha-secretase activity for APP. *Biochem Biophys Res Commun* , 293, pp. 800-805.
120. Houlden, H., Crook, R., Backhovens, H., Prihar, G., Baker, M., Hutton, M., et al. (1998). ApoE genotype is a risk factor in nonpresenilin early-onset Alzheimer's disease families. *Am J Med Genet* , 81, pp. 117-121.
121. Howland, D. S., Trusko, S. P., & Savage, M. J. (1998). Modulation of secreted beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in brain by cholesterol. *J Biol Chem* , 26, pp. 16576-16582.
122. Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., et al. (1996). Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* , 274, pp. 99-102.
123. Hsia, A. Y., Masliah, E., McConlogue, L., Yu, G. Q., Tatsuno, G., Hu, K., et al. (1999). Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci USA* , 96, pp. 3228-3233.
124. Hu, Y., Ye, Y., & Fortini, M. E. (2002). Nicastrin is required for gamma-secretase cleavage of the Drosophila Notch receptor. *Dev Cell* , 2, pp. 69-78.
125. Hussain, I., Powell, D. J., Howlett, D. R., Chapman, G. A., Gilmor, L., Murdock, P. R., et al. (2000). ASP1 (BACE2) cleaves the amyloid precursor protein at the beta-secretase site. *Mol Cell Neurosci* , 16, pp. 609-619.
126. Hutchens, M., Nakano, T., Kosaka, Y., Dunlap, J., Zhang, W., Herson, P., et al. (2010). Estrogen Is Renoprotective via a Nonreceptor-dependent Mechanism after Cardiac Arrest In Vivo. *Anesthesiology* , 112, pp. 395-405.

127. Hutton, M., Busfield, F., Wragg, M., Crook, R., Perez-Tur, J., Clark, R. F., et al. (1996). Complete analysis of the presenilin 1 gene in early onset Alzheimer's disease. *Neuroreport* , 7, pp. 801-805.
128. Ignatius, M. J., Gebicke-Harter, P. J., Skene, J. H., Schiling, J. W., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W., et al. (1986). Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* , 83, pp. 1125-1129.
129. Iqbal, K., Alonso, A. C., & Chen, S. (2005). Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochem Biophys Acta* , pp. 198-210.
130. Jaffe, A. B., Toran-Allerand, C. D., Greengard, P., & Gandy, S. E. (1994). Estrogen regulates metabolism of Alzheimer amyloid beta precursor protein. *J Biol Chem* , 269, pp. 13065-13068.
131. Jellinger, K. A., & Bancher, C. (1998). Senile dementia with tangles (tangle predominant form of senile dementia). *Brain Pathol* , 8, pp. 367-376.
132. Jhoo, J. H., Kim, K. W., Lee, D. Y., Lee, K. U., Lee, J. H., Kim, S. Y., et al. (2001). Association of alpha-2-macroglobulin deletion polymorphism with sporadic Alzheimer's disease in Koreans. *Neurol Sci* , 184, pp. 21-25.
133. Johannes, C. B., & Crawford, S. L. (1999). Menstrual bleeding, hormones, and the menopausal transition. *Semin Reprod Endocrinol* , 17, pp. 299-309.
134. Johnson, M. H., & Everitt, B. J. (1995). *Essential Reproduction*. Oxford, Great Britain: Blackwell Science Ltd.
135. Jurevics, H. A., & Morell, P. (1994). Sources of cholesterol for kidney and nerve during development. *J Lipid Res* , 35, pp. 112-120.
136. Kalache, A. (1998). Os idosos brasileiros no século XXI: demografia, saúde e sociedade. In: Chaimowicz. Belo Horizonte.
137. Kalaria, R. N., Cohen, D. L., Greenberg, B. D., Savage, M. J., Bogdanovic, N. E., Winblad, B., et al. (1996a). Abundance of the longer Aβ₄₂ in neocortical and cerebrovascular amyloid beta deposits in Swedish familial Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Neuroreport* , 7, pp. 1377-1381.
138. Kang, D. E., Saitoh, T., Chen, X., Xia, Y., Masliah, E., Hansen, L. A., et al. (1997). Genetic association of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* , 49, pp. 56-61.
139. Karlinsky, H., Vaula, G., Haines, J. L., Ridgley, J., Bergeron, C., Mortilla, M., et al. (1992). Molecular and prospective phenotypic characterization of a pedigree with familial Alzheimer's disease and a missense mutation in codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Neurology* , 42, pp. 1445-1453.
140. Katzman, R. (1993). Education and the prevalence of dementia and Alzheimer's disease. *Neurology* , 43, pp. 13-20.

141. Kimberly, W. T., & Wolfe, M. S. (2003). Identity and function of gamma-secretase. *J Neurosci Res* , 74, pp. 353-360.
142. Kimberly, W., Xia, W., & Rahmati, T. (2000). The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *J Biol Chem* , 275 (5), pp. 3173-3178.
143. Kinoshita, A., Fukumoto, H., Shah, T., Whelan, C. M., Irizarry, M. C., & Hyman, B. T. (2003). Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *J Cell Sci* , 116, pp. 3339-3346.
144. Kivipelto, M., Helkala, E. L., Laakso, M. P., Hanninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., et al. (2001). Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *Bmj* , 322, pp. 1447-1451.
145. Klein, W., Kraft, G., & Finch, C. (2001). Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci* , 24, pp. 219-224.
146. Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W., & Fahrenholz, F. (2001). Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha-secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci USA* , 98, pp. 5815-5820.
147. Kovacs, D., Fausett, H., & Page, K. (1996). Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat Med* , 2 (2), pp. 224-229.
148. Kowal, R. C., Herz, J., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1990). Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* , 265, pp. 10771-10779.
149. Kunugi, H., Ueki, A., Otsuka, M., Isse, K., Hirasawa, H., Kato, N., et al. (2001). A novel polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene associated with late-onset Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* , 6 (1), pp. 83-86.
150. LaDu, M. J., Falduto, M. T., Manelli, A. M., Reardon, C. A., Getz, G. S., & Frail, D. E. (1994). Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. *J Biol Chem* , 269, pp. 23403-23406.
151. Lah, F., & Levey, A. I. (2000). Endogenous presenilin-1 targets to endocytic rather than biosynthetic compartments. *Mol Cell Neurosci* , 16, pp. 111-126.
152. Lamb, B. T., Bardel, K. A., Kulnane, L. S., Anderson, J. J., Holtz, G., Wagner, S. L., et al. (1999). Amyloid production and deposition in mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 yeast artificial chromosome transgenic mice. *Nat Neurosci* , 2, pp. 695-697.
153. Lamb, B. T., Call, L. M., Slunt, H. H., Bardel, K. A., Lawler, A. M., Eckman, C. B., et al. (1997). Altered metabolism of familial Alzheimer's disease-linked amyloid

precursor protein variants in yeast artificial chromosome transgenic mice. *Hum Mol Genet* , 6, pp. 1535-1541.

154. Lamb, B. T., Sisodia, S. S., Lawler, A. M., Slunt, H. H., Kitt, C. A., Keams, W. G., et al. (1993). Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice [corrected]. *Nat Genet* , 5, pp. 22-30.
155. Lambert, J. C., Berr, C., Pasquier, F., Delacourte, A., Frigard, B., Cotel, D., et al. (1998). Pronounced impact of Th1/E47cs mutation compared with -491 AT mutation on neural APOE gene expression and risk of developing Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* , 7, pp. 1511-1516.
156. Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., et al. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* , 96, pp. 3922-3927.
157. Laws, S. M., Hone, E., Taddei, K., Harper, C., Dean, B., McClean, C., et al. (2002). Variation at the APOE -491 promoter locus is associated with altered brain levels of apolipoprotein E. *Mol Psychiatry* , 7, pp. 886-890.
158. Lee, S. J., Lenton, E. A., Sexton, L., & Cooke, I. D. (1988). The effect of age on the cyclical patterns of plasma LH, FSH, oestradiol and progesterone in women with regular menstrual cycles. *Hum Reprod* , 3, pp. 851-855.
159. Lehman, E. J., Kulnane, L. S., & Lamb, B. T. (2003b). Alterations in beta-amyloid production and deposition in brain regions of two transgenic models. *Neurobiol Aging* , 24, pp. 645-653.
160. Lehman, E. J., Kulnane, L. S., Gao, Y., Petriello, M. C., Pimpis, K. M., Younkin, L., et al. (2003a). Genetic background regulates beta-amyloid precursor protein processing and beta-amyloid deposition in the mouse. *Hum Mol Genet* , 12, pp. 2949-2956.
161. Leoni, V., Masterman, T., Patel, P., Meaney, S., Diczfalusy, U., & Bjorkhem, I. (2003). Side chain oxidized oxysterols in cerebrospinal fluid and the integrity of blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *J Lipid Res* , 44, pp. 793-799.
162. Levin-Allerhand, J., Lominska, C., Wang, J., & Smith, J. (2002). 17alpha-estradiol and 17beta-estradiol treatments are effective in lowering cerebral amyloid-beta levels in AbetaPPSWE transgenic mice. *J Alzheimers Dis* , 4, pp. 44-457.
163. Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., Pettingell, W. H., et al. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* , 269, pp. 973-977.
164. Li, L., Cao, D., & Garber, D. W. (2003). Association of aortic atherosclerosis with cerebral beta-amyloidosis and learning deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* , 6, pp. 2155-2164.

165. Li, Y. M., Lai, M. T., Xu, M., Huang, Q., DiMuzio-Mower, J., Sardana, M. K., et al. (2000). Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state. *Proc Natl Acad Sci USA* , 97, pp. 6138-6143.
166. Lipton, R. B., Goadsby, P., & Silberstein, S. D. (1999). Classification and epidemiology of headache. *Clin Cornerstone* , 1, pp. 1-10.
167. Litchfield, S., & Nagy, Z. (2001). New temperature modification makes the Bielschowsky silver stain reproducible. *Acta Neuropathol* , 101, pp. 17-21.
168. Louet, J., LeMay, C., & Mauvais-Jarvis, F. (2004). Antidiabetic actions of estrogen: Insight from human and genetic mouse models. *Current Atherosclerosis Reports* , 3, pp. 180-185.
169. Luine, V. N., Khylichevskaya, R. I., & McEwen, B. S. (1975). Effect of gonadal steroids on activities of monoamine oxidase and choline acetylase in rat brain. *Brain Res* , 86, pp. 293-306.
170. Lund, E. G., Xie, C., Kotti, T., Turley, S. D., Dietschy, J. M., & Russel, D. W. (2003). Knockout of the cholesterol 24-hydroxylase gene in mice reveals a brain-specific mechanism of cholesterol turnover. *J Biol Chem* , 278, pp. 22980-22988.
171. Lutjohann, D., Breuer, O., Ahlborg, G., Nennesmo, I., Siden, A., Diczfalusy, U., et al. (1996). Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc Natl Acad Sci USA* , pp. 9799-9804.
172. Maas, T., Eidenmuller, J., & Brandt, R. (2000). Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments. *J Biol Chem* , 275, pp. 15733-15740.
173. Maffucci, J., & Gore, A. (2006). Age-related changes in hormones and their receptors in animal models of female reproductive senescence. In: *Handbook of models for human aging* (pp. 533-552). New York: Elsevier.
174. Maffucci, J., & Gore, A. (2006). Age-related changes in hormones and their receptors in animal models of female reproductive senescence.
175. Mahley, R. W., & Innerarity, T. L. (1983). Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochim Biophys Acta* , 737, pp. 197-222.
176. Mann, D. M., Iwatsubo, T., Nochlin, D., Sumi, S. M., Levy-Lahad, E., & Bird, T. D. (1997a). Amyloid (Abeta) deposition in chromosome 1-linked Alzheimer's disease: the Volga German families. *Ann Neurol* , 41, pp. 52-57.
177. Marner, L., Nyengaard, J., Tang, Y., & Pakkenberg, B. (2003). Marked loss of myelinated nerve fibers in the human brain with age. *J Comp Neurol* , 462 (2), pp. 144-152.
178. Marsha, M. M., Walkera, R., Curtissa, L., & Bankaa, C. L. (1999). Protection against atherosclerosis by estrogen is independent of plasma cholesterol levels in LDL receptor-deficient mice. *The Journal of Lipid Research* , 40, pp. 893-900.

179. Maruyama, K., Tomita, T., Shinozaki, K., Kume, H., Asada, H., Saido, T. C., et al. (1996). Familial Alzheimer's disease-linked mutations at Val717 of amyloid precursor protein are specific for the increased secretion of A beta 42(43). *Biochem Biophys Res Commun* , 227, pp. 730-735.
180. Mattson, P. (2008). Glutamate and Neurotrophic Factors in Neuronal Plasticity and Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* , 1144, pp. 97-90.
181. Mauch, D. H., Nagler, K., Schumacher, S., Goritz, C., Muller, E. C., Otto, A., et al. (2001). CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* , 254, pp. 1354-1357.
182. McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (1996). Anti-inflammatory drugs in the fight against Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* , 777, pp. 213-220.
183. Meinhardt, U., & Mullis, P. (2002). The essential role of the aromatase/p450arom. *Semin Reprod Med* , 20 (3), pp. 277-284.
184. Miller, M. M., Hyder, S. M., Assayag, R., Panarella, S. R., Tousignant, P., & Franklin, K. B. (1999). Estrogen modulates spontaneous alternation and the cholinergic phenotype in the basal forebrain. *Neuroscience* , 91, pp. 1143-1153.
185. Miller, N. (1982). Coronary atherosclerosis and plasma lipoproteins: epidemiology and pathophysiologic considerations. *J Cardiovasc Pharmacol* , 4, pp. S190-195.
186. Mirra, S. S., Hart, M. N., & Terry, R. D. (1993). Making the diagnosis of Alzheimer's Disease. *Arch Pathol Lab Med* , 117, pp. 132-144.
187. Moffat, S., & Hampson, E. (1996). A curvilinear relationship between testosterone and spatial cognition in humans: possible influence of hand preference. *Psychoneuroendocrinology* , 21 (3), pp. 323-337.
188. Moffat, S., Zonderman, A., Metter, E., Kawas, C., Blackman, M., Harman, S., et al. (2004). Free testosterone and risk for Alzheimer disease in older men. *Neurology* , 62 (2), pp. 188-193.
189. Mooradian, A., Morley, J., & Korenman, S. (1987). Biological actions of androgens. *Endocr Rev* , 8 (1), pp. 1-28.
190. Morishima-Kawashima, M., Oshima, N., Ogata, H., Yamaguchi, H., Yoshimura, M., Sugihara, S., et al. (2000). Effect of apolipoprotein E allele epsilon4 on the initial phase of amyloid beta-protein accumulation in the human brain. *Am J Pathol* , 157, pp. 2093-2099.
191. Mortiner, J. A., van Duijn, C. M., Chandra, V., Fratiglioni, L., Graves, A. B., Heyman, A., et al. (1991). Head trauma as a risk factor for Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. *Int J Epidemiol* , 20, pp. S28-35.
192. Mucke, L., Masliah, E., Yu, G. Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., Tatsuno, G., et al. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human

- amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* , 20, pp. 4050-4058.
193. Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., et al. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* , 1, pp. 345-347.
 194. Murrell, J., Farlow, M., Ghetti, B., & Benson, M. D. (1991). A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* , 254, pp. 97-99.
 195. Muse, E. D., Jurevics, H., Toews, A. D., Matsushima, G. K., & Morell, P. (2001). Parameters related to lipid metabolism as markers of myelination in mouse brain. *J Neurochem* , 76, pp. 77-86.
 196. Nacmias, B., Tedde, A., Cellini, E., Forleo, P., Orlacchio, A., Gaurneri, B. M., et al. (2001). Alpha2-macroglobulin polymorphisms in Italian sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* , 299, pp. 9-12.
 197. Nathan, B. P., Chang, K. C., Bellosta, S., Brisch, E., Ge, N., Mahley, R. W., et al. (1995). The inhibitory effect of apolipoprotein E4 on neurite outgrowth is associated with microtubule depolymerization. *J Biol Chem* , 270, pp. 19791-19799.
 198. NITRINI, R. (1999). Epidemiologia da doença de Alzheimer no Brasil. *Rev. Psiq. Clin.* , 26 (5).
 199. Osono, Y., Woollet, L. A., Herz, J., & Dietschy, J. M. (1995). Role of the low density lipoprotein receptor in the flux of cholesterol through the plasma and across the tissues of the mouse. *J Clin Invest* , 95, pp. 1124-1132.
 200. Paganini-Hill, A., & Henderson, V. W. (1996). Estrogen replacement therapy and risk of Alzheimer disease. *Arch Intern Med* , 156, pp. 2213-227.
 201. Palacios, G., Palacios, J. M., Mengod, G., & Frey, P. (1992). Beta-amyloid precursor protein localization in the Golgi apparatus in neurons and oligodendrocytes. An immunocytochemical structural and ultrastructural study in normal and axotomized neurons. *Brain Res Mol Brain Res* , 15, pp. 195-206.
 202. Papassotiropoulos, A., Lutjohann, D., Bagli, M., Locatelli, S., Jessen, F., Buschfort, R., et al. (2002). 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia. *J Psychiatr Res* , 36, pp. 27-32.
 203. Papassotiropoulos, A., Lutjohann, D., Bagli, M., Locatelli, S., Jessen, F., Rao, M. L., et al. (2000). Plasma 24S-hydroxycholesterol: a peripheral indicator of neuronal degeneration and potential state marker for Alzheimer's disease. *Neuroreport* , 11, pp. 1959-1962.
 204. Pappolla, M. A., Bryant-Thomas, T. K., Helbert, D., Pacheco, J., Fabra Garcia, M., Manjon, M., et al. (2003). Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology* , 61, pp. 199-205.

205. Park, I. H., Hwang, E. M., & Hong, H. S. (2003). . Lovastatin enhances Abeta production and senile plaque deposition in female Tg2576 mice. *Neurobiol Aging* , 5, pp. 637-643.
206. Pasternak, S. H., Bagshaw, R. D., Guiral, M., Zhang, S., Ackerley, C. A., Pak, B. J., et al. (2003). Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane. *J Biol Chem* , 278, pp. 26687-26694.
207. Patapoutian, A., & Reichardt, L. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* , 3 (11), pp. 272-280.
208. Paxinos, G., & Franklin, K. B. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. California: Academic Press.
209. Pendse, A., Arbones-Mainar, J., Johnson, L., Alternburg, M., & Maeda, N. (2009). ApoE Knock-out and Knock-in Mice: Atherosclerosis, Metabolic Syndrome, and Beyond. *J. Lipid Res.* , 50, pp. S178-S182.
210. Pericak-Vance, M. A., Yamaoka, L. H., Haynes, C. S., Speer, M. C., Haines, J. L., Gaskell, P. C., et al. (1988). Genetic linkage studeis in Alzheimer's disease families. *Exp Neurol* , 3, pp. 271-279.
211. Petanceska, S., Nagy, V., Frail, D., & Gandy, S. (2000). Ovariectomy and 17beta-estradiol modulate the levels of Alzheimer's amyloid beta peptides in brain. *Experimental Gerontology* , 35, pp. 1317-1325.
212. Piedrahita, J., Zhang, S., Hagaman, J., Oliver, P., & Maeda, N. (1992). Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* , 89, pp. 4471-4475.
213. Pike, C., Rosario, E., & Nguyen, T. (2006). Androgens, aging, and Alzheimer's disease. *Endocrine* , 29 (2), pp. 233-241.
214. Pirttila, T., Soininen, H., Heinonen, O., Lehtimaki, T., Bogdanovic, N., Paljarvi, L., et al. (1996). Apolipoprotein E (apoE) levels in brains from Alzheimer disease patients and controls. *Brain Res* , 722, pp. 71-77.
215. Pitas, R. E., Boyles, J. K., Lee, S. H., Hui, D., & Weisgraber, K. H. (1987). Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *J Biol Chem* , 262, pp. 14352-14360.
216. Plump, A., & Breslow, J. (1995). Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. *Anual Rev Nutr* , 15, pp. 495-518.
217. Plump, A., Smith, J., Hayek, T., Aalto-Setala, K., Walsh, A., Verstuyft, J., et al. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* , 71, pp. 343-353.

218. Poirier, J., Hess, M., May, P. C., & Finch, C. E. (1991). Cloning of hippocampal poly(A) RNA sequences that increase after entorhinal cortex lesion in adult rat. *Brain Res Mol Brain Res* , 9, pp. 191-195.
219. Pugazhenti, S., Nesterova, A., Sable, C., Heidenreich, K. A., Boxer, L. M., Heasley, L. E., et al. (2000). Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* , 275, pp. 10761-10766.
220. Puglielli, L., Konopka, G., & Pack-Chung, E. (2001). Acyl-Coenzyme A: Cholesterol Acyltransferase (ACAT) modulates the generation of the amyloid b-peptide. *Nat Cell Bio* , pp. 905-912.
221. Qiu, C., Backman, L., Winblad, B., Aguero-Torres, H., & Fratiglioni, L. (2001). The influence of education on clinically diagnosed dementia incidence and mortality data from the Kungsholmen Project. *Arch Neurol* , 58, pp. 2034-2039.
222. Quan, G., Xie, C., Dietschy, J. M., & Turley, S. D. (2003). Ontogenesis and regulation of cholesterol metabolism in the central nervous system of the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* , 146, pp. 87-98.
223. Raber, J., Huang, Y., & Ashford, J. W. (2004). ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol Aging* , 25, pp. 641-650.
224. Rabinowicz, T., Dean, D., Petetot, J., & de Courten-Myers, G. (1999). *Gender differences in the human cerebral cortex: more neurons in males; more processes in females*. Lausanne, Switzerland: Journal of Child Neurology.
225. Raiha, I., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Rajala, T., & Sourander, L. (1996). Alzheimer's disease in Finnish twins. *Lancet* , 347, pp. 573-578.
226. Ramos, L. R., Veras, R. P., & Kalache, A. (1987). Population aging: a Brazilian reality. *Rev Saúde Pública* , pp. 212-224.
227. Randall, V. (1994). Role of 5 alpha-reductase in health and disease. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* , 8 (2), pp. 405-431.
228. Rebeck, G. W., Reiter, J. S., Strickland, D. K., & Hyman, B. T. (1993). Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* , 11, pp. 575-580.
229. Reed, W., Clark, M., Parker, P., Raouf, S., Arguedas, N., Monk, D., et al. (2006). Physiological effects on demography: a long-term experimental study of testosterone's effects on fitness. *Am Nat* , 167 (5), pp. 667-683.
230. Refolo, L. M., Pappolla, M. A., & Malester, B. (2000). Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* , pp. 321-331.
231. Refolo, L. M., Sambamurti, K., Efthimiopoulos, S., Pappolla, M. A., & Robakis, N. K. (1995). Evidence that secretase cleavage of cell surface Alzheimer amyloid

- precursor occurs after normal endocytic internalization. *Neurosci Res* , 40, pp. 694-706.
232. Riddell, D. R., Christie, G., Hussain, I., & Dingwall, C. (2001). Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density noncaveolar lipid rafts. *Curr Biol* , 11, pp. 1288-1293.
233. Riemenschneider, M., Schwarz, S., Wagenpfeil, S., Diehl, J., Müller, U., Förstl, H., et al. (2002). A polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is associated with Alzheimer's disease in patients lacking the Apolipoprotein E epsilon4 allele. *Mol Psychiatry* , 7 (7), pp. 782-785.
234. Rocchi, A., Pellegrini, S., Siciliano, G., & Murri, L. (2003). Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res Bull* , 61, pp. 1-24.
235. Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., et al. (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* , 376, pp. 775-778.
236. Rogaeva, E. A., Premkumar, S., & Grubber, J. (1999). An alpha-2-macroglobulin insertion-deletion polymorphism in Alzheimer's disease. *Nat Genet* , 1, pp. 19-22.
237. Rosario, E., Chang, L., Stanczyk, F., & Pike, C. (2004). Age-related testosterone depletion and the development of Alzheimer disease. *JAMA* , 292 (12), pp. 1431-1432.
238. Runz, H., Rietdorf, J., Tomic, I., de Bernard, M., Beyreuther, K., Pepperkok, R., et al. (2002). Inhibition of intracellular cholesterol transport alters presenilin localization and amyloid precursor protein processing in neuronal cells. *J Neurosci* , 22, pp. 1679-1689.
239. Saito, H., Dhanasekaran, P., Baldwin, F., Weisgraber, K. H., Phillips, M. C., & Lund-Katz, S. (2003). Effects of polymorphism on the lipid interaction of human apolipoprotein E. *J Biol Chem* , 278, pp. 40723-40729.
240. Santoro, N. (2002). The menopause transition: an update. *Hum Reprod Update* , 8, pp. 155-160.
241. Santoro, N., Brown, J. R., Adel, T., & Skurnick, J. H. (1996). Characterization of reproductive hormonal dynamics in the perimenopause. *J Clin Endocrinol Metab* , 81, pp. 1495-1501.
242. Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D., George-Hyslop, P. H., Pericak-Vance, M. A., Joo, S. H., et al. (1993). Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* , 43, pp. 1467-1472.
243. Savage, M., Trusko, S., Howland, D., Pinsky, L., Mistretta, S., Reaume, A., et al. (1998). Turnover of amyloid beta-protein in mouse brain and acute reduction of

its level by phorbol ester. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society For Neuroscience.* , 18, pp. 1743-1752.

244. Schaefer, E., Gregg, R., Ghiselli, G., Forte, T., Ordovas, J., Zech, L., et al. (1986). Familial apolipoprotein E deficiency. *J Clin Invest* , 78, pp. 1206-1219.
245. Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., et al. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* , 2, pp. 864-870.
246. Schmechel, D., Sullivan, P., & Mace, B. (2002). High saturated fat diets are associated with abeta deposition in primates. *Neurobiol Aging* , p. S323.
247. Schonknecht, P., Pantel, J., Klinga, K., Jensen, M., Hartmann, T., Salbach, B., et al. (2001). Reduced cerebrospinal fluid estradiol levels are associated with increased beta-amyloid levels in female patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* , 307, pp. 122-124.
248. Schumacher, M., Guennoun, R., Ghomari, A., Massaad, C., Robert, F., El-Etr, M., et al. (2007). Novel perspectives for progesterone in hormone replacement therapy, with special reference to the nervous system. *Endocr Rev* , 28, pp. 387-439.
249. Schumacher, M., Guennun, R., Robert, F., Carelli, C., Gago, N., Ghomari, A., et al. (2004). Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Horm IGF Res* , 14 (Suppl A), pp. S18-33.
250. Selkoe, D. J. (1998). The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* , 8, pp. 447-453.
251. Sherman, B. M., & Korenmann, S. G. (1975). Hormonal characteristics of the human menstrual cycle throughout reproductive life. *J Clin Invest* , 55, pp. 699-706.
252. Sherrington, R., Rogaev, E., & Liang, Y. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* , 375 (6534), pp. 754-760.
253. Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S. R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., et al. (2000). Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* , 106, pp. 1489-1499.
254. Shie, F. S., Jin, L. W., & Cook, D. G. (2002). Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport* , 4, pp. 455-459.
255. Shinozaki, K., Maruyama, K., & Kume, H. (1998). The presenilin 2 loop domain interacts with the mu-calpain C-terminal region. *Int J Mol Med* , 1 (5), pp. 797-799.

256. Shumaker, S. A., Legault, C., Rapp, S. R., Thal, L., Wallace, R. B., & Ockene, J. K. (2003). Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA* , 289, pp. 2651-2662.
257. Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C. G., & Simons, K. (1998). Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* , 95, pp. 6460-6464.
258. Singer, C. A., Figueroa-Masot, X. A., Batchelor, R. H., & Dorsa, D. M. (1999). The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neuroscience* , 19, pp. 2455-2463.
259. Skovronsky, D. M., Moore, D. B., Milla, M. E., Doms, R. W., & Lee, V. M. (2000). Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J Biol Chem* , 275, pp. 2568-2575.
260. Smith, M., Kwok, J., & McLean, C. (2001). Variable phenotype of Alzheimer's disease with spastic paraparesis. *Ann Neurol* , 49 (1), pp. 125-129.
261. Snipes, G. J., & Suter, U. (1997). Cholesterol and myelin. *Subcell Biochem* , 28, pp. 173-204.
262. Snowdon, D. A., Ostwald, S. K., & Kane, R. L. (1989). Education, survival, and independence in elderly Catholic sisters, 1936-1988. *Am J Epidemiol* , 130, pp. 999-1012.
263. Spady, D. K., Huettinger, M., Bilheimer, D. W., & Dietschy, J. M. (1987). Role of receptor-independent low density lipoprotein transport in the maintenance of tissue cholesterol balance in the normal and WHHL rabbit. *J Lipid Res* , 28, pp. 32-41.
264. Strittmatter, W., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., et al. (1993a). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* , 90, pp. 1977-1981.
265. Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K. H., Mistl, C., Rothacher, S., et al. (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* , 94, pp. 13287-13292.
266. Swaab, D., & Garcia-Falgueras, A. (2009). Sexual differentiation of the human brain in relation to gender identity and sexual orientation. *Funct Neurol* , 24 (1), pp. 17-28.
267. Taffe, J., Garamszegi, C., Dudley, E., & Dennerstein, L. (1997). Determinants of self rated menopause status. *Maturitas* , 27, pp. 223-229.

268. Takashima, A., Murayama, M., & Murayama, O. (1998). Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3 β and its substrate tau. *Acad Sci USA* , 95 (16), pp. 9637-9641.
269. Tanzi, R. E., Gusella, J. F., Watkins, P. C., Bruns, G. A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M. L., et al. (1987). Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* , 235, pp. 880-884.
270. Tashiro, K., Hasegawa, M., Ihara, Y., & Iwatsubo, T. (1997). Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex. *Neuroreport* , 8, pp. 2797-2801.
271. Tomita, T., Maruyama, K., Saido, T. C., Kume, H., Shinozaki, K., Tokuhira, S., et al. (1997). The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid beta protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. *Proc Natl Acad Sci USA* , 94, pp. 2025-2030.
272. Toran-Allerand, C. D., Singh, M., & Setalo, G. J. (1999). Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. *Front Neuroendocrinol* , 20, pp. 97-121.
273. Town, T., Paris, D., Fallin, D., Duara, R., Barker, W., Gold, M., et al. (1998). The -491A/T apolipoprotein E promoter polymorphism association with Alzheimer's disease: independent risk and linkage disequilibrium with the known APOE polymorphism. *Neurosci Lett* , 252, pp. 95-98.
274. Trager, L. (1977). *Steroidhormone: Biosynthese, Stoffwechsel, Wirkung*. German: Springer-Verlag.
275. Ueki, A., Kawano, M., Namba, Y., Kawakami, M., & Ikeda, K. (1993). A high frequency of apolipoprotein E4 isoprotein in Japanese patients with late-onset nonfamilial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* , 163, pp. 166-168.
276. Urano, Y., Hayashi, I., Isoo, N., Reid, P. C., Shibasaki, Y., Noguchi, N., et al. (2005). Association of active γ -secretase complex with lipid rafts. *J Lipid Res* , 46, pp. 904-912.
277. Utermann, G., Hees, M., & Steinmetz, A. (1977). Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinaemia in man. *Nature* , 269, pp. 604-607.
278. Utermann, G., Kindermann, I., Kaffarnik, H., & Steinmetz, A. (1984). Apolipoprotein E phenotypes and hyperlipidemia. *Hum Genet* , 65, pp. 232-236.
279. Van Broeckhoven, C. (1995). Presenilins and Alzheimer disease. *Nat Genet* , 11, pp. 230-232.
280. Van Broeckhoven, C., Backhovens, H., Cruts, M., Martin, J. J., Crook, R., Houlden, H., et al. (1994). APOE genotype does not modulate age of onset in families with chromosome 14 encoded Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* , 169, pp. 179-180.

281. Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., et al. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* , 286, pp. 735-741.
282. Ventriglia, M., Bocchio, C. L., Benussi, L., Binetti, G., Zanetti, O., Riva, M., et al. (2002). Association between the BDNF 196 A/G polymorphism and sporadic Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* , 7 (2), pp. 136-137.
283. Vetrivel, K. S., Cheng, H., Lin, W., Sakurai, T., Li, T., Nukina, N., et al. (2004). Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J Biol Chem* , 279, pp. 44945-44954.
284. Vincent, B., & Smith, J. (2000). Effect of estradiol on neuronal Swedish-mutated beta-amyloid precursor protein metabolism: reversal by astrocytic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 271, pp. 82-85.
285. von Strauss, E., Viitanen, M., De Ronchi, D., Winblad, B., & Fratiglioni, L. (1999). Aging and the occurrence of dementia: findings from a population-based cohort with a large sample of nonagenarians. *Arch Neurol* , 56, pp. 587-592.
286. Wada, S., Morishima-Kawashima, M., Qi, Y., Misono, H., Shimada, Y., Ohno-Iwashita, Y., et al. (2003). Gamma-secretase activity is present in rafts but is not cholesterol-dependent. *Biochemistry* , 42, pp. 13977-13986.
287. Wahrle, S., Das, P., Nyborg, A. C., McLendon, C., Shoji, M., Kawarabayashi, T., et al. (2002). Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol Dis* , 9, pp. 11-23.
288. Wajchenberg, B. L. (2000). Tecido Adiposo como Glândula Endócrina. *Arq Bras Endocrinol Metab* , 44, pp. 13-20.
289. Walker, E., Martinez, M., Brunkan, A. L., & Goate, A. (2005). Presenilin 2 familial Alzheimer's disease mutations result in partial loss of function a dramatic changes in Aβ₄₂/Aβ₄₀ ratios. *J Neurochem* , 92, pp. 294-301.
290. Welsh, K. A., Butters, N., Hughes, J. P., Mohs, R. C., & Heyman, A. (1992). Detection and staging of dementia in Alzheimer's disease. Use of the neuropsychological measures developed for the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease. *Arch Neurol* , 49, pp. 448-452.
291. WHO. (s.d.). *Wor.* Acesso em 13 de Julho de 2010, disponível em <http://www.who.int/whosis/en/index.html>
292. WHO. (2003). *World Health Statistical Information System (WHOSIS) according 2003 Database.* Acesso em 13 de Julho de 2010, disponível em <http://www.who.int/whosis/en/index.html>
293. WHO, S. G. (1996). Research on the menopause in the 1990s. World Health Organ Tech Rep Ser.
294. Wilson, J. (2001). Androgens, androgen receptors, and male gender role behavior. *Horm Behav* , 40 (2), pp. 358-366.

295. Wischik, C., & Crowther, R. (1985). Subunit structure of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* , 100, pp. 1905-1912.
296. Wisniewski, K. E., Dalton, A. J., McLachlan, C., Wen, G. Y., & Wisniewski, H. M. (1985). Alzheimer's disease in Down's syndrome: clinicopathologic studies. *Neurology* , 35, pp. 957-961.
297. Wolfe, M., Xia, W., & Ostaszewski, B. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* , 398 (6727), pp. 513-517.
298. Wolozin, B., Alexander, P., & Palacino, J. (1998). Regulation of apoptosis by presenilin 1. *Neurobiol Aging* , 1 Suppl, pp. S23-27.
299. Woolley, C. S., Gould, E., Frankfurt, M., & McEwen, B. S. (1990). Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* , 10, pp. 4035-4039.
300. Xie, C., Lund, E. G., Turley, S. D., Russell, D. W., & Dietschy, J. M. (2003). Quantitation of two pathways for cholesterol excretion from the brain in normal mice and mice with neurodegeneration. *J Lipid Res* , 44, pp. 1780-1789.
301. Xu, H., Gouras, G., Greenfield, J., Vincent, B., Naslund, J., Mazzarelli, L., et al. (1998). Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer β -amyloid peptides. *Nature Med* , 4, pp. 447-451.
302. Xu, P. T., Gilbert, J. R., Qiu, H. L., Ervin, J., Rothrock-Christian, T. R., Hulette, C., et al. (1999). Specific regional transcription of apolipoprotein E in human brain neurons. *Am J Pathol* , 154, pp. 601-611.
303. Yaffe, K., Sawaya, G., Lieberburg, I., & Grady, D. (1998). Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. *Jama* , 279, pp. 688-695.
304. Yan, R., Han, P., Miao, H., Greengard, P., & Xu, H. (2001). The transmembrane domain of the Alzheimer's beta-secretase (BACE1) determines its late Golgi localization and access to beta -amyloid precursor protein (APP) substrate. *J Biol Chem* , 276, pp. 36788-36796.
305. Yin, W., & Gore, A. (2006). Neuroendocrine control of reproductive aging: roles of GnRH neurons. *Reproduction* , pp. 403-414.
306. Yue, X., Lu, M., Lancaster, T., Cao, P., Honda, S., Staufenbiel, M., et al. (2005). Brain estrogen deficiency accelerates Abeta plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. *Proc Natl Acad Sci USA* , 102, pp. 19198-19203.
307. Zdanys, K. F., Kleiman, T. G., Macavoy, M. G., Black, B. T., Rightmer, M. G., Garman, K. S., et al. (2007). Apolipoprotein E e4 Allele Increases Risk for Psychotic Symptoms in Alzheimer's Disease. *Neuropsychopharmacology* , pp. 171-179.

308. Zheng, H., Xu, H., Uljon, S., Gross, R., Hardy, K., Gaynor, J., et al. (2002). Modulation of A(beta) peptides by estrogen in mouse models. *Journal of Neurochemistry*, *80*, pp. 191-196.