

MICHELI PECHARKI

**RELAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES INIBIDORES COLINESTERÁSICOS
COM A ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE E A VARIANTE *L72M* DA
GRELINA EM PACIENTES COM DOENÇA DE ALZHEIMER.**

**Curitiba
2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
MICHELI PECHARKI**

**RELAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES INIBIDORES COLINESTERÁSICOS
COM A ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE E A VARIANTE *L72M* DA
GRELINA EM PACIENTES COM DOENÇA DE ALZHEIMER.**

**Monografia entregue ao Departamento
de Genética, da Universidade Federal
do Paraná, como requisito parcial para
a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.**

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Lehtonen
Rodrigues de Souza**

**Curitiba
2013**

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma demência senil caracterizada por um progressivo declínio da memória e de outras funções cognitivas, decorrentes do processo neurodegenerativo. Atualmente, os fármacos disponíveis para o tratamento da DA, os anti-colinesterásicos, também denominados inibidores colinérgicos (IChEs), visam o aumento da atividade de neurônios colinérgicos, por meio da inibição das enzimas Acetilcolinesterase (AChE) e Butirilcolinesterase (BChE), porém não inibem o avanço da doença. Diversos estudos têm demonstrado que a eficiência do tratamento com os IChEs e a atividade da BChE podem ser influenciados por variações genéticas do paciente. O objetivo do presente trabalho foi avaliar, através de um estudo caso controle, o efeito dos inibidores colinérgicos sobre a atividade da BChE. Também foi avaliado o efeito da variante *L72M* do gene grelina (*GHRL*) sobre a atividade da BChE, uma vez que a BChE é uma das enzimas responsáveis pela desacetilação da grelina. Além disso, foi demonstrado que o gene da grelina influencia a expressão da BChE. Estudos indicam que o padrão de expressão do gene grelina está alterado na DA, além disso, ele parece ter um importante papel na memória e cognição, motivo pelo qual também foi avaliada a correlação existente entre a variante *L72M* do gene e a DA. Para o estudo, foi utilizado o plasma de 30 pacientes, prováveis DA, do ambulatório de Disfunção Cognitiva do HC-UFPR, tratados com os IChEs Donepezil (DNP) e Galantamina (GLT) (inibidores reversíveis da AChE) e Rivastigmina (RVG) (inibidor pseudo-irreversível da AChE e BChE). Os pacientes foram pareados por idade e escolaridade com 30 controles. A atividade da BChE nos pacientes tratados com RVG foi 13,4% menor e 7,9% maior nos pacientes tratados com DNP, comparado aos controles. O grupo tratado com GLT apresentou atividade similar à do controle (1,62% maior). A diminuição da atividade com uso da RVG era esperada devido a sua ação na inibição da BChE. Para os inibidores específicos da AChE, verificou-se que a GLT, que possui um mecanismo duplo de ação, não alterou o nível plasmático de atividade da BChE. Os pacientes tratados com DNP apresentaram nível aumentado da atividade, possivelmente pelo efeito de *feedback* da BChE em substituir a AChE. Comparando a atividade da BChE entre os três grupos, a atividade enzimática do grupo de

pacientes tratados com RVG foi menor comparada à média de atividade dos pacientes tratados com GLT e DNP (13,9% e 17,13%, respectivamente). Em relação ao efeito da variante estudada, *L72M*, sobre a atividade da BChE, foi observado que, tanto os pacientes quanto os controles idosos, heterozigotos para a variante estudada, apresentaram atividade da BChE maior comparada aos homozigotos *72LL*, mostrando que este é um fator que pode influenciar na resposta do paciente ao tratamento com o IChE. Estes dados sugerem que a resposta dos pacientes aos IChEs pode estar relacionada a outros fatores que afetam a atividade da BChE. Sendo assim, a medida da atividade dessa enzima pode ser uma possível variável a ser analisada durante o direcionamento do tratamento, uma vez que a resposta dos pacientes ao tratamento não é homogênea.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. INIBIDORES COLINESTERÁSICOS -----	13
TABELA 2. COMPOSIÇÃO DO TAMPÃO TKM1, UTILIZADO NA EXTRAÇÃO DO DNA -----	20
TABELA 3. COMPOSIÇÃO DO TAMPÃO TKM2, UTILIZADO NA EXTRAÇÃO DO DNA -----	20
TABELA 4. COMPOSIÇÃO DO TAMPÃO TE, UTILIZADO NA EXTRAÇÃO DO DNA -----	21
TABELA 5. MÉDIA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BUTIRILCOLINESTERASE E DESVIO-PADRÃO, DOS PACIENTES COM DOENÇA DE ALZHEMER TRATADOS COM OS INIBIDORES DONEPEZIL, GALANTAMINA E RIVASTIGMINA -----	22
TABELA 6. COMPARAÇÃO ENTRE A MÉDIA DA BCHE EM PACIENTES COM DA E CONTROLES E VARIAÇÃO PERCENTUAL ENTRE AS MÉDIAS - 23	
TABELA 7. VARIAÇÃO PERCENTUAL ENTRE A MÉDIA DA ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE DE PACIENTES TRATADOS COM RIVASTIGMINA, DONEPEZIL E GALANTAMINA -----	23
TABELA 8. PONTUAÇÃO NO MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL E ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE -----	24
TABELA 9. PORCENTAGEM DE PACIENTES TRATADOS COM RIVASTIGMINA, DONEPEZIL OU GALANTAMINA QUE APRESENTARAM MELHORA, PIORA OU NENHUMA MUDANÇA NA PONTUAÇÃO NO MEEM E MÉDIA DA ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE -----	25
TABELA 10. ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE E GENÓTIPO -----	25

TABELA 11. FREQUENCIAS GENÓTIPICAS DA VARIANTE *L72M* DO GENE GRELINA, EM PACIENTES COM DA E CONTROLES SAUDÁVEIS E RESULTADOS DO χ^2 E VALOR DE P-----26

TABELA 12. FREQUENCIAS ALÉLICAS DA VARIANTE *L72M* DO GENE GRELINA, EM PACIENTES COM DA E CONTROLES SAUDÁVEIS E RESULTADOS DO χ^2 E VALOR DE P-----26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 A DOENÇA DE ALZHEIMER	9
1.2 COLINESTERASES	11
1.3 TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER	13
1.4 VARIANTES GENÉTICAS E TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER	16
1.6 GENE GRELINA	17
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BUTIRILCOLINESTERASE	20
3.1.1 AMOSTRAS	20
3.1.2 MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	21
3.2 GENOTIPAGEM	23
3.2.1 EXTRAÇÃO DE DNA	23
3.3 ANÁLISE DOS DADOS	24
4. RESULTADOS	25
4.1 ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE	25
4.1.1 INIBIDORES COLINESTERÁSICOS E ATIVIDADE DA BCHE	26
4.1.2 INIBIDORES COLINESTERÁSICOS E MINI-EXTAME DO ESTADO MENTAL	27
4.1.4 ATIVIDADE DA BCHE E VARIANTE <i>L72M</i> DO GENE GRELINA	29
4.2 GENOTIPAGEM	29
5. DISCUSSÃO	31
5.1 MEDIDA DA ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE	31

5.1.1 INIBIDORES COLINESTERÁSICOS E ATIVIDADE DA BCHE -----	31
5.1.2 ATIVIDADE DA BCHE E MEEM-----	32
5.1.3 ATIVIDADE DA BCHE E VARIANTE <i>L72M</i> DA <i>GHRL</i> -----	33
5.2 VARIANTE <i>L72M</i> DA <i>GHRL</i> E DOENÇA DE ALZHEIMER -----	33
6. CONCLUSÕES -----	35
6. REFERÊNCIAS -----	36

1. INTRODUÇÃO

1.1. A DOENÇA DE ALZHEIMER

A melhoria nas condições de vida, o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças bem como o diagnóstico precoce, tem contribuído para o acréscimo na expectativa de vida da população. Porém, com este acréscimo, houve conseqüentemente o aumento do número de idosos acometidos por demências.

A demência de Alzheimer pode ser definida como uma síndrome, caracterizada por declínio de memória associado a déficit de pelo menos outra função cognitiva como: capacidade de falar de forma coerente ou entender a linguagem falada ou escrita; capacidade de reconhecer ou identificar objetos mesmo com a função sensorial intacta; capacidade de executar atividades motoras, mesmo com as habilidades motoras e sensoriais intactas; e capacidade de pensar de forma abstrata, fazer julgamentos, planejar e realizar tarefas complexas. O declínio das capacidades cognitivas deve ser severo o suficiente para interferir na vida diária (American Psychiatric Association, 1994).

Dentre as demências mais comuns na população está a doença de Alzheimer (DA). Segundo dados populacionais globais mais de 100 milhões de pessoas serão portadores da DA em 2050. Atualmente a DA representa 50% a 75% de todos os casos de demência no mundo (Alzheimer's Disease International, 2012).

A doença de Alzheimer caracteriza-se por um processo degenerativo que acomete inicialmente o hipocampo e o córtex entorrinal, áreas do cérebro responsáveis pelo processamento das memórias declarativas. As memórias declarativas contêm informações adquiridas de maneira explícita, incluindo o conhecimento da história pessoal, acontecimentos cotidianos e informações acerca do mundo que nos rodeia (Lent, 2008).

Patologicamente, há na DA o acúmulo extracelular da proteína beta amiloide ($A\beta$) na forma de placas e nas paredes dos vasos sanguíneos (angiopatia amiloide cerebral) e o acúmulo intraneuronal da proteína tau hiperfosforidada, formando emaranhados neurofibrilares intracelulares, nas

extensões neuronais próximas às placas (neuritos distróficos) e em outros locais (Braak & Braak, 1991).

Além do progressivo declínio da memória e de outras funções cognitivas, decorrentes da morte de células nervosas em regiões específicas do cérebro, a produção do neurotransmissor acetilcolina também é afetada na DA (Alzheimer's Disease International, 2012; Braak & Braak, 1991).

Na doença de Alzheimer (AD), a deficiência da acetilcolina (ACh) é produzida pela atrofia do *nucleus basalis* de Meynert, fonte produtora da enzima colina acetiltransferase (CAT). Essa enzima é transportada para estruturas-alvo no Sistema Nervoso Central (SNC), como o córtex cerebral, formação hipocampal e amígdala onde catalisa a reação de síntese de acetilcolina a partir da colina e acetilcoenzima-A. Nessas regiões, ela catalisa a reação de síntese da ACh a partir de colina e acetilcoenzima A. Após formada, a ACh é liberada na fenda sináptica, onde pode ser acoplada aos receptores muscarínicos e nicotínicos. A ACh restante é degradada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) na fenda sináptica em colina e acetato (Figura 1). Uma vez que na DA há diminuição da síntese de CAT, há conseqüentemente diminuição da síntese de acetilcolina.

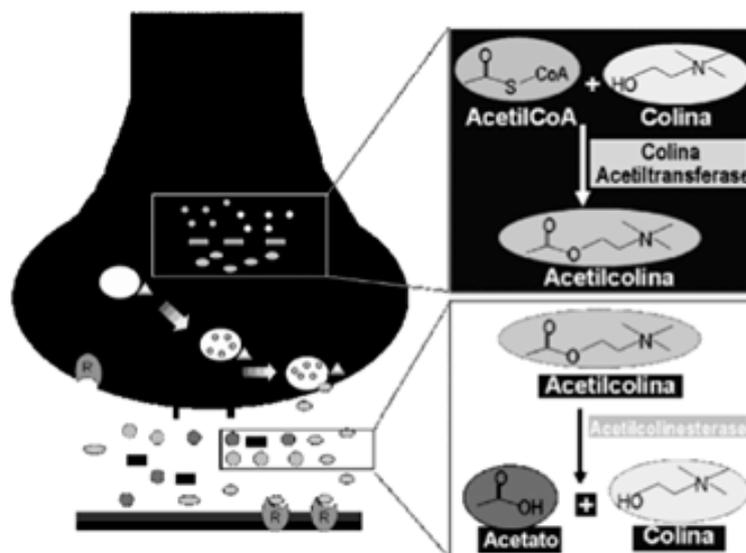


Figura 1. Síntese, liberação, degradação e recaptção da acetilcolina na fenda sináptica. Transportador vesicular de acetilcolina (▲), transportador de colina (■) e receptor de acetilcolina (R).

Fonte: Ventura, *et al.*, 2007.

Os fármacos disponíveis para o tratamento da DA, denominados Inibidores Colinesterásicos ou Colinérgicos (IChEs) baseiam-se na hipótese colinérgica. A hipótese colinérgica associa os sintomas cognitivos, comportamentais e funcionais presentes na AD com a perda dos neurônios colinérgicos causando deficiência na neurotransmissão (Cummings & Back, 1998).

Estes fármacos alteram a função colinérgica central aumentando a biodisponibilidade da acetilcolina para estimular os receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais, uma vez que inibem as enzimas que degradam a acetilcolina, a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE).

1.2. COLINESTERASES

Dois tipos de enzimas da colinesterase (ChE) estão presentes no cérebro humano: a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE). Embora essas enzimas possuam estruturas moleculares muito semelhantes, diferem com relação à distribuição, à especificidade do substrato e às funções (Chatonnet & Lockridge, 1989). A AChE está presente em terminais nervosos

colinérgicos (intraneuralmente, ligado à membrana ou na fenda sináptica) enquanto a BChE está associada à células da glia ou neurônios (Wright *et al.*, 1993; Mesulam & Geula, 1994).

Tanto a AChE quanto a BChE, são formadas por subunidades globulares catalíticas, que constituem as forma insolúveis encontradas no plasma (BChE) e no líquido cefalorraquidiano (AChE). Em outros locais, as unidades catalíticas encontram-se ligadas a proteínas semelhantes ao colágeno ou a glicolipídeos, por meio dos quais se prendem, à membrana das células ou à membrana basal em vários sítios, que incluem as sinapses colinérgicas (Rang *et al.*, 2007).

A AChE ligada, nas sinapses colinérgicas, age hidrolisando o transmissor liberado e encerra sua ação rapidamente. A AChE solúvel também está presente nas terminações nervosas colinérgicas, onde parece ter um papel na regulação da concentração de acetilcolina livre, e de onde pode ser secretada. A função da enzima secretada ainda não está clara (Rang *et al.*, 2007).

A BChE catalisa a hidrólise de ésteres de colina endógena como a acetilcolina, propionilcolina e preferencialmente a butirilcolina, além de atuar como um substituto da AChE, mantendo e regulando a transmissão colinérgica quando esta enzima está ausente ou com sua atividade comprometida (Li *et al.*, 2000; Silver, 1974). Layer *et al.*, (1992), sugerem que a BChE poderia contribuir fisiologicamente na hidrólise da acetilcolina sob circunstâncias especiais, tais como durante a diferenciação celular e o desenvolvimento embrionário. Experimentos com camundongos nulizogotos para AChE demonstraram que a BChE pode substituir a AChE exercendo uma função constitutiva de hidrólise da acetilcolina no cérebro normal (Mesulam *et al.*, 2002).

A BChE é amplamente distribuída no organismo e pode estar presente no plasma, músculo liso, pâncreas, adipócitos, pele, massa branca do cérebro e coração (WESCOE *et al.*, 1947). No cérebro, a BChE é expressa em um número elevado nas áreas neuronais de funções cognitivas, indicando que pode ter um papel importante nas funções dos circuitos tálamo-corticais e, portanto, na cognição (Darvesh *et al.*, 1998; Darvesh & Hopkins., 2003; Steriade *et al.*, 1997; Manoharan *et al.*, 2007).

Na Doença de Alzheimer, a BChE, por estar associada com os emaranhados neurofibrilares e placas amilóides, é sugerida como um potencial modulador da AD (Gómez-Ramos & Morán, 1997; Podoly *et al.*, 2009).

Disfunções dos sistemas centrais colinérgicos estão envolvidas com uma série de doenças neuropsiquiátricas, e são particularmente proeminentes nas demências senis, como a doença de Alzheimer (Francis *et al.*, 1999).

1.3. TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Com o intuito de aumentar a atividade de neurônios colinérgicos sobreviventes em pacientes com DA, inibidores da BChE e da AChE, tem sido desenvolvidos (Lahiri *et al.*, 2003).

Os anti-colinesterásicos (IChEs) constituem a primeira linha de tratamento para a doença de Alzheimer e foram os primeiros medicamentos aprovados pela FDA (US Food and Drug Administration) para o tratamento de déficits cognitivos nesta doença (Farlow *et al.*, 1992; Rogers & Friedhoff, 1996).

Apesar de a eficácia dos IChEs ser comprovada, a DA apresenta progressão mesmo com o tratamento. Os medicamentos mais utilizados no tratamento, são os IChEs de 2ª geração (Donepezil, Galantamina e Rivastigmina) que atuam melhorando os níveis de neuro-transmissores colinérgicos no cérebro por um certo tempo. Estes inibidores da colinesterase tem sido classificados como eficazes para AD leve ou moderada e o máximo que estas drogas podem alcançar é a modificação das manifestações clínicas na doença de Alzheimer de forma paliativa (Qaseem *et al.*, 2008). No Brasil, quatro medicamentos com essas características são licenciados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária: tacrina, rivastigmina, donepezil e galantamina.

Os inibidores da acetilcolinesterase são divididos em três grupos, os reversíveis, pseudo-irreversíveis e irreversíveis. Um inibidor enzimático é capaz de intervir, de maneira específica, na taxa de uma reação de catálise enzimática, retardando ou reduzindo o processo ou a especificidade biológica da reação (Nelson & Cox, 2006). Os inibidores reversíveis da AChE utilizados no tratamento da DA são o Donepezil, a Galantamina e a Tacrina, enquanto a Rivastigmina é um inibidor pseudo-irreversível (Tabela 01).

TABELA 1. INIBIDORES COLINESTERÁSICOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Fármaco	Duração e Ação	Principais Efeitos Colaterais	Observações
Tacrina	Ação de curta duração, reversível Afeta tanto a BChE quanto a AChE	Poucos efeitos colaterais colinérgicos Pode causar hepatotoxicidade	O primeiro anticolinesterásico a mostrar-se efetivo na doença de Alzheimer É necessário monitorar a toxicidade hepática
Donezepil	Ação de curta duração, reversível Seletivo para a AchE	Efeitos colaterais colinérgicos leves	
Galantamina	Reversível, não seletiva, afeta a AChE Reforça também a ativação do receptor nicotínico da acetilcolina por um mecanismo alostérico	Poucos efeitos colaterais	Postulado um mecanismo duplo de ação, uma vez que além de afetar a AChE, reforça a ativação do receptor nicotínico da ACh
Rivastigmina	Pseudo-irreversível Afeta tanto a AChE quanto a BChE	Os efeitos colaterais colinérgicos tendem a diminuir com a continuação do tratamento	Aumento gradual da dose para minimizar os efeitos colaterais

Adaptado de: Rang *et al.*; 2007.

1.3.1 TACRINA

A tacrina é um potente inibidor da AChE de ação central e foi o primeiro IChE aprovado para tratamento da DA (Freeman & Dawson, 1991).

Foi observada a ocorrência de cólicas abdominais, anorexia, náuseas, vômitos e diarreia em até 33% dos pacientes que receberam doses terapêuticas e foi constatada uma elevação dos níveis séricos de transaminases em até 50% dos pacientes tratados (Gilman, 2005). Apesar de

sua eficácia, apenas um baixo percentual de pacientes foi capaz de tolerar doses mais eficazes, devido aos efeitos colaterais (Alzheimer's Disease International, 2012).

1.3.2 DONEZEPIL

O donezepil é um inibidor seletivo da AChE no SNC, com pouco efeito sobre a AChE nos tecidos periféricos. Possui uma meia-vida longa, permitindo a administração de uma única dose ao dia. Os efeitos adversos colaterais incluem insônia, náuseas, vômitos e diarreia (Gilman, 2005).

1.3.3 RIVASTIGMINA

A rivastigmina é um inibidor pseudo-irreversível da AChE e da BChE, uma vez que ocorre dissociação temporal entre seus parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos. A interação da enzima com a rivastigmina na fenda sináptica, leva à formação de um produto de clivagem fenólico com atividade farmacológica mínima e rápida excreção, e de um complexo carbamilado com a enzima que impede a hidrólise de acetilcolina, por inibição competitiva duradoura, porém reversível. Com isso, os efeitos inibidores permanecem após a eliminação da droga-mãe e seus metabólitos, reduzindo o risco de interações com outros fármacos.

A inibição simultânea da BChE, aumentada nos pacientes em fases mais avançadas da doença, é um fator que pode eventualmente prolongar o benefício do tratamento (Giacobini, 2002).

1.3.4 GALANTAMINA

A galantamina é um inibidor reversível da acetilcolinesterase e também exerce uma modulação alostérica em receptores colinérgicos nicotínicos. Estes dois mecanismos de ação complementares, resultam em aumento da neurotransmissão colinérgica no cérebro e tem se demonstrado eficaz no

tratamento sintomático da DA e outras demências (Raskind, et al.; 2000; Tariot et al.; 2000; Erkinjuntti, et al.; 2002; Aarsland, 2002) .

1.4 VARIANTES GENÉTICAS E O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Diversos estudos têm demonstrado que o tratamento com anti-colinesterásicos (IChEs), na doença de Alzheimer, pode ser influenciado por variações genéticas do paciente. Recentemente, Pilotto *et al.* (2009), constataram que o SNP rs1080985 no gene *CYP2D6* pode influenciar a eficácia clínica do donepezil em pacientes com DA leve a moderada. Segundo estes autores, esta análise pode ser útil na identificação de subgrupos de doentes com DA que possuem diferentes respostas clínicas ao donepezil

Em recente revisão, Gahete *et.al.*, (2011) e colaboradores avaliaram o papel do hormônio grelina na neuroproteção e nas funções cognitivas e suas implicações na DA, uma vez que este hormônio está relacionado à inflamação e à neuromodulação.

Em humanos, vários polimorfismos foram identificados no gene grelina, como mutações intrônicas (*rs35683*, *rs35682*, *rs2075356*, *rs35681*, *rs11923313*, *rs697228*, *rs11923293*, *rs9866514*, *rs42451*, *rs35680*, *rs35679*, *rs26802*) e variações localizadas nos exons 2 (*R51Q* - *rs34911341* e *L72M* - *rs696217*) e 4 (*Q90L* - *rs468467*), porém a relação destes polimorfismos com a doença de Alzheimer ainda não é bem conhecida. Além disso, estudos tem demonstrado que polimorfismos deste gene podem influenciar a atividade da BChE. Dantas (2008) encontrou associação positiva entre o alelo *72M* do gene Grelina e maior atividade da BChE.

1.5. GRELINA

A grelina é um hormônio multifuncional, composto por 28 aminoácidos, produzido em uma grande variedade de tecidos. O gene da grelina humana (Figura 02) está localizado no cromossomo 3 (3p25-p26) e contém cinco éxons (Tanaka *et al.*, 2001; Kojima & Kangawa 2005; Smith *et al.*, 1997). O primeiro e

mais curto contém apenas 20 pb e engloba parte da região 5' não traduzida (5' UTR), não sendo considerado por outros autores que consideram o gene da grelina como tendo 4 exons (Ukkola et.al., 2001).

A variante *L72M* (rs696217) está localizada no éxon 3, do lado de fora da região de codificação para a grelina madura (Figura 2).

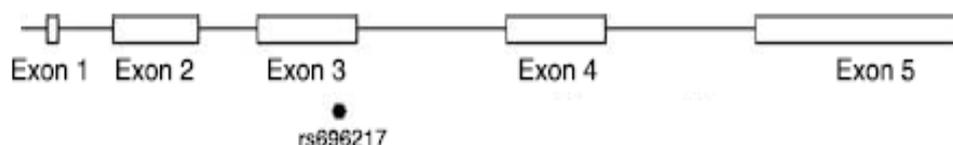


Figura 2: Gene da Grelina e localização da variante *L72M* baseada no HAPMAP (www.hapmap.org).

A primeira função atribuída a grelina foi a capacidade de estimular a liberação do hormônio do crescimento. Estudos subsequentes demonstraram que este hormônio está relacionado também a inúmeras outras funções, como a regulação da ingestão de alimentos, o ganho de peso, a liberação de insulina bem como o controle da homeostase energética (Chollet, *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 1991).

Além destas funções, estudos têm demonstrado que a grelina também está relacionada à neuroproteção, à neuromodulação, à memória e processos de aprendizagem. A aplicação de grelina no cérebro de camundongos influencia na retenção de memória, independente da área aplicada, demonstrando que este hormônio modela processos cognitivos (Carlini *et al.*, 2002; Carlini *et al.*, 2004).

Recentemente, em 2010, Gahete *et al.*, demonstraram pela primeira vez que, os pacientes com DA têm uma redução na produção local de grelina no cérebro, em comparação com os controles pareados por idade, ao analisarem a expressão do mRNA do sistema grelina em diferentes regiões do giro temporal.

Apesar do crescente número de evidências indicando a forte relação entre a grelina e o metabolismo, inflamação, processos de neuroproteção, de memória e de aprendizagem, apenas poucos estudos foram realizados até o

momento para avaliar a potencial implicação do sistema grelina na doença de Alzheimer humana (Gahete *et. al.*; 2011).

A butirilcolinesterase é uma das enzimas responsáveis pela desacetilação da grelina e foi demonstrado que o gene da grelina influencia a expressão da butirilcolinesterase (Dantas *et al.*, 2011).

2. OBJETIVOS

- Analisar a atividade da enzima Butirilcolinesterase (BChE), em idosos com a doença de Alzheimer, tratados com os Inibidores Colinesterásicos (Galantamina, Donepezil e Rivastigmina) comparando-a com o grupo controle.
- Verificar se ocorre associação entre o polimorfismo *L72M* do gene Grelina e a doença de Alzheimer.
- Verificar a influência da variante *L72M* do gene Grelina na atividade da BChE em pacientes com a Doença de Alzheimer.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE

3.1.1 AMOSTRAS

O plasma de 30 pacientes, prováveis DA, diagnosticados de acordo com os critérios do NIA-AA (*National Institute on Aging and Alzheimer's Association*), foi utilizado para medir a atividade da Butirilcolinesterase. Estas amostras foram coletadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Foram utilizadas também, amostras de plasma de idosos sadios cognitivamente, como grupo controle. Os idosos sadios têm idades aproximadas às dos pacientes com DA, não apresentam sequelas de Acidente Vascular Cerebral, não apresentam depressão profunda, não são alcoolistas e foram avaliados pelos testes Mini-Exame do Estado Mental (MEEM), Questionário de Atividades Funcionais (PFEFFER) e pelo geriatra.

3.1.2 MEDIDA DA ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE

O sangue armazenado em tubos contendo EDTA foi centrifugado por 20 minutos. O plasma foi colocado em tubos do tipo *ependorf* e armazenado em freezer para posterior análise.

A medida da atividade da BChE, foi realizada em um espectrofotômetro, seguindo a metodologia de Dietz e colaboradores (1973), modificada por Evans e Wroe (1978). Esta metodologia baseia-se na hidrólise da propioniltiocolina pela BChE, que produz ácido propiônico e tiocolina, a qual reage com o DTNB (ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico), gerando 5-tio-2-nitrobenzoato de coloração amarela.

O tampão fosfato 0,1 M pH 7,6, utilizado na reação, foi preparado pela mistura de duas soluções, uma contendo 4,73 g de Na₂HPO₄ anidro (PM= 141,96) em 1000 mL de água destilada e outra com 13,61 g de KH₂PO₄ anidro (PM = 136,09) em 1000 mL de água destilada. O DTNB (0,423 mM) foi dissolvido em tampão fosfato na proporção de 167 g por 1000 ml. O substrato

(propioniltiocolina 100 mM) foi preparado com 303 mg de iodeto de propioniltiocolina (PM = 303,2) em 10 ml de água destilada.

Os tubos contendo 2,2 mL de tampão-DTNB e os tubos contendo 0,25 ml de soro (diluído 1:100 em água destilada), foram mantidos por vinte minutos em banho-maria a 25 °C. Em seguida, foram adicionados 250 ul da amostra diluída ao tubo contendo o tampão fosfato, juntamente com 50 ul de propioniltiocolina e as leituras foram iniciadas. A primeira leitura, denominada A0, foi efetuada imediatamente após a colocação dos reagentes na cubeta termostaticada do espectrofotômetro. As leituras A1, A2 e A3 foram efetuadas com um, dois e três minutos a partir da leitura A0. Após o término das quatro leituras, as variações de absorbância por minuto (Δ /minuto) foram calculadas. Para a obtenção da atividade (KU/l), Δ /minuto é multiplicado pelo fator 73,53 e dividido por 1.000.

3.2 GENOTIPAGEM

3.2.1. EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA das amostras foi extraído pelo método descrito por Lahiri e Nurnberger (1991). Neste método, após a separação do plasma, o sangue contendo EDTA foi colocado em um tubo Falcon, de 15 mL. Em seguida, foi adicionado o volume suficiente de TKM1 para completar o volume de 10 mL, juntamente com 125 μ L de IGEPAL CA-630, que é um detergente solubilizador de membrana.

As amostras foram misturadas em vórtex, ou manualmente, e centrifugadas por 20 minutos a 2500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensionado com 10 mL de TKM1, com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

A amostra foi novamente centrifugada e a etapa anterior repetida até o momento em que o precipitado tornou-se limpo, com uma coloração esbranquiçada. Após as lavagens com TKM1, o precipitado foi lavado com 800 μ L de TKM2, ressuspensionado com a ponteira e transferido para um tubo de 1,5 mL do tipo *ependorf*. Em seguida, foi adicionado a cada tubo, 50 μ L de SDS 15%.

As amostras foram então, agitadas e incubadas em banho-maria por 24 horas. Após esta etapa, as amostras foram retiradas do banho-maria e a cada tubo, adicionou-se 300µL de solução saturada de NaCl 5M. As amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 20 minutos. O sobrenadante (que contém o DNA) foi colocado em tubos de 15 mL. Em seguida, foram adicionados dois volumes em relação ao volume inicial, de etanol absoluto gelado.

Os tubos foram tampados com parafilme e vertidos gentilmente, até a formação de uma nuvem de DNA. O DNA foi retirado do tubo com o auxílio de uma pipeta, colocado em um tubo de 1,5 mL e levado à estufa para secagem do álcool. Após a secagem, o DNA foi ressuscitado com 200µL de Tris-EDTA, que é um conservante de DNA. As amostras foram levadas ao banho-maria a 55° por até três dias e estocadas a -20°.

TABELA 2. COMPOSIÇÃO DO TAMPÃO TKM1, UTILIZADO NA EXTRAÇÃO DO DNA.

Reagente	Concentração	Volume
Tris-HCl – pH 7,6	1M	5 MI
KCl	1M	5 MI
MgCl ₂	1M	5 mL
EDTA – pH 7,6	0,1M	10 MI
Água Destilada		475 MI
Volume Total		500 mL

TABELA 3. COMPOSIÇÃO DO TAMPÃO TKM2, UTILIZADO NA EXTRAÇÃO DO DNA.

Reagente	Concentração	Volume
Tris-HCl – pH 7,6	1M	0,5 MI
KCl	1M	0,5 MI
MgCl ₂	1M	0,5 mL
EDTA – pH 7,6	0,1M	1 MI
NaCl	1M	20 mL
Água Destilada		27,5 mL
Volume Total		50 mL

TABELA 4. COMPOSIÇÃO DO TAMPÃO TRIS-EDTA, UTILIZADO NA EXTRAÇÃO DO DNA.

Reagente	Concentração	Volume
Tris-HCl – pH 8,0	1M	0,5 mL
EDTA – pH 8,0	0,1M	0,5 mL
Água Destilada		49 mL
Volume Total		50 mL

3.2.2. GENOTIPAGEM

A reação de PCR foi realizada com o aparelho Mastercycler Realplex 2 (Eppendorf). Para a genotipagem da variante foi utilizado o Kit de Genotipagem TaqMan SNP (Applied Biosystems), que consiste de 2 iniciadores não marcados e duas sondas (uma para cada alelo) marcadas com fluorescência VIC emitindo coloração vermelha e FAM como a coloração verde. Para a análise foi preparado um mix de reação (Tabela 5) para cada amostra, composto por TaqMan Universal PCR Master Mix, uma alíquota do Kit de Genotipagem TaqMan SNP específico e água ultra-pura. A este volume de mix para foi acrescentado o DNA extraído para a reação.

TABELA 5. CONCENTRAÇÕES DOS REAGENTES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE PCR.

Reagente	Volume
Água ultra-pura	3,5 µL
TaqMan	5 µL
TaqMan SNP específico	0,5 µL
DNA extraído (concentração de 20 ng/ µL)	1 µL
Volume final	10 µL

3.3. ANÁLISE DOS DADOS

Em relação aos dados da atividade enzimática, foi calculada a média da atividade e o desvio-padrão entre cada grupo de pacientes tratado com o Inibidor Colinesterásico (Donepezil, Galantamina ou Rivastigmina) e o grupo controle, bem como a média de atividade dos pacientes separados por genótipo da variante *L72M* do gene Grelina.

Para a comparação da atividade da BChE, entre os pacientes tratados com um inibidor colinesterásico e os idosos cognitivamente saudáveis, cada paciente foi pareado por idade e escolaridade, com um idoso controle saudável. Para a análise da atividade da BChE nos pacientes heterozigotos (genótipo *72LM*) para a variante estudada, foi calculada a média de atividade de todos os heterozigotos e a média de atividade de todos os homozigotos (genótipo *72LL*).

Após o cálculo das médias de atividade da BChE, foi calculada a diferença percentual das médias da atividade, existente entre cada comparação a ser analisada. Desta forma, foram calculadas as diferenças percentuais da média da atividade, entre cada grupo de pacientes tratados com inibidores colinesterásicos (Donepezil, Galantamina e Rivastigmina) e o grupo controle de idosos cognitivamente saudáveis e a diferença percentual entre os pacientes tratados com inibidores da AChE (Galantamina e Donepezil) e os pacientes tratados com o inibidor da AChE e BChE (Rivastigmina).

Os testes estatísticos relacionados à genotipagem foram realizados com o programa BioEstat 5.0. Foram realizados os testes do Qui-quadrado para a análise das frequências alélicas e genotípicas e foi analisado também, se as distribuições genotípicas estavam em equilíbrio de Hardy-Weiberg.

4. RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE

4.1.1 INIBIDORES COLINESTERÁSICOS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BUTIRILCOLINESTERASE

A média da atividade da BChE entre os pacientes, tratados com os Inibidores Colinesterásicos, Rivastigmina, Donepezil e Galantamina foi heterogênea nos grupos estudados (Tabela 6). O desvio-padrão da média da atividade da BChE, nos pacientes tratados com os inibidores, foi maior comparado ao desvio-padrão encontrado para os idosos cognitivamente saudáveis.

A atividade da BChE nos pacientes tratados com Rivastigmina (inibidor pseudo-irreversível da AChE e BChE) foi 13,4% menor comparada à média da atividade dos controles. Em relação à atividade enzimática dos pacientes tratados com os inibidores específicos da AChE, verificou-se que a Galantamina não alterou a nível de plasma na atividade da BChE, uma vez que a atividade dos pacientes tratados com esse fármaco foi apenas 1,62% maior comparada aos controles. Os pacientes tratados com Donepezil, outro inibidor reversível da AChE, apresentaram nível aumentado da atividade, 7,9% maior comparada aos controles (Tabela 6).

TABELA 6. COMPARAÇÃO ENTRE A MÉDIA DE ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE EM PACIENTES COM DA E CONTROLES E VARIAÇÃO PERCENTUAL ENTRE AS MÉDIAS.

Inibidor Colinesterásico	Média da Atividade Enzimática da BChE nos pacientes e Desvio-padrão	Média da Atividade da BChE nos Controles e Desvio-padrão	Variação (%)
Donepezil	3,9401 ± 1,36	3,65 ± 0,57	7,9%
Galantamina	3,7621 ± 1,01	3,70 ± 0,80	1,62%
Rivastigmina	3,2657 ± 1,36	3,70 ± 0,64	13,4%

A comparação entre os três inibidores revelou que a atividade média da BChE nos pacientes tratados com Rivastigmina foi 17,13% menor comparada à média dos pacientes tratados com Donepezil e 13,9% menor comparada à média dos pacientes tratados com Galantamina, ambos inibidores reversíveis da AChE. A média da atividade da BChE nos pacientes tratados com os inibidores seletivos da AChE foi semelhante, apresentando uma variação de 4,78% (Tabela 7).

TABELA 7. VARIAÇÃO PERCENTUAL ENTRE A MÉDIA DA ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE DE PACIENTES TRATADOS COM RIVASTIGMINA, DONEPEZIL E GALANTAMINA.

Inibidores Colinesterásicos	Variação (%)
Rivastigmina e Donepezil	17,13%
Rivastigmina e Galantamina	13,9%
Donepezil e Galantamina	4,78%

4.1.2 INIBIDORES COLINESTERÁSICOS E MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL

Os dados referentes à comparação entre as pontuações obtidas por cada paciente e o inibidor utilizado encontram-se na Tabela 8. Verificou-se que a pontuação no MEEM dos pacientes, para os três inibidores, é variável. Os pacientes tratados com Rivastigmina, inibidor pseudo-irreversível da AChE e BChE tiveram tanto melhora, quanto piora na pontuação no MEEM enquanto os pacientes tratados com os inibidores da AChE tendem a manter o escore mais constante ou inalterado, comparado aos escores obtidos pelos paciente tratados com Rivastigmina. O escore do *Clinical Dementia Rating* (CRD) revelou que os pacientes tratados com Rivastigmina estavam em fases mais avançadas da doença, comparados aos pacientes tratados com Donepezil e Galantamina, uma vez que um escore de 3 pontos indica demência grave, escore de 2 pontos indica demência moderada e escore de 1 ponto, demência leve.

TABELA 8. PONTUAÇÃO NO MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL E ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE.

Amostra	Pontuação MEEM	Diferença	Idade	Atividade da BChE – Paciente	CDR
<i>Rivastigmina</i>					
AHC02	03 – 02	-1	62	2,7816	3
AHC05	23 – 25	+2	61	3,3577	1
AHC06	11 – 05	-6	87	2,0709	3
AHC21	14 – 18	+4	83	3,0022	3
AHC40	06 – 10	+4	82	4,2768	3
AHC56	24 – 23	-1	85	3,5787	0.5
AHC58	18 – 19	+1	78	5,3676	
<i>Donepezil e Galantamina</i>					
AHC08	19 – 12	-7	74	6,3478	2
AHC10	13 – 04	-9	71	4,0805	2
AHC18	12 – 12	0	71	4,1397	2
AHC32	18 – 19	+1	78	2,5614	1
AHC43	21 – 18	-3	78	4,6691	1
AHC07	20 – 20	0	80	4,2401	1
AHC19	13 – 13	0	61	4,0195	1
AHC09	22 – 22	0	79	3,811	2
AHC14	19 – 17	-2	65	4,1934	

Em relação à atividade da BChE destes pacientes (Tabela 9), verificou-se que a média da atividade, nos pacientes tratados com Galantamina ou Donepezil, que apresentaram aumento na pontuação no MEEM, foi menor comparada à média de atividade dos pacientes que apresentam diminuição na pontuação no MEEM ou mantiveram o escore inalterado. Sendo assim, os pacientes tratados com os inibidores Donepezil e Galantamina, que apresentaram uma diminuição na pontuação no MEEM, foram os que possuíram a atividade da BChE mais alta. Os pacientes tratados com Rivastigmina, que obtiveram aumento na pontuação do MEEM, apresentaram a média de atividade semelhante aos pacientes que tiveram os escores diminuídos.

TABELA 9. PORCENTAGEM DE PACIENTES TRATADOS COM RIVASTIGMINA, DONEPEZIL OU GALANTAMINA QUE APRESENTARAM MELHORA, PIORA OU NENHUMA MUDANÇA NA PONTUAÇÃO NO MEEM E MÉDIA DA ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE.

Fármaco	Pontuação no MEEM	Porcentagem de pacientes	Média da Atividade da BChE
Rivastimina	Aumento	57,1%	3,56
	Diminuição	42,9%	3,41
Donepezil ou Galantamina	Aumento	11,1%	2,56
	Diminuição	44,4%	4,82
	Sem mudança	44,4%	4,05

4.1.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA E VARIANTE *L72M* DO GENE GRELINA

Tanto o grupo controle (idosos saudáveis) quanto os pacientes com Alzheimer heterozigotos (*72LM*) apresentaram atividade enzimática da BChE maior, comparada aos homozigotos (*72LL*) (Tabela 10).

TABELA 10. ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE E GENÓTIPO.

Amostras	Média da Atividade da BChE – <i>72LM</i>	Média da Atividade da BChE – <i>72LL</i>	Varição (%)
Pacientes	4,3206	3,7161	16,44%
Idosos saudáveis	4,1070	3,7200	10,21%

4.2 GENOTIPAGEM

Os dados referentes à genotipagem dos idosos com Alzheimer e dos controles idosos saudáveis encontram-se nas tabelas abaixo. As distribuições genotípicas estão em equilíbrio de Hardy-Weiberg. A Tabela 11 mostra as frequências genotípicas e a Tabela 12, as frequências alélicas.

TABELA 11. FREQUENCIAS GENÓTIPICAS DA VARIANTE *L72M* DO GENE GRELINA, EM PACIENTES COM DA E CONTROLES SAUDÁVEIS E RESULTADOS DO χ^2 E VALOR DE P.

Genótipo	DA		CS		Qui-Quadrado	P
	N	Frequência (%)	N	Frequência (%)		
72LL	33	82,50%	37	86,04%	0,197	0,65
72LM	07	17,5%	06	13,95%		
72MM	0		0			

TABELA 12. FREQUENCIAS ALÉLICAS DA VARIANTE *L72M* DO GENE GRELINA, EM PACIENTES COM DA E CONTROLES SAUDÁVEIS E RESULTADOS DO χ^2 E VALOR DE P.

DA	CS		Qui- Quadrado	P		
	N	Frequência (%)			N	Frequência (%)
Alelos						
L	73	91,25%	80	93,02%	0,18	0,67
M	07	8,75%	06	6,97%		

5.DISSCUSSÃO

5.1 MEDIDA DA ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE

5.1.2 INIBIDORES COLINESTERÁSICOS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BUTIRILCOLINESTERASE

A atividade da BChE nos pacientes tratados com Rivastigmina foi 13,4% menor comparada à média da atividade dos controles, corroborando com outros estudos uma vez que o fármaco é um inibidor pseudo-irreversível tanto da AChE quanto da BChE.

Em relação à atividade enzimática dos pacientes tratados com os inibidores específicos da AChE, verificou-se que a Galantamina não alterou a nível de plasma na atividade da BChE, uma vez que a atividade dos pacientes tratados com esse fármaco foi apenas 1,62% maior comparada aos controles. É possível que a atividade da BChE tenha permanecido semelhante no grupo de pacientes e nos controles devido ao mecanismo de ação da galantamina. A galantamina, além de inibir a AChE, também exerce uma modulação alostérica em receptores colinérgicos nicotínicos. Desta forma, é possível que os pacientes tratados com este fármaco, devido ao mecanismo adicional, mantenham a atividade da BChE semelhante ao controles. Quando ocorre inibição da AChE, a atividade da BChE, devido ao efeito de *feedback*, tenderia a aumentar (Pepeu & Giovannini, 2009). É possível que nos pacientes tratados com galantamina, a atividade da BChE não tenha aumentado para compensar a atividade da AChE, devido ao mecanismo adicional de ação do fármaco.

Os pacientes tratados com Donepezil, outro inibidor reversível da AChE, apresentaram nível levemente aumentado da atividade (7,9% maior comparada aos controles). É possível que este aumento observado tenha ocorrido devido ao efeito de *feedback* da BChE em substituir a AChE. Estudos já demonstraram que a BChE pode substituir a AChE exercendo uma função constitutiva de hidrólise da acetilcolina no cérebro normal (Mesulam *et al.*, 2002). Além disso, a BChE atua como um substituto da AChE, mantendo e regulando a transmissão colinérgica quando esta enzima está ausente ou com sua atividade comprometida (Li *et al.*, 2000; Silver, 1974).

Em relação à comparação entre os três inibidores, a média de atividade da BChE, menor nos pacientes tratados com Rivastigmina, comparada às médias dos pacientes tratados com Donepezil e Galantamina, está de acordo com o esperado uma vez que a Rivastigmina inibe a BChE.

5.1.3 ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE E MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL

A análise dos escores obtidos por cada paciente no MEEM, revelou que, os pacientes tratados com Rivastigmina apresentaram uma melhora cognitiva mais significativa, comparada aos pacientes tratados com os fármacos que somente inibem a AChE.

Diversos estudos indicam que a melhora cognitiva causada pelo uso da Rivastigmina está associada à inibição adicional da BChE, além da AChE. Giacobini *et al.*, (2002) analisaram em um estudo de múltiplas-doses, a relação entre a inibição da AChE no Líquor e da BChE no plasma e no Líquor e a mudança cognitiva mensurada pelo Bateria de Testes Neuropsicológicos Computadorizados (CTNB). Segundo estes autores, houve uma mudança significativa no score do CTNB e a inibição tanto da AChE, quanto da BChE no Líquor. No presente trabalho, foi observado, nos pacientes tratados com Rivastigmina, que estavam em fases mais avançadas da doença (segundo o CDR) tanto diminuição, quanto aumento da pontuação no MEEM. Embora a diminuição na pontuação tenha sido observada, a melhora na pontuação sugere que a inibição adicional da BChE pode ser benéfica, uma vez que estes pacientes estavam em fases mais avançadas da demência e mesmo assim apresentaram melhora cognitiva.

Estudos anteriores, também demonstraram que a administração da Rivastigmina está associada, tanto a inibição da AChE, quanto a inibição da BChE no Líquor e plasma (Cutler, *et al.*, 1998). Porém, a inibição da BChE pela Rivastigmina é maior no Líquor do que no plasma, sugerindo que há um melhor efeito central comparado a periferia (Kennedy *et al.* 1999; Enz *et al.*, 1993).

A Rivastigmina por ser um inibidor não seletivo, pode ser mais benéfica, comparada aos inibidores seletivos da AChE, particularmente nos estágios mais avançados da doença (Giacobini, *et al.*, 2002). Uma vez que a BChE

está envolvida na transformação das placas de estágio benigno difuso para a forma maligna compacta, um inibidor não seletivo pode contribuir para retardar a formação destas placas no cérebro de pacientes com DA, o que influencia na progressão da doença (Giacobini, *et al.*, 2000; Guillozet, *et al.*, 1997). Os resultados encontrados no presente trabalho mostraram que, embora haja uma diminuição da média da atividade enzimática dos pacientes tratados com Rivastigmina, o escore no MEEM variou entre os pacientes. Desta forma, nem todos os pacientes podem apresentar uma melhora cognitiva pela inibição adicional da BChE.

5.1.5 ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE E VARIANTE *L72M* DO GENE *GHRL*

Os dados encontrados demonstraram que a atividade da BChE nos pacientes com DA, heterozigotos para a variante estudada (*72LM*), apresentaram atividade aumentada em relação aos homozigotos. O mesmo foi observado para os idosos controles saudáveis. Trabalhos anteriores tem demonstrado correlação entre o alelo *72M* e a atividade da BChE. Dantas *et al.* (2011) encontrou associação positiva entre o alelo *72M* e maior atividade dessa enzima.

Uma maior atividade da BChE implica em uma maior degradação de acetilcolina e butirilcolina. Sendo assim, a análise da variante *L72M* do gene grelina, por ser outro fator que altera a atividade da BChE, pode ser importante, uma vez que este é um dos fatores que pode influenciar a resposta do paciente ao fármaco.

5.2 VARIANTE *L72M* DO GENE GRELINA E A DOENÇA ALZHEIMER

Não foi encontrada, no presente trabalho, associação significativa entre a variante estudada e a doença de Alzheimer. As frequências alélicas entre os pacientes com DA e controles saudáveis não diferiu significativamente, bem como as frequências genotípicas. Entretanto, o estudo desta variante, em pacientes com DA, mostrou-se importante, uma vez que ela está relacionada com a atividade da BChE.

Polimorfismos do gene grelina têm sido cada vez mais estudados, devido à importância fisiológica deste hormônio e sua ampla distribuição no organismo. Na literatura, há estudos sobre polimorfismos deste gene e diversas doenças como Esclerose Múltipla (Rey, *et al.*; 2010), Diabetes Tipo 2 (Berthold, *et al.*, 2009) Obesidade (Ukkola, *et al.*; 2005), Esquizofrenia (Yang *et al.*; 2007) e Câncer (Skibola, *et al.*, 2005). Por desempenhar um importante papel na DA, estudos dos polimorfismos deste gene são necessários para esclarecer a associação genética entre a Grelina e a DA.

Outro motivo pelo qual o estudo destes polimorfismos é importante reside no fato de que as variações genéticas de cada indivíduo podem influenciar na resposta aos fármacos. Além disso, estas variações também podem explicar os efeitos colaterais, ou até mesmo favorecer o indivíduo, quando o polimorfismo possui um efeito protetivo sobre determinada doença. A relação entre diferenças genéticas e resposta aos fármacos tem sido cada vez mais abordada em estudos. Uma vez que a variante *L72M* do gene *GHRL* influencia na atividade da BChE, a análise deste polimorfismo pode importante.

6. CONCLUSÕES

- A resposta dos pacientes aos Inibidores das Colinesterases pode estar relacionada a outros fatores que afetam a atividade da Butirilcolinesterase;
- A análise de parâmetros que contribuam para o direcionamento do tratamento, como a medida da atividade da BChE, poderiam trazer benefícios para o paciente, visto que alguns pacientes beneficiam-se e outros não e a DA apresenta progressão mesmo com o tratamento farmacológico;
- Não houve associação significativa entre a variante *L72M* do gene *GHRL* e a doença de Alzheimer;
- Os heterozigotos para a variante *L72M* do gene *GHRL*, apresentaram atividade da BChE maior comparada aos homozigotos, mostrando que este é outro fator que pode influenciar na resposta do paciente ao tratamento com o IChE.

7. REFERÊNCIAS:

AARSLAND, D. Galantamine for Parkinson's disease with dementia. **Eur Neuropsychopharmacol** 2002; 12 (Suppl. 3): S378-S379.

American Psychiatric Association. Vascular dementia (formerly multi-infarct dementia). In: Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV™). 4th. ed. Washington: The Association; 1994, p.143-7.

Alzheimer's Disease International Consortium (2012). AD International, World Alzheimer Report. Alzheimer's disease International, London. Disponível em: <<http://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2012.pdf>>. Acesso em setembro de 2012.

BERTHOLD, H. K.; GIANNAKIDOU, E.; KRONE, W.; MANTZOROS, C.S.; GOUNI-BERTHOLD, I. The Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene is associated with a decreased risk for type 2 diabetes. **Clin Chim Acta**, v. 399 (1-2), p. 112-118, 2009.

BRAAK, H., BRAAK, E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. **Acta Neuropathol.**, v. 82, p.239–259, 1991.

BORJESSON M.; MAGNUSSON Y.; HJALMARSON A.; ANDERSON B. A novel polymorphism in the gene coding for the beta1-adrenergic receptor associated with survival in patients with heart failure. **Eur Heart J**; v. 21, p. 1853-8, 2000.

CARLINI, V.P., MONZON, M.E., VARAS, M.M., CRAGNOLINI, A.B., SCHIOTH, H.B., SCIMONELLI T.N., et al. Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 299, p. 739–43, 2002.

CARLINI V.P., VARAS M.M., CRAGNOLINI, A.B., SCHIOTH, H.B.; SCIMONELLI, T.N.; BARIOGLIO, S.R. Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin.

Biochem Biophys Res Commun, v. 313, p. 635–41, 2004.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochem J.** 260, p. 625-634, 1989.

CHOLLET, C.; MEYER, K.; BECK-SICKINGER, A. G. Ghrelin — a novel generation of antiobesity drug: design, pharmacomodulation and biological activity of ghrelin analogues. **J Peptide Sci**, v. 15, p. 711–30, 2009.

CUMMINGS, J.L., BACK, C. The cholinergic hypothesis of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. **American Journal of Geriatric Psychiatry**, v.6, p.564-578, 1998.

DARVESH, S., GRANTHAM, D., HOPKINS, D. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **J. Comp. Neurol.**, v.393, p.374–390, 1998.

DARVESH, S., HOPKINS, D.A. Differential distribution of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the human thalamus. **J. Comp. Neurol.**, v.463, p. 25-43, 2003.

DIETZ, A. A.; RUBINSTEIN, H. M.; LUBRANO, T. E HODGES, L. K. Improved method for the differentiation of cholinesterase variants. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 24, p. 58-64, 1972.

ERKINJUNTTI T, KURZ A, GAUTHIER S, BULLOCK R, LILIENFELD S, DAMARAJU CV. Efficacy of galantamine in probable vascular dementia and Alzheimer's disease combined with cerebrovascular disease: a randomised trial. **Lancet** 2002; 359:1283-1290.

EVANS, R.T.; WROE, J. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods. **Clin. Chem.**, v. 24, p. 1762-1766, 1978.

GAHETE M.D.; RUBIO, A.; CORDOBA-CHACON, J.; GRACIA-NAVARRO, F.; KINEMAN, R.D.; AVILA, J. Expression of the ghrelin and neurotensin systems is altered in the temporal lobe of Alzheimer's disease patients. **J Alzheimers Dis**, v. 22, p.819–28, 2010.

GAHETE, M. D.; JOSÉ CÓRDOBA-CHACÓN, J.; KINEMAN, R. D.; LUQUE, R.M.;CASTANO, J.P. Role of ghrelin system in neuroprotection and cognitive functions: Implications in Alzheimer's disease. **Peptides**. v. 32, p. 2225–2228, 2011.

GIACOBINI, E.; SPIEGEL, R.; ENZ A.; VEROFF, A.E.; CUTLER, N.R. Inhibition of acetyl- and butyrylcholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: correlation with cognitive benefit. **J Neural Transm** 2002; 109:1053-1065.

GIACOBINI, E. Butyrylcholinesterase: Its structure and function. **Taylor and Francis Group plc**, 2003.

GILMAN, G.A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10ª ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2005.

GOMEZ-RAMOS, P., MORAN, M. A. Ultrastructural localization of butyrylcholinesterase in senile plaques in the brains of aged and Alzheimer disease patients. **Mol. Chem. Neuropathol.**, v.30, p.161–173, 1997.

FARLOW, M., GRACON, S.I., HERSHEY, L.A., LEWIS, K.W., SADOWSKY, C.H., DOLAN-URENO, J. A controlled trial of tacrine in Alzheimer's disease. **JAMA**, v.268, p.2523–2529, 1992.

FRANCIS, P.T.; PALMER, A.M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G.K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 1999; 66: 137-147.

KOJIMA, M.; KANGAWA, K. Ghrelin: structure and function. **Phisio. Rev.**, New York, v. 85, p. 495-522, 2005.

LAHIRI, D., FARLOW, M., SAMBAMURTI, K., GREIG, N., GIACOBINI, E., SCHNEIDER, L. CURR. A critical analysis of new molecular targets and strategies for drug developments in Alzheimer's disease. **Drug Targets**, v. 4, p.97–112, 2003.

LAYER, P.G., WEIKERT, T., WILLBOLD, E. Chicken retinospheroids as developmental and pharmacological in vitro models: acetylcholinesterase is regulated by its own and by butyrylcholinesterase activity. **Cell Tissue Res.**, Berlin, v. 268, p. 409-418, 1992.

LI, B., STRIBLEY, J.A., TICU, A., XIE, W., SCHOPFER, L.M., HAMMOND, P., BRIMIJOIN, S., HINRICHS, S.H., LOCKRIDGE, O. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. **Journal of Neurochemistry**, Londres, v.75, p.1320-1331, 2000.

LENT, R. **Neurociência da Mente e do Comportamento**. São Paulo, GUANABARA KOOGAN, 2008.

MCNAMARA D.M.; HOLUBKOV R.; JANOSKO K. Pharmacogenetic interactions between beta-blocker therapy and the angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism in patients with congestive heart failure. **Circulation**; v. 103, p. 1644-8, 2001.

MESULAM, M-M., GUILLOZET, A., SHAW, P., LEVEY, A., DUYSSEN, E.G., LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic

pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine.

Neuroscience, v.110, p. 627-639, 2002.

MANOHARAN, I., WIESELER, S., LAYER, P.G., LOCKRIDGE, O.,
BOOPATHY, R. Naturally occurring mutation Leu307Pro of human
butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. **Pharmacogenet.
Genom.** v.16, p.461-468, 2006.

NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M. **Lehninger princípios de bioquímica.**
4ª ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

PATTERSON, C.E.; TODD, S. A.; PASSMORE, A. P. Effect of apolipoprotein E
and butyrylcholinesterase genotypes on cognitive response to cholinesterase
inhibitor treatment at different stages of Alzheimer's disease. **The
Pharmacogenomics Journal**, v. 11, p. 444–450, 2011.

PILOTTO, A.; FRANCESCHI, M.; D'ONOFRIO, G.; BIZZARRO, A.; MD,
MANGIALASCHE, F.; CASCAVILLA, L.; MD, PARIS, F.; MATERA, M.G.;
PILOTTO, A.; MD, DANIELE, A.; MECOCCHI, P.; MASULLO, C.; MD,
DALLAPICCOLA, B.; SERIPA, D. Effect of a *CYP2D6* polymorphism on the
efficacy of donepezil in patients with Alzheimer disease. **Neurology**, v.73, p.
761-767, 2009.

PODOLY, E., SHALEV, D.E., SHENHAR-TSARFATY, S., BENNETT, E.R.,
BEN ASSAYAG, E., WILGUS, H., LIVNAH, O., SOREQ, H. The
butyrylcholinesterase K variant confers structurally derived risks for Alzheimer
pathology. **J. Biol. Chem.**, v.284, p. 17170–17179, 2009.

QASEEM A, SNOW V, CROSS T, FORCIEA, M. A., HOPKINS, R.,
SHEKELLE, P., ADELMAN, A., MEHR, D., SCHELLHASE, K., et al. Current
Pharmacologic Treatment of Dementia: A Clinical Practice Guideline from the
American College of Physicians and the American Academy of Family
Physicians. **Ann. Intern. Med.**, v.148(5), p.370-378. 2008.

RANG, H.P., DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Rang & Dale. Farmacologia**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

Raskind M, Peskind E, Wessel T, et al. and the Galantamine Study Group. Galantamine in AD: a 6-month randomized, placebo-controlled trial with a 6-month extension. **Neurology** 2000;54:2261-2268.

ROGERS, S.L., FRIEDHOFF, L.T. Donepezil Study Group: The Efficacy and Safety of Donepezil in Patients with Alzheimer's Disease: Results of a U. S. Multicenter, randomized, Double-blind Placebo Controlled Trial. **Dementia**, v.7(6), p.293-303, 1996.

SILVER, A. The Biology of Cholinesterases, **Elsevier**, Amsterdam, 1974.
SKIBOLA, D.R.; MARTYN T. S.; PAIGE M. B.; HUBBARD, A.E.; SHAWN CHI, L.A.; HOLLY E.A. Polymorphisms in Ghrelin and Neuropeptide Y Genes are Associated with Non-Hodgkin Lymphoma. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. V. 14, 2005.

SMITH, R.G.; van der PLOEG, L.H.; HOWARD, A.D.; FEIGHNER, S.D.; CHENG, K.; HICKEY, G.J.; WYVRATT, M.J.Jr; FISHER, M.H.; NAUNS, R.P.; PATCHETT, A.A.; PeptidomiMic regulation of growth hormone secretion. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v.18, p. 621-645, 1997.

STERIADE, M., JONES, E.G., MCCORMICK, D.A. Thalamus: organization and function, **Elsevier**, Amsterdam, 1997.

TANAKA, M.; HAYASHIDA, Y.; IGUCHI, T.; AKAN, N.; NAKAI, N.; NAKASHIMA, K. Organization of the mouse ghrelin gene and promoter: occurrence of a short noncoding first exon. **Endocrinology**, Baltimore, v. 124, p. 3697-3700, 2001.

TARIOT, P.N., SOLOMON, P.R., MORRIS, J.C., KERSHAW, P., LILIENFELD, S., DING, C., AND THE GALANTAMINE STUDY GROUP. A 5-month,

randomized, placebo controlled trial of galantamine in AD. **Neurology** 2000;54:2269-2276.

UKKOLA, O.; RAVUSSIN, E.; JACOBSON, P.; SNYDER, E.E.; CHAGNON, M.; SJÖSTRÖN, L.; BOUCHARD, C.; Mutations in the Preproghrelin / ghrelin gene associated with obesity in human. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Baltimore, v. 86, n.8, p. 3996-3999, 2001.

WEISGRABER, K.H., RALL, S.C., JR., MAHLEY, R.W. Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the aminoacid sequence of the apo-E isoforms. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 9077–9083, 1981.