

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRICIA FERNANDA ROCHA DIAS

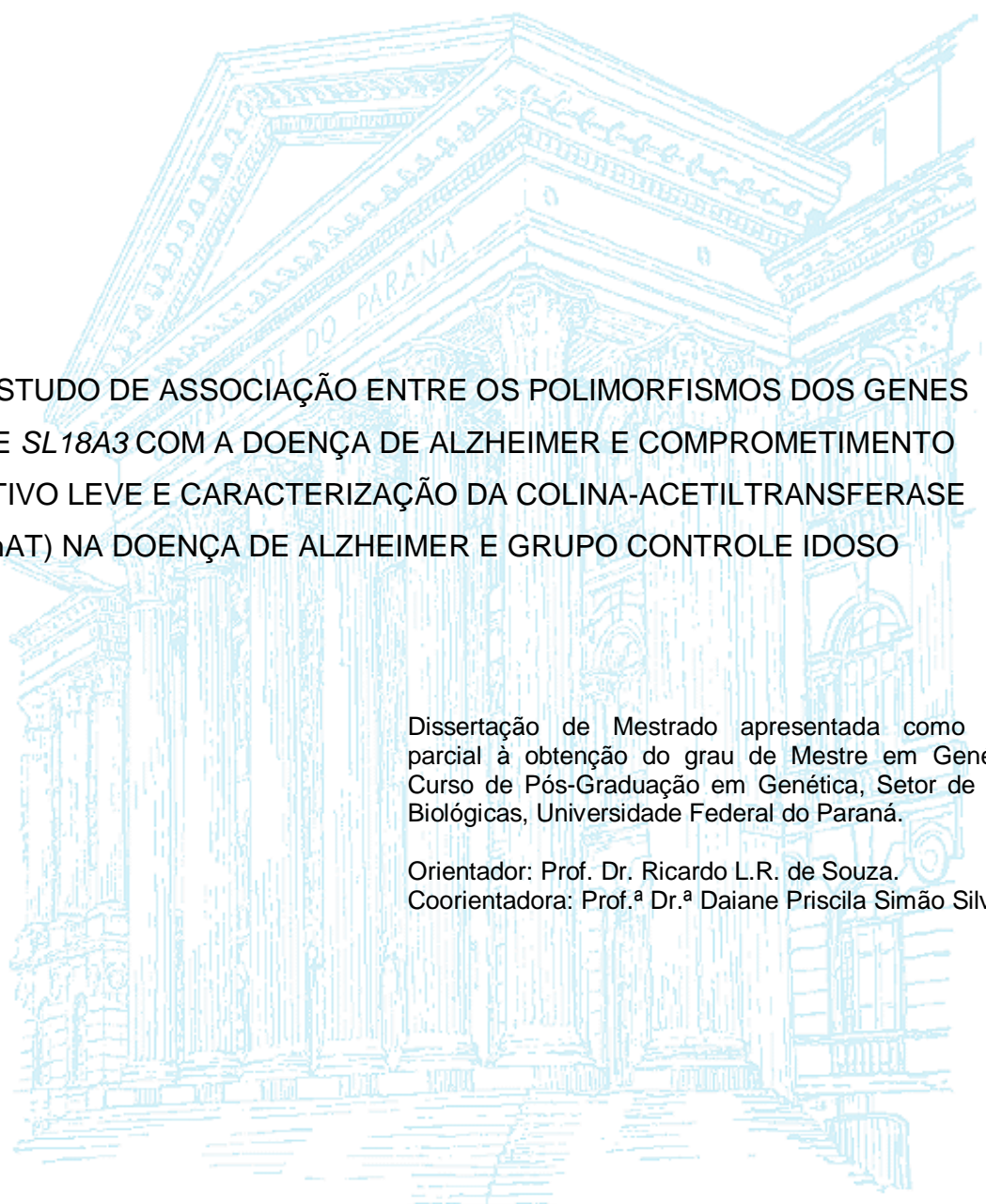
ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES
CHAT E *SL18A3* COM A DOENÇA DE ALZHEIMER E COMPROMETIMENTO
COGNITIVO LEVE E CARACTERIZAÇÃO DA COLINA-ACETILTRANSFERASE
(ChAT) NA DOENÇA DE ALZHEIMER E GRUPO CONTROLE IDOSO

CURITIBA

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRICIA FERNANDA ROCHA DIAS



ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES
CHAT E *SL18A3* COM A DOENÇA DE ALZHEIMER E COMPROMETIMENTO
COGNITIVO LEVE E CARACTERIZAÇÃO DA COLINA-ACETILTRANSFERASE
(ChAT) NA DOENÇA DE ALZHEIMER E GRUPO CONTROLE IDOSO

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Genética, no Curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo L.R. de Souza.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Daiane Priscila Simão Silva.

CURITIBA

2015



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

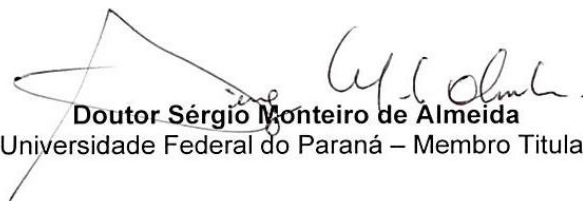


PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **PATRICIA FERNANDA ROCHAS DIAS**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se aprove a candidata.

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 31 de julho de 2015



Doutor Sérgio Monteiro de Almeida
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular



Doutora Luciane Viater Tureck
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular



Doutora Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Universidade Federal do Paraná – Orientador e Presidente da Banca

Visto



Professora Doutora Lupe Furtado Alle
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES- pelo financiamento do projeto e pela bolsa concedida;

Agradeço ao meu orientador, Prof^o Dr^o Ricardo Lehtonen por ter aberto a oportunidade de trabalhar em seu grupo, em 2012, quando iniciei o estágio e prossegui no ano seguinte para o mestrado. Agradeço também pelo seu direcionamento nesses três anos de trabalho conjunto;

Agradeço a prof^a Dr^a Daiane Simão-Silva, coorientadora deste trabalho, e quem sempre disponibilizou do seu tempo para ensinar e acrescentar na minha vida pessoal e profissional. Obrigada pela amizade e carinho;

Agradeço às parcerias realizadas com os hospitais, HC-UFPR e INC, pois sem elas não teríamos iniciado esta linha de pesquisa, além de nos darem a oportunidade de conviver de perto com os idosos que prontamente aceitaram participar da pesquisa. De fato, este foi o maior aprendizado que a dissertação gerou: a humanização do cientista;

Agradeço aos meus colegas e amigos do Laboratório de Polimorfismos por me acolherem e ensinarem a cada dia as premissas do companheirismo e paciência da convivência em grupo. Especialmente aos amigos mais próximos por terem compartilhado de momentos ímpares em minha vida durante essa trajetória;

Agradeço a minha família e amigos por sempre serem a base da minha vida, pois sem vocês nada faria sentido e certamente não estaria aqui!!

Agradeço a Deus, pois sem ELE certamente não poderia ter desfrutado destas experiências. Enfim, agradeço a todos que puderam contribuir direta e indiretamente, em minha vida acadêmica e pessoal nestes três anos de Polimorfismos e Ligação e dois de mestrado. Obrigada!!!

“A racionalidade do pensamento impõe um limite na relação das pessoas com seus
cosmos”.

John Forbes Nash

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada pela perda progressiva de memória e de outras funções cognitivas, implicando em incapacidades de atividades cotidianas do indivíduo acometido. Patologicamente, ocorre a perda de neurônios, principalmente no neocórtex e hipocampo, com acúmulo de placas β -amilóides e de emaranhados neurofibrilares contendo proteína tau hiperfosforilada. O comprometimento cognitivo leve (CCL) possui queixas similares a DA, especialmente da memória episódica recente, contudo os indivíduos mantêm suas atividades cotidianas relativamente preservadas. O gene colina-O-acetiltransferase (*CHAT*) codifica a proteína colina-acetiltransferase (ChAT) que catalisa a biossíntese da acetilcolina (ACh). A ChAT citosólica atua dentro do pericário dos neurônios colinérgicos e não colinérgicos e também dentro de células não neuronais. Recentemente mostrou-se a concentração proteica e atividade de ChAT em fluidos extracelulares. O gene transportador vesicular da acetilcolina (*SLC18A3*) codifica a proteína transportadora vesicular da acetilcolina (VAChT), a qual transporta a ACh citoplasmática e a armazena em vesículas sinápticas até sua liberação na fenda colinérgica. A butirilcolinesterase atua na hidrólise da ACh, assim como a acetilcolinesterase (AChE) no sistema nervoso e periférico, sendo codificada pelo gene *BCHE* que está localizado no cromossomo 3q26. O presente trabalho avaliou a associação entre os polimorfismos *rs3810950*, *rs733722*, *rs3810948*, *rs1880676*, *rs2269338* dos genes *CHAT* e *SLC18A3* com a DA (n=191), CCL (n=74) e grupo controle (CI) (n=133). A genotipagem foi realizada por ensaios *TaqManSNP Genotyping Assays* (*Applied Biosystems*). Além disso, mensuramos os perfis proteicos e enzimáticos da ChAT no plasma, por Elisa Sanduiche, nos pacientes com DA (n=107) e CI (n=92). Ademais, investigamos a correlação entre o perfil proteico da ChAT, variantes genéticas e clínicas (CDR, MEEM, IChE e escolaridade), além da atividade da BChE. De forma geral, inferimos que não há associação dos polimorfismos analisados nos genes *CHAT* e *SLC18A3* com DA e CCL; Reafirmamos a presença de ChAT em líquidos extracelulares, em plasma, nas amostras de DA e CI, sem diferença significativas nas médias entre os grupos; O MEEM, CDR, IChE e as variantes *rs733722* e *rs2269338* mostraram-se relevantes para a concentração proteica em DA. O escore do CDR foi correlacionado negativamente com a atividade da ChAT, assim como o MEEM e CDR; Em CI, a variante *rs2269338* altera os níveis de proteína ChAT em homozigose do alelo T. Além disso, a concentração proteica foi correlacionada positivamente com escolaridade, assim como o MEEM. O MEEM interferiu aumentando a atividade da ChAT; Por fim, a atividade da BChE mostrou estar correlacionada positivamente com os níveis de concentração proteica e de atividade nos pacientes e no grupo controle, ou seja, o nível de atividade da BChE é proporcional a concentração e atividade de ChAT.

Palavras-chave: Colina acetiltransferase, demência, *CHAT*, *SLC18A3* e BChE.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is characterized by progressive loss of memory and other cognitive functions, resulting in disabilities in everyday activities of the affected individual. Pathologically, there is loss of neurons, mainly in the neocortex and hippocampus, with accumulation of β -amyloid plaques and neurofibrillary tangles containing hyperphosphorylated tau protein. The mild cognitive impairment (MCI) has similar complaints AD, especially the recent episodic memory, however individuals maintain their daily activities relatively preserved. The choline-O-acetyltransferase gene (*CHAT*) encodes the protein choline acetyltransferase (ChAT) that catalyzes the biosynthesis of acetylcholine (ACh). ChAT cytosolic operates in the soma of neurons and cholinergic and non-cholinergic also within a nonneuronal cells. Recently showed that the protein concentration and ChAT activity in extracellular fluids. The vesicular acetylcholine transporter gene (*SLC18A3*) encoding the protein carrier the vesicular acetylcholine (VAChT), which carries the cytoplasmic ACh and stored in synaptic vesicles until released in cholinergic slit. The butyrylcholinesterase operates in the hydrolysis of ACh as well as acetylcholinesterase (AChE) and peripheral nervous system, and is encoded by the *BCHE* gene is located on chromosome 3q26. This study evaluated the association between polymorphisms *rs3810950*, *rs733722*, *rs3810948*, *rs1880676*, *rs2269338* gene *CHAT* and gene *SLC18A3* in AD (n = 191), CCL (n = 74) and control group (IC) (n = 133). Genotyping was performed by testing TaqManSNP Genotyping Assays (Applied Biosystems). In addition, we measured the protein and enzymatic profiles of ChAT in plasma by sandwich ELISA in patients with AD (n = 107) and CI (n = 92). In addition, we investigated the correlation between the protein profile of ChAT, genetic variants and clinical (CDR, MMSE, ICHE and education), as well as the BChE activity. Overall, we infer that there is no association of polymorphisms analyzed in the *CHAT* and *SLC18A3* genes with AD and MCI; We reaffirm the presence of ChAT in extracellular fluids, plasma, in samples of AD and CI, with no significant difference in means between the groups; The MMSE, CDR, ICHE and *rs733722* and *rs2269338* variants were relevant for the protein concentration in AD. The CDR score was negatively correlated with the activity of ChAT, as well as the MMSE and CDR; In CI, *rs2269338* alters the variant protein ChAT levels in homozygous allele T. In addition, the protein concentration was positively correlated with education, as well as the MMSE. The MMSE interfered increasing the activity of ChAT; Finally, the activity of BChE was found to be positively correlated with the levels of protein concentration and activity in patients and the control group, ie, the activity level of BChE is proportional to the concentration and ChAT activity.

Keywords: choline acetyltransferase, dementia, *CHAT*, *SLC18A3* and BChE.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Placas (seta maior) e emaranhados neurofibrilares (seta menor) em córtex cerebral de DA.....	20
FIGURA 2: Emaranhados neurofibrilares (esquerda) e Placa neutrítica.....	20
FIGURA 3: Diagrama esquemático comparando os padrões de <i>splicing</i> da <i>CHAT</i> em roedores e humanos.....	29
FIGURA 4: Diagrama ilustrativo da estrutura gênica e produtos do processamento alternativo no gene <i>CHAT</i> em humano.....	30
FIGURA 5: Comparação entre os tipos de mRNA de <i>CHAT</i> , <i>cCHAT</i> e <i>pCHAT</i>	31
FIGURA 6: Ilustração esquemática do gene <i>VACHT</i> e os transcritos gerados.....	32
FIGURA 7: Síntese colinérgica.....	34
FIGURA 8: Estrutura em 3D da enzima ChAT humana.....	35
FIGURA 9: Ilustração da estrutura do gene codificador <i>BCHE</i> (9a) e das formas moleculares (9b).....	37
FIGURA 10: Esquema representativo da reação do ensaio genotipagem por <i>Taqman</i>	46
FIGURA 11: Frequências alélicas e genotípicas, respectivamente, do <i>rs733722</i> nos grupos Alzheimer (DA), Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) e Controle Idoso (CI).....	47
FIGURA 12: Frequências alélicas e genotípicas, respectivamente, do <i>rs1880676</i> nos grupos Alzheimer (DA), Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) e Controle Idoso (CI).....	47

FIGURA 13: Frequências alélicas e genotípicas, respectivamente, do *rs3810948* nos grupos Alzheimer (DA), Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) e Controle Idoso (CI).....48

FIGURA 14: Frequências alélicas e genotípicas, respectivamente, do *rs3810950* nos grupos Alzheimer (DA), Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) e Controle Idoso (CI).....48

FIGURA 15: Frequências alélicas e genotípicas do *rs2269338*, gene *VCHAT*, nos grupos Alzheimer (DA), Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) e Controle Idoso (CI).....55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Caracterização dos pacientes com DA, CCL e controle idoso.....	41
TABELA 2. Teste do Qui-Quadrado comparando as frequências alélicas e genóticas entre os grupos de DA, CCL e CI.....	49
TABELA 3. Perfil proteico e de atividade da colina-acetiltransferase (ChAT) em pacientes com DA e CI.....	50
TABELA 4. Comparações entre as médias e medianas da concentração e atividade da ChAT, agrupado por portador e não portador de alelo, para cada <i>SNP</i> específico (<i>rs3810950</i> , <i>rs2269338</i> , <i>rs1880676</i> e <i>rs733722</i>).....	52
TABELA 5. Valor de <i>p</i> referente às comparações entre as medianas da concentração e atividade da ChAT, agrupado por portador ou não de alelo, para cada <i>SNP</i> específico (<i>rs3810950</i> , <i>rs2269338</i> , <i>rs1880676</i> e <i>rs733722</i>).....	53
TABELA 6a. Comparações entre as médias e medianas da concentração e atividade da ChAT estratificado por alelo para o <i>rs2269338</i> , em Alzheimer (DA).....	54
TABELA 6b. Comparações entre as medianas da concentração e atividade da ChAT estratificado por alelo para o <i>rs2269338</i> , no controle idoso (CI).....	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 DEMÊNCIA	15
2.1.1 Diagnóstico de Demência	16
2.2 DOENÇA DE ALZHEIMER – DA	17
2.2.1 Fisiopatologia da DA	19
2.2.2 Diagnóstico de DA	21
2.2.3 Tratamento	23
2.2.3.1 Inibidores de acetilcolinesterase–IChE	24
2.2.3.2 Antagonista dos receptores glutamatérgicos NMDA	25
2.3 COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE (CCL)	25
2.4 GENÉTICA E DOENÇA DE ALZHEIMER	26
2.4.1 Colina O-acetiltransferase - CHAT	28
2.4.2 Transportador Vesicular da acetilcolina - VACHT	31
2.4.3 Estudos de associação entre CHAT, SLC18A3 e DA	32
2.5 ENZIMAS COLINÉRGICAS	33
2.5.1 Colina-acetiltransferase - ChAT	33
2.5.2 Butirilcolinesterase Humana - BChE	36
3 OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4 JUSTIFICATIVA	40
5 MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.1 AMOSTRA	41
5.1.1 Coleta de material biológico e Extração de DNA	43
5.2 GENOTIPAGEM	44
5.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA E MENSURAÇÃO PROTEICA	44
5.4 ANÁLISES DE DADOS	45
6 RESULTADOS	46
6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRAGEM	46

6.2 ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES CHAT E SLC18A3 COM A DOENÇA DE ALZHEIMER E COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE.....	46
6.2.1 Frequências alélicas e genotípicas	46
6.2.2 Comparação entre as frequências alélicas e genotípicas.....	49
6.3 ANÁLISE DO PERFIL ENZIMÁTICO E DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA DA COLINA ACETILTRANSFERASE- CHAT	50
6.3.1 Análise do perfil enzimático e proteico de acordo com as variantes da CHAT e SLC18A3	50
6.3.2 Análises de Regressão Múltipla.....	51
6.3.3 Análises de Correlação.....	55
7 DISCUSSÃO	56
7.1 CARACTERÍSTICA DA POPULAÇÃO E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO	56
7.2 PERFIL PROTEICO E ENZIMÁTICO DA CHAT	57
7.2.1 Influência das variantes genéticas	58
7.2.2 Influência dos parâmetros clínicos.....	59
7.2.3 Colina-acetiltransferase (ChAT) versus Butirilcolinesterase (BChE).....	61
8 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	63
APÊNDICE	75
ANEXOS.....	93

1 INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida gerado nesses últimos anos trouxe consigo uma maior prevalência de doenças crônico-degenerativas, principalmente as síndromes demenciais (FORMARI et al., 2010). Estima-se que a Doença de Alzheimer (DA), demência mais prevalente dentre os transtornos neurodegenerativos, afeta 25 milhões de pessoas em todo o mundo (ALZGENE, 2014).

A DA é caracterizada pela perda progressiva de memória e de outras funções cognitivas, implicando em inabilidades de atividades cotidianas do indivíduo acometido (FROTA et al., 2011). Patologicamente, ocorre a perda de neurônios, principalmente no neocórtex e hipocampo, com acúmulo de placas amilóides e de emaranhados neurofibrilares contendo proteína tau hiperfosforilada (DUYCKAERTS & DICKSON, 2003).

No comprometimento cognitivo leve (CCL), geralmente, observam-se queixas similares a DA, especialmente da memória episódica recente, contudo os indivíduos mantêm suas atividades cotidianas relativamente preservadas (PETERSEN et al., 1999).

A literatura aponta várias regiões cromossômicas que demonstram conter excelentes genes candidatos, tendo destaque a área de aproximadamente 60cM, entre 10q21 e 10q25, a qual influencia tanto o risco para DA quanto a idade de início da doença (BERTRAM et al., 2000; LI et al., 2002). Nessa localização encontram-se genes envolvidos tanto na produção, processamento e liberação do neurotransmissor acetilcolina (ACh) (ORTZUK et al., 2006).

O gene colina-O-acetiltransferase (*CHAT*) codifica a proteína colina-acetiltransferase (ChAT) que catalisa a biossíntese da acetilcolina. A síntese da ChAT ocorre dentro do pericário dos neurônios colinérgicos e não colinérgicos (BELLIER et al., 2011; LEE et al., 2012), além de ser encontrada dentro de células não neuronais (HERSH e PEET, 1978; SASTRY et al., 1983; KAWASHIMA e FUJI, 2003). Dados recentes, mostraram ter concentração proteica e atividade de ChAT em fluídos extracelulares como em líquido cefalorraquidiano e plasma (VIJAYARAGHAVAN et al. 2013).

O gene transportador vesicular da acetilcolina (*SLC18A3*) codifica a proteína transportadora vesicular da acetilcolina – VACHT. A VACHT transporta a ACh citoplasmática e a armazena em vesículas sinápticas até sua liberação na fenda colinérgica (HAHM et al., 1997; MALLET et al., 1998). Os dois genes formam o locus colinérgico, pois são regulados e expressos por mecanismos semelhantes devido ao compartilhamento de um mesmo promotor e ao processamento alternativo que ocorre (NACIFF et al., 1999).

Ambos os genes produzem proteínas importantes nas funções neurofisiológicas, principalmente para um correto desempenho do sistema colinérgico (NORDERG e SVENSSON, 1998). Supõe-se que alguma falha no processamento desses genes possam alterar o papel fisiológico dessas proteínas e contribuir para fenótipos adicionais nos indivíduos com a DA (HAROL et al., 2003).

A Butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) faz parte da família das colinesterases, assim como a acetilcolinesterase (AChE), atuando na hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético, processo essencial para a restauração do neurônio colinérgico no sistema nervoso central e periférico (POHANKA, 2011). Na DA, nota-se um importante papel no curso da patologia devido a interferências na regulação colinérgica e não colinérgica (DARVESH et al., 1998; MESULAM et al., 2002a; MESULAM et al. 2002b; DARVESH et al., 2003).

A ChAT influencia uma ampla gama de funções neurofisiológicas dependente dos processos colinérgicos, incluindo desempenho cognitivo, excitação, sono, movimento e o processamento de informação visual (ODA, 1999). Visto que alterações nessas atividades estão associadas com alguns transtornos neurodegenerativos, dentre eles a DA, pode-se inferir que variantes dos genes *CHAT* e *SLC18A3* possam alterar os níveis de concentração e atividade enzimática (WILCOCK et al., 1982; BIERER et al., 1995; BEACH et al., 2000).

Assim sendo, o presente trabalho avaliou a associação de polimorfismos presente nos genes *CHAT* e *SLC18A3* com a DA e CCL. Assim como mensurou o perfil proteico da ChAT, nos pacientes com DA e grupo controle no plasma, a fim de validar e caracterizar em uma amostra maior a presença e atividade da enzima. Ademais, investigamos a interferência das variantes genéticas e clínicas, além da atividade da BChE na concentração e atividade da proteína ChAT nos grupos DA e CI.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DEMÊNCIA

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2015), estima-se que 47,47 milhões de pessoas vivam com algum tipo de demência em todo o mundo, tendo perspectiva para 75,63 milhões em 2030 e 135,46 milhões em 2050. Estima-se que, em média, 3,73% na África, 6,10% na Ásia, 6,46% na América do Norte, 8,48% na América do Sul e 6,92% na Europa, da população com idade igual ou superior a 60 anos tenha algum tipo de demência (PRINCE et al., 2013).

Na América Latina, Nitrini et al. (2009) observaram maior incidência dos transtornos demenciais (2,4%), quando comparado a outras regiões do mundo (1,2%), avaliando indivíduos com faixa etária entre 65-69 anos. Além disso, nota-se uma maior frequência de demência em idosos analfabetos, sendo a DA a mais prevalente.

No Brasil, a prevalência de demência no interior do estado de São Paulo foi estimada em 7,1%, aumentando de acordo com a idade, com base em 25% da população urbana com idade igual ou superior a 65 anos, na cidade de Catanduva (HERRERA et al., 2002). Em outro estudo epidemiológico, também realizado no estado de São Paulo, apresentou frequência semelhante, 6,8% (BOTTINO et al., 2008). Ademais, nota-se uma prevalência relativamente maior de demências em analfabetos em relação a outros grupos, assim como indivíduos com maior escolaridade representam uma prevalência menor (HERRERA et al., 2002; BOTTINO et al., 2008) e no sexo feminino (HERRERA et al., 2002).

As demências possuem etiologias distintas, sejam oriundas de neurodegenerações, infecções, hidrocefalia, alterações cerebrovasculares ou metabólicas. Contudo, possuem características em comum, como perda seletiva de neurônios, morte celular programada, agregação e degradação proteica (BRUCKI et al., 2011).

A sintomatologia clínica caracteriza-se por múltiplos déficits cognitivos, que incluem comprometimento da memória e pelo menos uma das seguintes alterações cognitivas: afasia (diminuição das funções de linguagem); apraxia (prejuízo na

capacidade de executar atividades motoras); agnosia (dificuldade para reconhecer ou identificar objetos) ou disfunção no desempenho executivo (capacidade de pensar de forma abstrata e planejar, iniciar, sequenciar, monitorar e cessar um comportamento complexo). O prejuízo cognitivo de forma geral deve interferir na vida social e profissional do indivíduo e representar um declínio em relação a um nível anterior de funcionamento (DSM-IV, 2002; FROTA et al., 2011).

2.1.1 Diagnóstico de Demência

O diagnóstico de síndromes demenciais é em grande parte clínico, aprimorado por exames laboratoriais, de neuroimagem e avaliação neuropsicológica (BRUCKI et al., 2011).

Visto que algumas demências não possuem comprometimento da memória em seus estágios iniciais, modificaram-se os critérios diagnósticos sugeridos pela Academia Brasileira de Neurologia (ABN), de acordo com as alterações realizadas pelo *National Institute on Aging (NIA)* e *Alzheimer's Association (AA)* em 2009 (FROTA et al., 2011). As novas diretrizes de orientação de diagnóstico clínico de demência, segundo a ABN, são mostradas no QUADRO 1.

<p>1. Demência é diagnosticada quando há sintomas cognitivos ou comportamentais (neuropsiquiátricos) que:</p> <p>1.1. Interferem com a habilidade no trabalho ou em atividades usuais; 1.2. Representam declínio em relação a níveis prévios de funcionamento e desempenho; 1.3. Não são explicáveis por <i>delirium</i> (estado confusional agudo) ou doença psiquiátrica maior;</p>
<p>2. O comprometimento cognitivo é detectado e diagnosticado mediante combinação de:</p> <p>2.1. Anamnese com paciente e informante que tenha conhecimento da história; e 2.2. Avaliação cognitiva objetiva, mediante exame breve do estado mental ou avaliação neuropsicológica. A avaliação neuropsicológica deve ser realizada quando a anamnese e o exame cognitivo breve realizado pelo médico não forem suficientes para permitir diagnóstico confiável;</p>
<p>3. Os comprometimentos cognitivos ou comportamentais afetam no mínimo dois dos seguintes domínios:</p>

- 3.1. Memória, caracterizado por comprometimento da capacidade para adquirir ou evocar informações recentes, com sintomas que incluem: repetição das mesmas perguntas ou assuntos, esquecimento de eventos, compromissos ou do lugar onde guardou seus pertences;
- 3.2. Funções executivas, caracterizado por comprometimento do raciocínio, da realização de tarefas complexas e do julgamento, com sintomas tais como: compreensão pobre de situações de risco, redução da capacidade para cuidar das finanças, de tomar decisões e de planejar atividades complexas ou sequenciais;
- 3.3. Habilidades visuais-espaciais, com sintomas que incluem: incapacidade de reconhecer faces ou objetos comuns, encontrar objetos no campo visual, dificuldade para manusear utensílios, para vestir-se, não explicáveis por deficiência visual ou motora;
- 3.4. Linguagem (expressão, compreensão, leitura e escrita), com sintomas que incluem: dificuldade para encontrar e/ou compreender palavras, erros ao falar e escrever, com trocas de palavras ou fonemas, não explicáveis por déficit sensorial ou motor;
- 3.5. Personalidade ou comportamento, com sintomas que incluem alterações do humor (labilidade, flutuações incharacterísticas), agitação, apatia, desinteresse, isolamento social, perda de empatia, desinibição, comportamentos obsessivos, compulsivos ou socialmente inaceitáveis.

QUADRO 1 – DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE DEMÊNCIAS SEGUNDO A ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NEUROLOGIA. FONTE: FROTA et al. (2011).

2.2 DOENÇA DE ALZHEIMER – DA

A DA é o transtorno demencial mais prevalente, correspondente a 60-80% dos casos de demências em geral, sendo caracterizada principalmente pelo depósito de placas amiloides, emaranhados neurofibrilares e perda neuronal (SCHWARZ et al., 2003).

A demência da Doença de Alzheimer afeta em torno de 25 milhões de pessoas em todo o mundo (ALZHEIMER ASSOCIATION, 2013). Estima-se que na América do Norte e na Europa ocidental cerca de 6,4% e 5,4% dos indivíduos, com idade \geq 60 anos, apresentam esta demência, seguidos pela América Latina (4,9%), China e Pacífico (4,0%) (FERRI et al., 2005). Em 2050, supõe-se que a cada 33 segundos um novo caso de DA seja diagnosticado (ALZHEIMER ASSOCIATION, 2013). A prevalência também aumenta exponencialmente com a idade, passando de 3% entre indivíduos com 65-74 anos para quase 50% entre os com 85 anos ou mais (HEBERT et al., 1995; ZHU e SANO, 2006).

Uma das primeiras manifestações clínicas de DA corresponde ao déficit de memória episódica para eventos recentes, o qual progride ao longo do tempo, comprometendo também a memória semântica (vocabulário) e a memória operacional (FORMARI, et al., 2010). Geralmente, o início ocorre de forma insidiosa e aos 65 anos ou mais de idade, sendo que apenas 1% dos casos representa

indivíduos com idade inferior a 65 anos, os quais apresentam a DA familiar (DALVI, 2012). Existe uma longa latência entre as primeiras alterações neuropatológicas e as primeiras características clínicas.

Na fase leve da doença, o paciente apresenta um escore no Mini Exame do Estado Mental (MEEM) em torno de 20-23/30, associado a déficits de memória episódica, principalmente para reconhecimento e recordação de eventos recentes, além de grande dificuldade e/ou incapacidade de reter informações recém-aprendidas. Anormalidades comportamentais são leves e podem incluir irritabilidade, depressão e apatia. Contudo, as habilidades funcionais seguem relativamente bem preservadas, porém apresentam algumas dificuldades com atividades instrumentais complexas de vida diária (AVD), tais como finanças e direção (DALVI, 2012).

No estágio moderado, MMSE 10-19/30, verifica-se o aumento na dificuldade com a memória remota e comunicação verbal. Agitação, agressão, piora da depressão e ansiedade podem ser proeminentes. Aumenta-se a dificuldade para se locomover sem ficar perdida e a dependência para as AVD's (DALVI, 2012).

No grau grave, MMSE 0-9/30, o paciente apresenta um declínio importante de todos os domínios cognitivos e torna-se totalmente dependente. A comunicação é gravemente afetada e, beirando o mutismo (DALVI, 2012).

A taxa de progressão através desses estágios é variável, podendo ser avaliada pelo teste *Clinical Dementia Rating Scale – CDR* (ANEXO 1). O CDR tem o propósito de classificar através da cognição, do comportamento e da influência das perdas cognitivas a capacidade de realização de tarefas cotidianas decorrentes pelo próprio desempenho, ou seja, permite avaliar o ritmo de piora ou melhora do paciente de acordo com as variáveis e circunstâncias clínicas, sociais e demais que sejam de interesse (MONTANO e RAMOS, 2005; MORILLO e SUEMOTO, 2011).

A progressão geralmente é mais lenta em pacientes mais jovens e sem doenças associadas. Após o diagnóstico, a sobrevivência varia entre 4-6 anos e pode chegar até 20 anos. As causas mais comuns de óbito desses pacientes são a pneumonia devido a problemas nos mecanismos de deglutição, complicações de infecções do trato urinário e quedas (DALVI, 2012).

2.2.1 Fisiopatologia da DA

A DA caracteriza-se, a nível macroscópico, por atrofia cortical, principalmente no lobo temporal e na formação hipocampal. A atrofia causa o aumento difuso dos sulcos e fissuras corticais, devido à redução dos giros. As áreas mais comprometidas, desde a fase inicial são as corticais límbicas, paralímbicas e do córtex de associação, enquanto que o córtex motor, visual e auditivo são mais preservados (CARAMELLI, 2000; CARAMELLI e BARBOSA, 2002; WALSH e SELKOE, 2004).

Do ponto de vista microscópico, ocorrem alterações histológicas típicas, mas não exclusivas da doença, como redução no número de neurônios e de sinapses. As principais mudanças que marcam a síndrome são os depósitos de duas proteínas: o peptídeo β -amilóide (β A) e a proteína Tau (DUYCKAERTS & DICKSON, 2003).

Os depósitos extracelulares de β -amilóide acumulam-se em formas de placas, conhecidas como placas amilóides, principalmente nos córtices e, em alguns núcleos subcorticais (FIGURA 1). As placas são divididas em três grupos: difusas, neuríticas e atróficas. Nota-se também a deposição de β -amilóide em torno dos vasos, o que é denominado angiopatia congofílica amilóide (ELLISON et al., 2004).

A hipótese da cascata amilóide sugere que a proteína precursora amilóide (APP) seja clivada nos peptídeos A β 40 e A β 42 pela β -secretase e γ -secretase. Estes produtos da clivagem agregam-se na forma de oligômeros e fibrilas, o que gera as placas amilóides extracelulares. Consequentemente, o acúmulo destas placas ocasionam perda sináptica, alterações homeostáticas do cálcio, disfunção colinérgica e perda neuronal de vários sistemas de neurotransmissores (HOLTZMAN, MORIS e GOATE, 2011).

A proteína Tau é relativamente abundante nos neurônios e encontra-se em todas as células nucleadas, tendo como função a estabilização e manutenção dos microtúbulos. Na DA, ocorre o aumento da fosforilação da proteína Tau ocasionando a perda da sua funcionalidade, a qual combinada com o ganho de toxicidade compromete o transporte axonal e favorece a degeneração sináptica (DALVI, 2012).

O excesso de tau acontece nas formas dos emaranhados neurofibrilares (inclusões filamentosas intracitoplasmáticas levemente ubiquitinadas), de neuropil *threads* (processos celulares finos e distorcidos) ou ainda de neuritos distróficos (FIGURA 2) (ELLISON et al., 2004).

Verificam-se os mesmos critérios neuropatológicos, tanto para a forma familiar ou a de início tardio da doença de Alzheimer (BRUCKI et al., 2011).

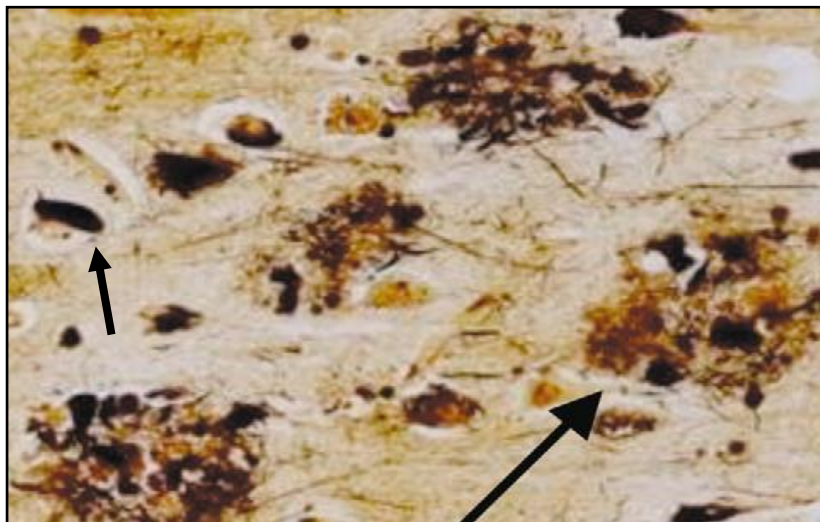


FIGURA 1: PLACAS (SETA MAIOR) E EMARANHADOS NEUROFIBRILARES (SETA MENOR) EM CÓRTEX CEREBRAL DE DA. AS PLACAS SÃO DEPÓSITOS EXTRACELULARES DE B-AMILÓIDE CERCADAS POR NEURITOS DISTRÓFICOS, ASTRÓCITOS REATIVOS E MICROGLIA, ENQUANTO OS EMARANHADOS SÃO AGREGADOS INTRACELULARES COMPOSTOS POR UMA FORMA HIPERFOSFORILADA DA PROTEÍNA TAU.

FONTE: BLENNOW, LEON e ZETTERBERG, 2006.

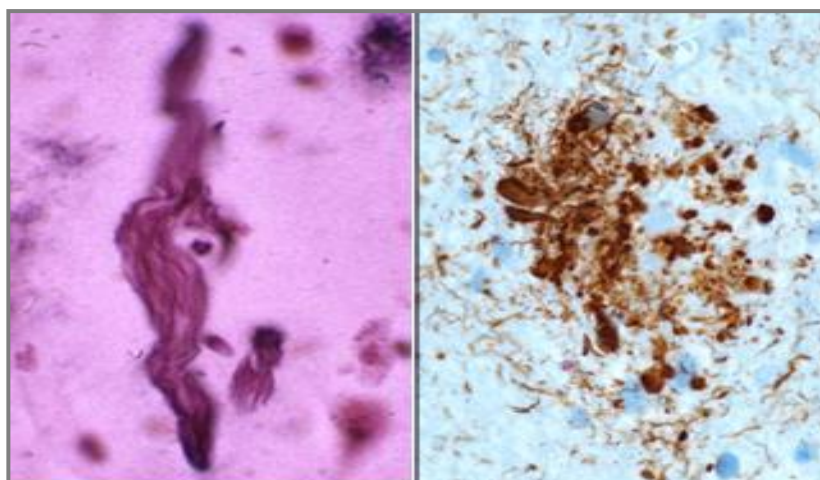


FIGURA 2: EMARANHADOS NEUROFIBRILARES (ESQUERDA) E PLACA NEUTRÍTICA: TAU-HIPERFOSFORILADA COM NEURITOS DISTENDIDOS (DIREITA).

FONTE: CASTELLANI, ROLSTON e SMITH, 2010.

2.2.2 Diagnóstico de DA

O diagnóstico é realizado através de um exame neurológico acurado, composto por anamnese detalhada, exames laboratoriais e de neuroimagem, além da avaliação neuropsicológica, quando necessária (NITRINI et al., 2005; FROTA et al., 2011).

Os critérios clínicos recomendados são os sugeridos pela ABN (QUADRO 2), seguido de exames laboratoriais específicos para excluir e averiguar outras possíveis causas do comprometimento cognitivo, dentre os quais: hemograma completo, creatinina sérica, hormônio tireo-estimulante, albumina, enzimas hepáticas, vitamina B12, ácido fólico, reações sorológicas para sífilis e, em pacientes com idade inferior a 60 anos com apresentações clínicas atípicas ou com sintomas sugestivos, pede-se também sorologia para HIV (CARAMELLI et al., 2011).

Os exames de neuroimagem estrutural, como tomografia computadorizada ou ressonância magnética, auxiliam para uma investigação mais apurada e eliminam causas secundárias. Entretanto, os exames de neuroimagem funcional, quando disponíveis, aumentam a confiabilidade diagnóstica por mensurar o metabolismo cerebral e ajudam no diagnóstico diferencial, assim como a análise de biomarcadores moleculares (CARAMELLI et al., 2011).

O objetivo da anamnese é verificar, brevemente, o desempenho cognitivo e o atual estado da vida diária do indivíduo. Para isso, pode ser utilizado testes de rastreio, tais como: o Mini Exame do Estado Mental (MEEM) (ANEXO 2); *Clinical Dementia Rating – CDR*; Escala de Depressão Geriátrica de Yesavage, na versão reduzida (GDS-15) (ANEXO3); Atividades de vida diária como o PFEFFER (ANEXO 4) e testes que avaliem a memória (evocação tardia de palavras ou lista de figuras), fluência verbal (número de nomeações de animais/palavras com a letra F em um minuto) e o desenho do relógio (PETERSEN et al, 2001; MONTANO e RAMOS, 2005).

O MEEM tem por objetivo auxiliar no rastreio de possíveis déficits cognitivos, por meio de uma escala de pontuação de 0-30, no qual os valores menores estão associados a um menor desempenho (FOLSTEIN et al., 1974). Divide-se em sete categorias, tendo cada qual a função de averiguar as funções cognitivas específicas

(orientação temporal/espacial; memória imediata; atenção e cálculo; evocação; lembrança de palavras; linguagem e capacidade construtiva) (TALMELLI et al., 2010).

O teste *Clinical Dementia Rating* – CDR é utilizado para mensurar a gravidade dos sintomas de demência, no qual o escore CDR= 1 refere-se à demência leve, CDR=2 a demência moderada e CDR=3 a demência grave.

A escala de Depressão Geriátrica de Yesavage, na versão reduzida (GDS-15), auxilia no rastreio de depressão em idosos para diferenciação entre demência e depressão ou ainda de outros transtornos neuropsiquiátricos.

Na demência da doença de Alzheimer, o MEEM também pode ser utilizado para verificar a progressão da doença juntamente com o CDR (FORMARI et al., 2010). Observa-se que, em média, o paciente com DA diminui de 3 a 3,5 pontos/anual na escala de pontuação do MEEM (HAN, et al., 2000), e no CDR nota-se, em torno de dois anos, o progressivo declínio funcional e cognitivo com o aumento do escore (NOURHASHEMI, et al., 2008).

A avaliação clínica ocorre em duas etapas, nas quais primeiramente preenchem-se os critérios para síndrome demencial e, depois, classifica-se a síndrome em DA possível, provável ou definida (FROTA et al., 2011). O diagnóstico de DA definida é dada apenas com exame anatomopatológico *post mortem*. A acurácia dos critérios utilizados na clínica foi correlacionada em até 87% com os achados neuropatológicos, com uma sensibilidade de 81% e especificidade de 70% (GEARING et al., 1995; KNOPMAN et al., 2001).

Na fase de DA provável, observa-se um início insidioso e progressivo, sem que haja outras doenças cerebrais ou sistêmicas que possam justificar os déficits cognitivos. Pode-se definir DA possível quando existem variações iniciais na apresentação ou curso da doença, ou quando há presença suficiente de doença sistêmica ou cerebral para produzir demência, sem que a estejam causando (BRUCKI et al., 2011).

1. Demência da doença de Alzheimer provável - Preenche os critérios para demência e tem adicionalmente as seguintes características:

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1.1. Início insidioso (meses ou anos). 1.2. História clara ou observação de piora cognitiva. 1.3. Déficits cognitivos iniciais e mais proeminentes em uma das seguintes categorias: <ul style="list-style-type: none"> • Apresentação amnésica (deve haver outro domínio afetado). • Apresentação não-amnésica (deve haver outro domínio afetado). • Linguagem (lembranças de palavras). |
|--|

<ul style="list-style-type: none"> • Visual-espacial (cognição espacial, agnosia para objetos ou faces e alexia). • Funções executivas (alteração do raciocínio, julgamento e solução de problemas). <p>1.4 Tomografia ou, preferencialmente, ressonância magnética do crânio deve ser realizada para excluir outras possibilidades diagnósticas ou comorbidades, principalmente a doença vascular cerebral.</p> <p>1.5 O diagnóstico de demência da DA provável não deve ser aplicado quando houver:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evidência de doença cerebrovascular importante definida por história de AVC temporalmente relacionada ao início ou piora do comprometimento cognitivo; ou presença de infartos múltiplos ou extensos; ou lesões acentuadas na substância branca evidenciadas por exames de neuroimagem; ou • Características centrais de demência com corpos de Lewy (alucinações visuais, parkinsonismo e flutuação cognitiva); ou • Características proeminentes da variante comportamental da demência frontotemporal (hiperoralidade, hipersexualidade, perseveração); ou • Características proeminentes de afasia progressiva primária manifestando-se como a variante semântica (também chamada demência semântica, com discurso fluente, anomia e dificuldades de memória semântica) ou como a variante não-fluente, com agramatismo importante; ou • Evidência de outra doença concomitante e ativa, neurológica ou não-neurológica, ou de uso de medicação que pode ter efeito substancial sobre a cognição. <p>1.6 Os seguintes itens, quando presentes, aumentam o grau de confiabilidade do diagnóstico clínico da demência da DA provável:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evidência de declínio cognitivo progressivo, constatado em avaliações sucessivas; • Comprovação da presença de mutação genética causadora de DA (genes da APP e presenilinas1 e 2); • Positividade de biomarcadores que reflitam o processo patogênico da DA (marcadores moleculares através de Tomografia por emissão de Pósitrons – PET- ou líquido cefalorraquidiano; ou ainda neuroimagem estrutural e funcional). • A ocorrência do primeiro item confirma a existência de um mecanismo degenerativo, apesar de não ser específico da DA.
<p>2. Demência da doença de Alzheimer possível - Preenche os critérios diagnósticos clínicos para demência da DA, porém apresenta alguma das circunstâncias abaixo:</p> <p>2.1. Curso atípico: início abrupto e/ou padrão evolutivo distinto daquele observado usualmente, isto é lentamente progressivo.</p> <p>2.2. Apresentação mista: tem evidência de outras etiologias conforme detalhado no item 1.4 dos critérios de demência da DA provável (doença cerebrovascular concomitante; características de demência com corpos deLewy; outra doença neurológica,comorbidadenão-neurológica ou uso de medicação que possam ter efeito substancial sobre a cognição).</p> <p>2.3. Detalhes de história insuficientes sobre instalação e evolução da doença.</p>
<p>3. Demência da doença de Alzheimer definida</p> <p>Preenche critérios clínicos e cognitivos para demência da DA e exame neuropatológico (<i>post mortem</i> ou biópsia) demonstra a presença de patologia da DA.</p>

QUADRO 2 - CRITÉRIO DIAGNÓSTICO PARA DEMÊNCIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER DE ACORDO COM A ABN. FONTE: FROTA et al. (2011).

2.2.3 Tratamento

O sistema colinérgico central exerce papel fundamental nos mecanismos de memória e aprendizagem, tanto que seu déficit na DA gera comprometimento

cognitivo (BARTUS et al., 1982). Observa-se que indivíduos com DA possuem menor produção cerebral de colina-acetiltransferase (ChAT) que, por sua vez, induz a uma menor produção de acetilcolina (ACh), contribuindo para disfunção colinérgica (WHITEHOUSE et al, 1982).

Para tanto, a terapia mais comumente utilizada para DA são os inibidores da acetilcolinesterase (IChE) que aumentam a neurotransmissão colinérgica. O uso desses anticolinesterásicos melhora a manifestação clínica da doença, principalmente na esfera cognitiva; porém este efeito é temporário, pois esta classe de medicamentos não impede a progressão da doença (PARNETTI et al., 2007)

Atualmente, existem cinco substâncias indicadas para o tratamento de DA, sendo que apenas quatro delas são utilizadas na prática clínica. Três destas são inibidores colinérgicos: galantamina, donepezil e rivastigmina e um antagonista glutamatérgico NMDA, a memantina (BRUCKI et al., 2011).

2.2.3.1 Inibidores de colinesterase–IChE

Os anticolinesterásicos são normalmente utilizados na fase leve e moderada da DA, inibindo a ação das colinesterases, acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), aumentando a disponibilidade do neurotransmissor acetilcolina (ACh) na fenda sináptica (ENGELHARDT et al., 2005).

A galantamina apresenta dupla ação: possui inibição seletiva da AChE, além da modulação de receptores nicotínicos de ACh. Sugere-se que esta modulação possa ter benefício no domínio cognitivo atencional (CARAMELLI et al., 2004). O tratamento inicia-se com 8 mg/dia e é aumentado até a dose máxima de 24 mg/dia (CUMMINGS, 2004).

Derivado da piperidina, o donepezil é um inibidor reversível e seletivo da AChE, com meia-vida de aproximadamente 70 horas. A dose inicial é de 5mg/dia e aumenta-se até 10mg/dia. Possui metabolismo hepático e interações medicamentosas com o uso de outras drogas que compartilhem da mesma via (CUMMINGS et al., 2004; ENGELHARDT et al., 2005).

A rivastigmina é oriunda do carbamato e tem ação seletiva da AChE, principalmente no neocórtex e hipocampo com inibição pseudo-irreversível.

Diferentemente da galantamina e donepezil, ela não possui metabolismo hepático, mas sim renal e também inibe a butirilcolinesterase (BChE) (ENGELHARDT et al., 2005). O tratamento inicia-se com 1,5 mg a cada 12 horas e prossegue com o aumento até 6 mg/2 vezes ao dia (CUMMINGS, 2004).

2.2.3.2 Antagonista dos receptores glutamatérgicos NMDA

O glutamato é um neurotransmissor excitatório abundante no sistema nervoso central e tem influência em vários mecanismos, inclusive os cognitivos. Os receptores NMDA são ativados pelo glutamato e estão envolvidos nos processos de aprendizagem e memória (DANYSZ et al., 1998).

A memantina é um antagonista dos receptores glutamatérgicos NMDA aprovada para o uso clínico em pacientes com DA moderada a grave (BRUCKI et al., 2011). Oferece neuroproteção em relação à excitotoxicidade do glutamato, além de permitir a neurotransmissão e os mecanismos de neuroplasticidade dos neurônios funcionais (ENGELHARDT et al., 2005).

A dose inicial é 5 mg/dia, escalonada para 10 mg/2 vezes ao dia (CUMMINGS et al., 2004). Sua eliminação é renal e não interfere com o sistema do citocromo P450, havendo pouca interação com outros medicamentos. Também não interfere no metabolismo dos IChE podendo ser utilizados concomitantemente (ENGELHARDT et al., 2005).

2.3 COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE (CCL)

O CCL caracteriza-se por alterações cognitivas, especialmente da memória episódica recente, em indivíduos que mantêm suas atividades cotidianas relativamente preservadas e não preenchem os critérios clínicos para o diagnóstico de demência (PETERSEN et al., 1999).

Os critérios para o diagnóstico clínico foram estabelecidos pela *National Institute on Aging-Alzheimer's Association (NIAA)* e baseiam-se no declínio cognitivo,

verificado por testagem cognitiva ao longo do tempo, ou por queixa cognitiva subjetiva do paciente e/ou informante (ALBERT et al., 2011). Entretanto, as atividades funcionais de vida diária seguem preservadas, mas as atividades instrumentais complexas podem estar alteradas (PETERSEN et al., 2001; WINBLAD et al., 2004).

O CCL pode ser classificado de acordo com o domínio cognitivo prejudicado e pelo desenvolvimento da patologia (QUADRO 3), sendo que cada tipo de manifestação clínica pode ser originária de múltiplas etiologias, das quais: degenerativas, vasculares, alterações metabólicas, danos traumáticos e de causa psiquiátrica (PETERSEN et al., 2001).

O quadro clínico definido como CCL estável, ocorre quando não há agravamento do déficit cognitivo e nem retorno a normalidade. Todavia, quando se identifica um declínio cognitivo constante e progressivo de memória episódica, além de outras funções cognitivas, infere-se que seja um CCL conversor para demência (CAIXETA et al., 2012).

Aproximadamente 10% a 15% dos casos de CCL são convertidos para demência, ao contrário de indivíduos com a mesma idade, onde a média de progressão para demência é de 1% a 2% por ano (PETERSEN, 2004)

CLASSIFICAÇÃO DO CCL	DESCRIÇÃO DOS DOMÍNIOS COGNITIVOS AFETADOS
CCL amnésico	Déficit isolado na memória episódica, com preservação de outros processos cognitivos.
CCL de um único domínio não amnésico	Memória preservada, mas ocorrem alterações em outros domínios, como linguagem, atenção, processos executivos ou funções visuoespaciais.
CCL de múltiplos domínios	Inclui prejuízos na memória e em outros processos cognitivos.

QUADRO 3 - DESCRIÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO DO CCL. FONTE: PETERSEN et al (2001).

2.4 GENÉTICA E DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA é uma síndrome multifatorial, cujo estabelecimento deve-se a interação de fatores genéticos e ambientais, os quais contribuem concomitantemente para o

estabelecimento e para os diferentes graus de gravidade da demência (FRIDMAN et al., 2004).

Observa-se que parentes de primeiro grau de pacientes com DA tem um risco maior de incidência entre 15%-35%, do que a população em geral (BREITNER e FOLSTEIN, 1984). Além disso, nota-se que entre a DA familiar e a DA esporádica, a familiar tende a ser mais agressiva (BONDARREFF et al., 1987), principalmente em relação à idade de início.

Na forma rara de DA, já foram identificados três genes: o gene da *APP*, o gene da *PSEN1* e o gene da *PSEN2*. Entretanto, mutações nesses genes são responsáveis apenas por 5% do total de casos de DA, dentre os quais 0-1% seguem o padrão de herança autossômico (HARVEY, SKELTON-ROBINSON e ROSSOR, 2003). Os 95% restantes são, na maioria, casos esporádicos de início tardio, com etiologia complexa devido a interações entre componentes ambientais e genéticos (FRIDMAN et al., 2004).

A primeira mutação identificada foi no gene *APP*, responsável pela codificação da proteína precursora amiloide (*APP- do inglês- Amyloid Precursor Protein*), presente no cromossomo 21 (GOATE et al., 1991). A APP é uma proteína de 695 a 770 aminoácidos que contém uma pequena porção carboxi-terminal intracitoplasmática, uma pequena porção intra ou transmembrana, ao passo que a porção amino-terminal situa-se no espaço extracelular. O processamento da proteína APP resulta em fragmentos de βA de 40 e 42 aminoácidos, respectivamente. O fragmento de 42 aminoácidos é neurotóxico, e seu acúmulo resulta na formação de fibras amilóides e posterior acúmulo, formando as placas senis (FRIDMAN et al., 2004).

As mutações identificadas nos genes homólogos das presenilina 1 (*PSEN1*) e presenilina 2 (*PSEN2*), localizados nos cromossomos 14 e 1, respectivamente (SHERRINGTON, ROGAEV e LIANG, 1995), também contribuem para o aumento da produção do fragmento βA_{42} .

Na forma esporádica, verifica-se a associação de risco para a DA com o alelo *APOE e4* do gene da apolipoproteína E (*APOE*) (SERRETTI et al, 2007). Nota-se que indivíduos heterozigotos para o alelo *APOE e4* possuem um risco elevado de até três vezes em desenvolver a doença, enquanto que, em portadores homozigotos este risco pode chegar a ser 15 vezes superior quando comparado com indivíduos não portadores do alelo (FARRER, CUPPLES e HAINES, 1994).

No entanto, menos do que a metade de todos os pacientes de DA possuem o alelo *APOE e4* e nem todos os portadores deste, desenvolvem a doença (BERTRAM, 2009).

O alelo *APOE e4* tende a modular a idade de início da DA, sendo que cada cópia da variante *APOE e4* pode baixá-la em quase 10 anos (CORDER, SAUNDERS e STRITTMATTER, 1993). Porém, o *APOE* por si só não reflete toda a herdabilidade para a ocorrência da doença, outros genes devem estar exercendo influências adicionais, além dos fatores ambientais (GRUNDLATT et al., 2011).

Recentemente estudos de associação genômica ampla (*Genome-wide association study - GWAs*) incluíram novos alelos dos genes *CLU*, *PICALM*, *ABCA7*, *MS4A6A/MS4A4E*, *EPHA1*, *CD33*, *CD2AP*, *CR1* e *BLIN1* como fatores de risco para DA esporádica (HAROLD et al., 2009; LAMBERT et al., 2009; SESHADRI et al., 2010; HOLLINGWORTH et al., 2011; NAJ et al., 2011).

2.4.1 Colina O-acetiltransferase - *CHAT*

Em roedores o gene *CHAT* contém quinze éxons, sendo três não codificantes (R, N e M) situados na região 5'UTR (MALLET et al., 1998). Existem dois promotores na região *upstream* dos éxons R e M (IBANEZ e PERSON, 1991; BEJANIN et al., 1992; MISAWA e DEGUCHI, 1992). O uso desses diferentes promotores e mais o *splicing* alternativo da região 5' UTR geram diferentes mRNA (NACIFF et al., 1999).

Existem sete variantes de mRNA em camundongos (R1, R2, R3, R4, N1, N2 e M) (MISAWA et al., 1992) e cinco em ratos (R1, R2, N1, N2, e M) (KENGAKU et al., 1993). Contudo, todos convergem na produção de um único polipeptídeo maduro de 69kDa, pois as alterações ocorrem somente no primeiro éxon não codificante (HAHN et al., 1992; MISAWA e DEGUCHI, 1992; KENGAKU et al., 1993).

No primeiro íntron do gene, encontra-se o gene *VACHT*, o qual segue a mesma orientação transcricional de *CHAT* (BEJANIN et al., 1994). Essa organização de dois genes em um mesmo locus é denominada como locus colinérgico e está conservada em *Caenorhaditis elegans* (ALFONSO et al., 1994), camundongos (KITAMOTO et al., 1998), *Drosophila* (NACIFF et al., 1997) e humanos (ERICKSON et al., 1994), sugerindo a expressão coordenada destes genes (FIGURA 3).

Em humanos, o gene *CHAT* encontra-se no braço longo do cromossomo 10, na posição 10q11.2, composto por 18 éxons, dos quais quatro não são codificantes (R, N, M e S) e também geram transcritos diferentes devido ao processamento alternativo do gene (FIGURA 4) (OHNO et al., 2001; GILL et al., 2007).

De acordo com Gill et al. (2007) são conhecidas sete isoformas de mRNA de ChAT: R1, R2, N1, N2, H, S e M. O mRNA M e S geram dois diferentes polipeptídios, um de 82 kDa e outro menor de 69kDa (ODA et al., 1992; MISAWA et al., 1997; OHNO et al., 2001). Porém, os transcritos R, N e H produzem apenas o polipeptídio menor, semelhantemente ao produto gênico em roedores (ODA, et al., 1992; MISAWA et al., 1997; ODA, 1999).

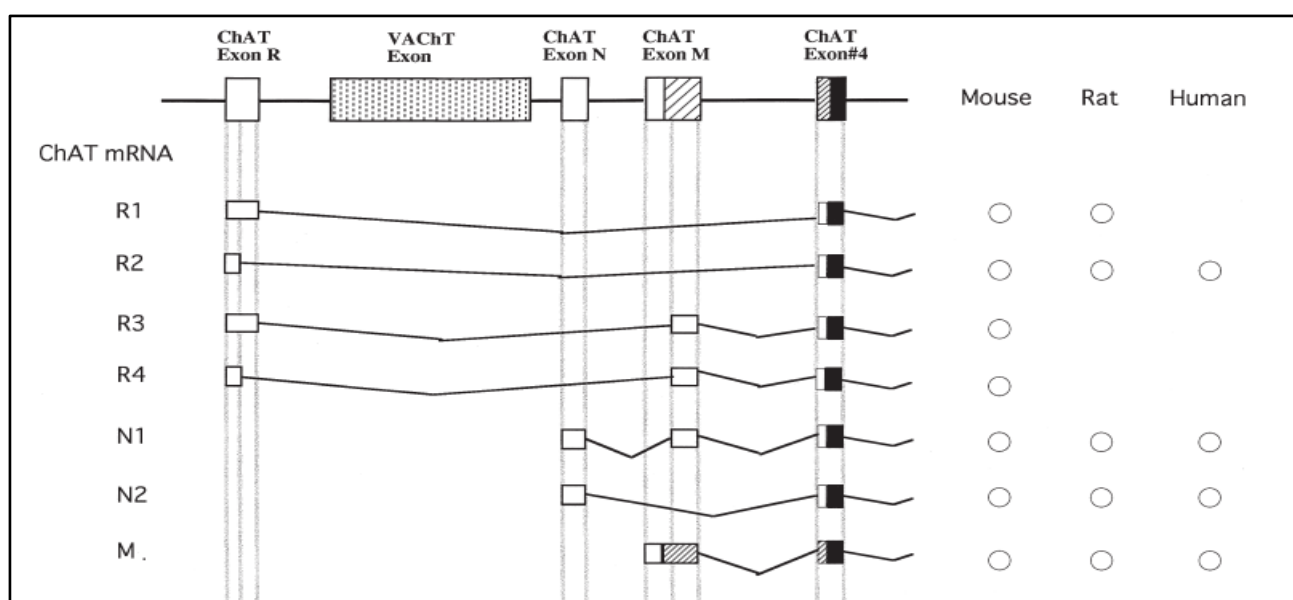


FIGURA 3: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO COMPARANDO OS PADRÕES DE *SPLICING* DA *CHAT* EM ROEDORES E HUMANOS. BLOCOS EM PRETO REFEREM-SE ÀS REGIÕES CODIFICANTES EM COMUM; BLOCOS EM BRANCO AS REGIÕES NÃO CODIFICANTES E OS BLOCOS RASURADOS REGIÕES TRADUZIDAS SOMENTE EM HUMANOS.

FONTE: ODA, 1999.

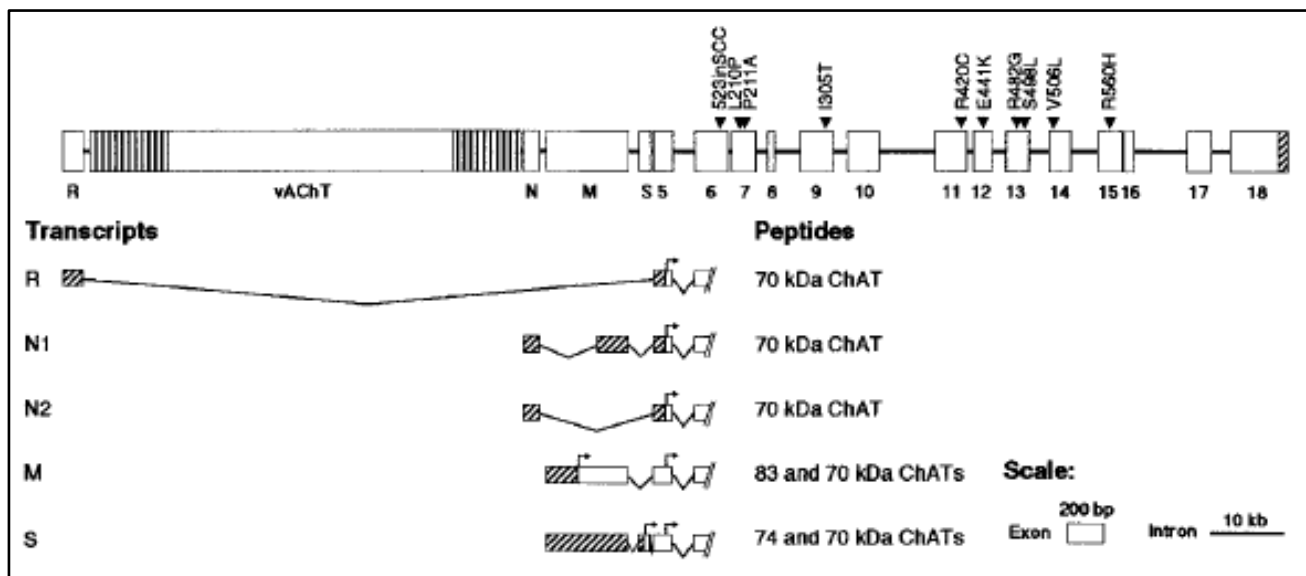


FIGURA 4: DIAGRAMA ILUSTRATIVO DA ESTRUTURA GÊNICA E PRODUTOS DO PROCESSAMENTO ALTERNATIVO NO GENE CHAT EM HUMANO. O RASURADO EM VERTICAL E DIAGONAL CORRESPONDEM EM REGIÕES NÃO TRADUZIDAS DE VACHT E CHAT, RESPECTIVAMENTE. OS ÉXONS E ÍNTRONS ESTÃO DESENHADOS DE ACORDO COM A ESCALA INDICADA.

FONTE: OHNO et al., 2001.

A diferença entre as isoformas 82kDa e 69 kDa está em uma extensão amino-terminal de 118 aminoácidos. Além disso, o transcrito mRNA M humano possuem dois locais de iniciação de tradução, por isso gera a enzima com 82-kDa, visto que outra espécie também possuem a região M, mas não expressam essa isoforma (GILL et al., 2007).

Ademais, existem dois tipos gerais de mRNA *CHAT*, a forma mais usual cChAT, expressa comumente no sistema nervoso central e periférico e a pChAT expressa somente nos neurônios periféricos (pChAT) (TOYAMA et al., 2000). Os mRNA pChAT geram dois polipeptídeos, um com aproximadamente 50kDa, o qual difere de mRNA cChAT pela retirada dos éxons 6, 7, 8 e 9 (TOYAMA et al., 2000) e outro pequeno de 27kDa, o qual não possui atividade catalítica (FIGURA 5) (GROSMANN et al., 1995).

Ainda não está claro a distinção funcional de pChAT e cChAT, contudo verifica-se diferenças na estrutura dos sítios catalíticos, no transporte intracelular do núcleo para o citoplasma e que pChAT não possui forma ligada a membrana plasmática (BELLIER et al., 2011).

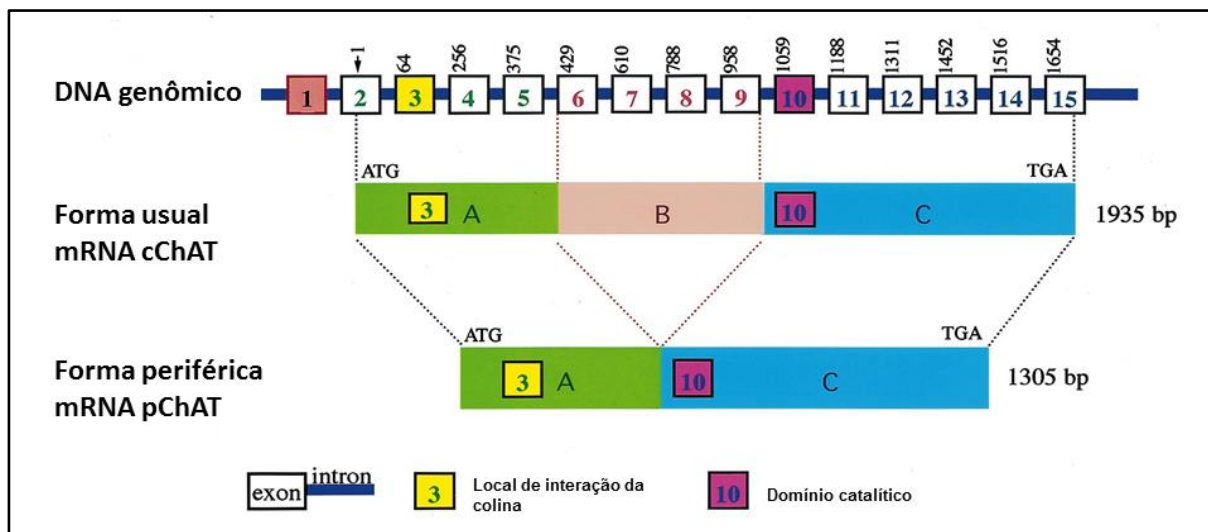


FIGURA 5: COMPARAÇÃO ENTRE OS TIPOS DE MRNA DE CHAT, CCHAT E PCHAT. NÃO ESTÃO DEMONSTRADAS AS REGIÕES DOS ÉXONS R, N E M PRESENTES NA EXTREMIDADE 5' UTR.

FONTE: TOAYAMA et al., 2000.

2.4.2 Transportador Vesicular da acetilcolina - *VACHT*

O gene *SLC18A3*, ou mais comumente conhecido por *VACHT*, encontra-se ininterruptamente dentro do primeiro íntron do gene *CHAT* (10q11.2), ou seja, não possui região intrônica, e codifica a proteína transportadora vesicular da acetilcolina – VACHT (HAHM et al., 1997; MALLETT et al., 1998).

Para que ocorra expressão restrita do *VACHT* nos neurônios colinérgicos são necessários elementos distintos de controle, seja pela atividade de promotores específicos, mecanismos pós-transcricionais e processos de glicosilação (De GOIS, 2000; CASTELL et al., 2002).

O *VACHT* é transcrito por dois promotores localizados no primeiro íntron do *CHAT* e produz os mRNA V1 e V2. O transcrito R e V3 são gerados pelo *splicing* nos sítios de poliadenilação e pela manutenção do mRNA não excisado, respectivamente (FIGURA 6) (MALLETT et al., 1998).

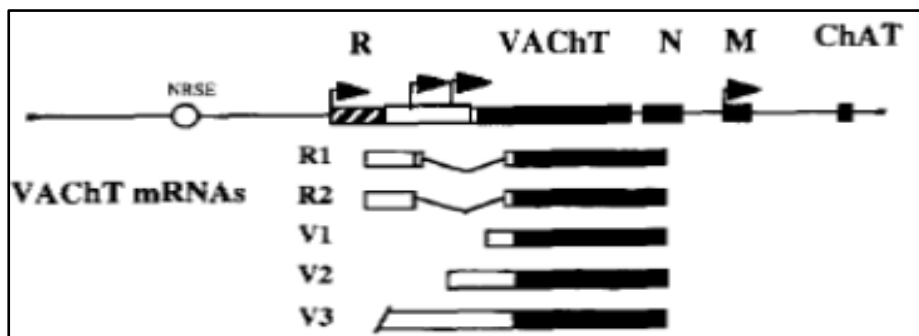


FIGURA 6: ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENE *VACHT* E OS TRANSCRITOS GERADOS. AS CAIXAS EM PRETO, BRANCO E RASURADO INDICAM AS SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS, NÃO CODIFICADORAS E O ÉXON R, RESPECTIVAMENTE.

FONTE: MALLET et al., 1998.

Apesar dos vários transcritos gerados, um único produto gênico é expresso nos neurônios colinérgicos, o transportador vesicular da acetilcolina. A homologia é de 94% entre os aminoácidos do VACHT humano e de ratos (ERICKSON et al., 1994). Esta proteína tem a função de armazenar a acetilcolina (ACh) intraplasmática em vesículas até que ocorra a liberação do neurotransmissor na fenda sináptica (ODA, 1999).

2.4.3 Estudos de associação entre *CHAT*, *SLC18A3* e DA

Os resultados dos estudos de associação entre polimorfismos do *CHAT* e DA são escassos e controversos (ALZGENE, 2014).

Mubumbila et al. (2002) foram um dos primeiros a realizar estudos de associação caso-controle de polimorfismos do gene *CHAT* com DA. No trabalho, os autores mostram associação do *SNP rs3810950* (transição G→A), localizado logo após o códon de iniciação ATG, com a DA (OR* = 3.7, valor de p = <0,0005), no qual sugerem que o genótipo homozigoto AA confere risco para o desenvolvimento da doença.

Outros trabalhos replicaram o estudo com a variante *rs3810950*, obtendo resultados controversos de não associação (HAROLD et al., 2003; SCHAWARZ et al., 2003; XU et al., 2013) e associação genotípica e/ou alélica (KIM et al., 2004; GRÜBLATTI et al., 2011; LEE et al., 2012).

Ademais, alguns grupos apresentaram resultados dentro do intervalo de tendência para a mesma variante ($p = >0,05 <0,1$) (ORTZUK et al. 2006; JO et al., 2006; TANG et al., 2008; SCACCHI et al., 2009; XU et al., 2013). Contudo, ao avaliar outras variantes do gene *CHAT*, Ortzuk et al. (2006) verificaram associação entre as frequências alélicas ($p=0,028$) e genotípicas ($p= 0,029$) do *rs868750* e a doença de Alzheimer, assim como Cook et al (2005) para a variante *rs2177339* ($p=0,0003$ e $p=0,0026$).

Além desses SNPs, foram investigados outros polimorfismos, no total de 16 variantes ao longo do gene *CHAT* (HAROLD et al., 2003; COOK et al., 2005; ORTZUK et al. 2006; PICCARDI et al., 2007; GRÜBLATTI et al., 2011; XU et al. 2013) e *SLC18A3* (HAROLD et al., 2003), porém nenhum dos estudos encontraram diferenças significativas entre casos e controles.

Além das investigações entre variantes do gene *CHAT* e DA, analisou-se a influencia do SNP *rs3810950* em idosos não dementes com o intuito de verificar o desempenho cognitivo (MENGEL-FROM et al., 2011). O estudo mostrou correlação positiva entre a presença do alelo A com o baixo desempenho cognitivo, dependente de idade. Lee et al (2012) também correlacionaram este *SNP* com o aumento do déficit colinérgico, porém em pacientes com DA.

Ademais aos estudos de associação, tem-se investigado a influência das mutações em relação ao tratamento colinérgico em DA. Harold et al. (2006) relataram a influência do *SNP* (*rs733722*, C>T), presente na região promotora, verificaram que os pacientes portadores do alelo T apresentavam um menor declínio cognitivo em relação aos não portadores ($p=0,006$). Enquanto que Scacchiet al. (2009) não observaram dados relevantes, mas destacaram que indivíduos que portavam o alelo *APOE e4* apresentaram melhor resposta a rivastigmina.

2.5 ENZIMAS COLINÉRGICAS

2.5.1 Colina-acetiltransferase - ChAT

Independentemente da forma encontrada, a colina-acetiltransferase (ChAT) atua como catalisadora na síntese do neurotransmissor acetilcolina (ACh), pois intervém na transferência do grupo acetil, oriundo do grupo acetil-coenzima A (CoA), para a colina no corpo dos neurônios colinérgicos e não colinérgicos (BELLIER et al., 2011; LEE et al., 2012). Além do mais, também há evidências da atividade da ChAT em linfócitos T (KAWASHIMA e FUJI, 2003), células da placenta (HERSH e PEET, 1978) e em espermatozoides (SASTRY et al., 1983).

Em sequência, ocorre o acúmulo da ACh citoplasmática, a qual é armazenada em vesículas sinápticas por outra enzima, o transportador vesicular da acetilcolina (VAcHT), onde fica estocada até a sua liberação na fenda sináptica (FIGURA 7) (ODA, 1999; GOVINDASAMY et al., 2004).

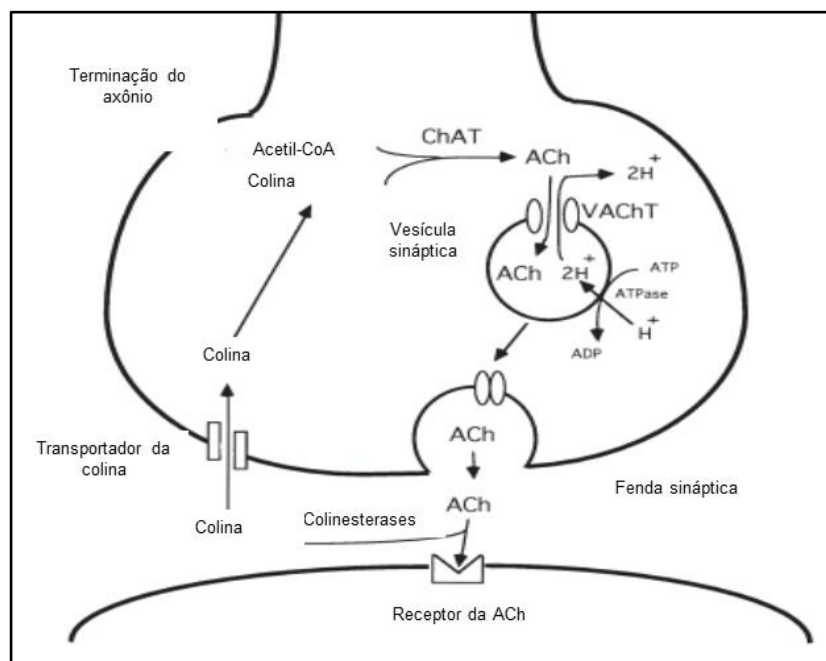


FIGURA 7: SÍNTESE COLINÉRGICA. CAPTAÇÃO DE COLINA EXTRACELULAR, BIOSÍNTESE DE ACETILCOLINA A PARTIR DE COLINA E ACETIL-COENZIMA A, O ACÚMULO E TRANSPORTE DA ACETILCOLINA EM VESÍCULAS SINÁPTICAS E LIBERAÇÃO DE ACh POR DESPOLARIZAÇÃO DA MEMBRANA NEURONAL COLINÉRGICA.

FONTE: ODA, 1999.

Verificam-se duas formas da proteína nos neurônios colinérgicos, solúvel e outra não iônica, ligada à membrana. Ainda existem controvérsias sobre a forma não iônica da enzima, contudo sabe-se que a forma solúvel é mais presente e representa cerca de 80-90% da atividade total da enzima ChAT (ODA, 1999).

Em relação à classificação do principal local expresso, a pChAT não apresenta a forma ligada à membrana da proteína, somente a forma solúvel. Enquanto que a cChAT citosólica interage com proteínas âncoras na membrana plasmática (GABRIELLE, 2003).

Ambas a formas, pChAT e cChAT, possuem os sítios catalíticos responsáveis pela interação da enzima com a colina (Tyr95, Ser548, Val565 e Tyr562) e com acetil-CoA (Lys413, Lys417, Asp424, Glu447 e Gln51), porém diferem no resíduo His334 e no grupo sulfidrilo, os quais atuam na estabilização e como catalisador básico dos produtos intermediários da reação (CAI et al, 2004; GOVINDASAMY et al, 2004; KIM et al., 2006). Isso decorre da perda dos éxons 6,7,8 e 9 que a pChAT sofre no processamento alternativo, diminuindo funcionalmente a atividade catalítica quando comparada a forma mais comum, cChAT (BELLIER et al., 2002).

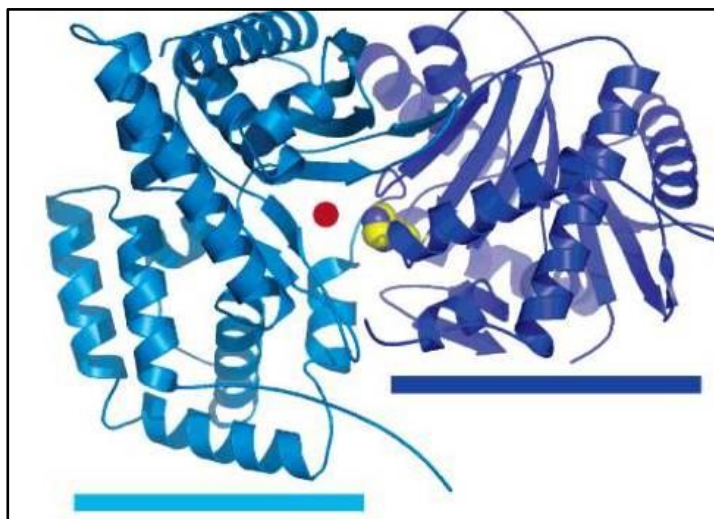


FIGURA 8: ESTRUTURA EM 3D DA ENZIMA CHAT HUMANA. A BARRA AZUL CLARO SINALIZA O DOMÍNIO DE LIGAÇÃO A MEMBRANA E A BARRA AZUL ESCURO A REGIÃO CATALÍTICA. O PONTO VERMELHO ENTRE OS DOMÍNIOS SINALIZA O SÍTIO ATIVO DE LIGAÇÃO DA COA.

FONTE: Kim et al., 2006.

Alguns estudos mostram que a atividade da ChAT está correlacionada inversamente com o grau da DA, concentração da β -amilóide, quantidade de placas amilóides e dos emaranhados neurofibrilares (WILCOCK et al., 1982; BIERER et al., 1995; BEACH et al., 2000).

Além disso, verificaram que a baixa regulação conjunta dos níveis de atividade da ChAT na região frontal do córtex e no hipocampo, levaram pacientes

com comprometimento cognitivo leve ao desenvolvimento da DA (DEKOSKY et al., 2002).

Em estudos caso-controle, observou-se baixas concentrações da ChAT, a nível encefálico, na DA (DAVIS et al., 1999; GONZÁLEZ-CASTANEDA et al., 2013). Baixos níveis de proteína foram correlacionados com a gravidade de DA devido ao déficit gerado nas funções neuropsicológicas (BASKIN et al, 1999). Sugere-se ainda, que o baixo desempenho cognitivo seja dependente da idade (MENGEL-FROM et al. 2011).

Recentemente, Vijayaraghavan et al. (2013) demonstraram a existência de ChAT em líquidos extracelulares, tais como no plasma e no líquido cefalorraquidiano, diferentemente do que era conhecido até o momento, a qual ChAT estaria presente e ativa somente no meio intracelular. Além disso, mostraram a secreção de ChAT em células não neuronais e que o nível de ACh é mantido estável no plasma e no líquido cefalorraquidiano, mesmo na presença das enzimas degradadoras (AChE e BChE).

2.5.2 Butirilcolinesterase Humana - BChE

A Butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) faz parte da família de enzimas que hidrolisam o neurotransmissor acetilcolina (ACh) no sistema nervoso e periférico, assim como a acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) (POHANKA, 2011). Diferentemente da AChE que é específica para ACh, a BChE também hidrolisa ésteres não colina, sendo conhecida como pseudocolinesterase (DARVESH et al., 2003).

A BChE é produzida no fígado e distribuída em diferentes tecidos e regiões do organismo, tais como plasma, coração, pâncreas, endotélio vascular, músculo liso, adipócitos, neurônios e líquido cefalorraquidiano (CHATONNET e LOCKDRIDGE, 1989; DARVESH et al., 2003). É um tetrâmero glicoproteico, formada por quatro subunidades e codificada pelo gene *BCHE* que está localizado no cromossomo 3q26 (FIGURA 9a) (POHANKA, 2011).

A forma monomérica G1, possui formato globular e pode se unir com outro monômero por ligações dissulfeto entre os resíduos de cisteína na posição 571 de

cada molécula, estabelecendo o dímero G2. A forma tetramérica e solúvel da BChE ocorre devido a interações hidrofóbicas entre dois dímeros. A BChE também é encontrada na forma assimétrica e ancorada a membrana por proteínas âncoras, ricas em prolina ou colágeno (FIGURA 9b) (DARVESH et al., 2003).

As formas globulares solúveis em plasma, assim como as formas ligadas a membrana celular no músculo liso e cérebro são codificadas pelo mesmo mRNA, pois não existem formas de processamento alternativo no gene *BCHE* (MASSOULIE, 2002).

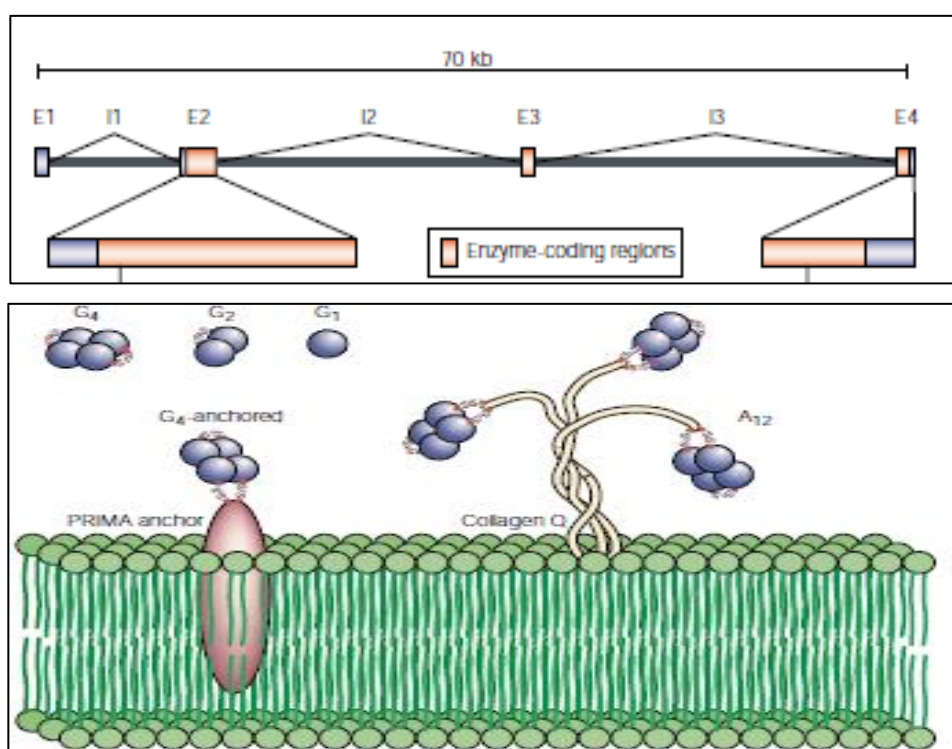


FIGURA 9: ILUSTRAÇÃO DA ESTRUTURA DO GENE CODIFICADOR *BCHE* (9A) E DAS FORMAS MOLECULARES (9B).

FONTE: DARVESH et al., 2003.

No sistema nervoso, a enzima está envolvida na formação da amígdala, hipocampo e tálamo, sendo expressa principalmente no pericário dos neurônios e dendritos proximais (DARVESH et al, 1998; DARVESH e HOPKINS, 2003), além do líquido cefalorraquidiano.

Na DA, evidências sugerem um papel importante da butirilcolinesterase no curso da patologia devido a interferências na regulação colinérgica e não colinérgica

(DARVESH et al, 1998; MESULAM et al., 2002a, MESULAM et al., 2002b; DARVESH et al., 2003). A expressão da BChE aumenta demasiadamente no hipocampo e no córtex temporal, quando comparado com indivíduos normais, enquanto que a expressão da AChE é reduzida (Perry et al., 1978). O aumento da atividade da enzima está correlacionado com prejuízos no desempenho cognitivo e na progressão de DA (DARREH-SHORI et al., 2002; GIACOBINI et al., 2002; O'BRIEN et al., 2003). No líquido cefalorraquidiano e plasma nota-se um padrão inverso da atividade e concentração da BChE, onde os níveis declinam com o aumento da idade e com a progressão da DA (DARREH-SHORI et al., 2006; SIMÃO-SILVA, 2014; BONO et al., 2015).

Ademais, a atividade da BChE está correlacionada positivamente com a proteína β amiloide (β A), assim como com os níveis da proteína ApoE (DARREH-SHORI et al., 2006). A interação entre maiores concentrações da proteína ApoE, e o excesso de peptídeos β A interferem na atividade catalítica, não apenas da BChE, mas da AChE, modulando os níveis e duração de ACh no líquido cefalorraquidiano e possivelmente em plasma (DARREH-SHORI et al., 2009a; DARREH-SHORI et al., 2009b; DARREH-SHORI et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil da colina-acetiltransferase (ChAT) no plasma de portadores da doença de Alzheimer (DA) e grupo controle idoso (CI), e verificar a relação entre este perfil e as variantes dos genes *CHAT* e *SLC18A3*, variantes clínicas e a atividade da butirilcolinesterase (BChE), além do estudo de associação entre os polimorfismos dos genes *CHAT* e *SLC18A3* com a DA e CCL.

3.1.1 Objetivos Específicos

- Investigar associação entre os polimorfismos dos genes *CHAT* (*rs3810950*, *rs733722*, *rs3810948*, *rs1880676*) e *SLC18A3* (*rs2269338*) com a DA e CCL;
- Verificar a influência das variantes genéticas dos genes *CHAT* (*rs3810950*, *rs733722*, *rs3810948*, *rs1880676*) e *SLC18A3* (*rs2269338*) na concentração proteica e atividade enzimática da ChAT nos pacientes com DA e CI no plasma;
- Averiguar a relação dos parâmetros clínicos (MEEM, CDR e inibidores colinérgicos) e não clínicos (escolaridade) com o perfil proteico da ChAT no plasma dos indivíduos com DA e CI;
- Verificar se existe correlação entre a atividade da BChE nos níveis de concentração e atividade da proteína ChAT no grupo de pacientes com DA e CI.

4 JUSTIFICATIVA

A disfunção e degeneração colinérgica são uma das principais características da doença de Alzheimer, devido aos déficits de acetilcolina e da colina-acetiltransferase nos neurônios do encéfalo basal, hipocampo e córtex cerebral. Embora não necessariamente seja um evento patologicamente primário, pensa-se que a redução da atividade colinérgica inicie um papel importante na mediação dos déficits cognitivos associado a DA. Por isso, este trabalho avaliou a associação de polimorfismos no gene da colina-acetiltransferase (*CHAT*) e do transportador vesicular da acetilcolina (*SLC18A3*) com a DA e também no CCL, visto que partes destes indivíduos tendem a evoluir para DA.

Desde a descoberta da ChAT, há 70 anos atrás, considerou-se que a síntese da ACh ocorria somente no pericário das células nervosas intraneuronal, contudo o trabalho de Vijayaraghavan et al. (2013) identificou altos níveis de atividade da ChAT em fluídos extracelulares (LCR e plasma) em uma amostra com poucos indivíduos. A avaliação dos níveis de ChAT plasmática em um grupo amostral maior pode auxiliar na compreensão da biodisponibilidade extracelular da ACh, além de contribuir para melhor compreensão do perfil proteico e enzimático da ChAT, avaliando alguns fatores que possam influenciar a atividade e concentração da proteína como variantes genéticas, grau da doença e déficit cognitivo na DA.

Ademais, como a butiricolinesterase participa de forma atuante na regulação das concentrações de ACh em plasma, e que ocorrem alterações nos níveis da BChE perante a DA, supõe-se que possa haver um mecanismo de feedback entre essas enzimas, ChAT-BChE.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 AMOSTRA

As amostras utilizadas no estudo foram provenientes do Ambulatório de Disfunção Cognitiva do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) e do Ambulatório de Desordens da Memória e do Comportamento (ADEMEC), situado no Instituto de Neurologia de Curitiba (INC). No total, foram utilizadas 387 amostras de indivíduos eurodescendentes, sendo constituída de 185 pacientes com doença de Alzheimer (DA), 73 casos de comprometimento cognitivo leve (CCL) e 133 controles idosos (CI). As características da população estão demonstradas na TABELA 1.

TABELA 1. CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES COM DA, CCL E CONTROLE IDOSO.

DA N=185			
	Média	Desvio-Padrão	<i>P</i> ^a
Idade	76,41	± 8,95	<0,01
MEEM*	13,83	± 8,00	<0,01
Escolaridade**	5,00	±4,60	<0,01
Sexo F/M***	1,5/1		
CCL N=73			
	Média	Desvio-Padrão	<i>P</i> ^o
Idade	69,20	± 8,50	0,26
MEEM*	24,65	± 3,00	<0,01
Escolaridade**	5,75	± 4,80	0,11
Sexo F/M***	2,6/1		
CI N= 133			
	Média	Desvio-Padrão	
Idade	71,12	± 7,75	
MEEM*	26,85	± 2,32	
Escolaridade**	7,00	± 4,87	
Sexo F/M***	3,3/1		

Nota: *Média do escore do teste de rastreio, Mini Exame do Estado Mental – MEEM. **A escolaridade está representada por anos de estudo. *** O sexo está representado em forma de razão. ^aValor de *p* entre as amostras de DA e CI. ^oValor de *p* entre as amostras CCL e CI.

As coletas tiveram início em maio de 2011 no HC-UFPR e, em agosto de 2012 no ADEMEC-INC, tendo término em dezembro de 2014. O diagnóstico dos pacientes foi realizado por médicos especialistas, seguindo os critérios padrões do Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (DSM-IV) da Associação Americana de Psiquiatria (2002) e do NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's disease and Related Disorders Association*) com adaptações das recomendações do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia (FROTA et al., 2011; ALBERT et al., 2011).

Em relação ao tratamento dos pacientes com DA, 119 indivíduos faziam uso de IChEs, dentre eles donepezil (n= 54), rivastigmina (n= 35) e galantamina (n=18). Alguns pacientes (n=12) faziam uso de IChE associado com memantina e outros 32 casos utilizavam a memantina isolada. Para 28 pacientes não havia informação de tratamento e apenas 6 indivíduos não haviam começado a medicação.

Para a análise do perfil enzimático da ChAT e BChE, foram considerados 107 pacientes com DA, sendo que destes apenas 6 não tínhamos a informação e 3 indivíduos não estavam em tratamento colinérgico ou de memantina. O grupo controle foi composto por 92 idosos cognitivamente saudáveis.

O grupo CI, originários de Curitiba e região, foram avaliados por meio de breve anamnese e pelos testes de rastreio, o Mini-Exame do Estado Mental (MEEM), GDS -15 (Escala de Depressão Geriátrica de Yesavage) e PFEFFER. Os critérios de exclusão utilizados foram portadores de doenças infectocontagiosas (hepatite, malária, doença de Chagas e HIV), alcoólatras, histórico prévio de Acidente Vascular Cerebral ou lapso de perda de memória, atividades de vida diárias comprometidas pela cognição, queixas persistentes de falta de memória, MEEM abaixo do esperado e sintomas de depressão.

Os pacientes e seus acompanhantes, assim como o grupo controle, foram informados sobre a pesquisa e, caso aceitassem participar assinavam o Termo de Consentimento Livre-Esclarecido (TCLE; ANEXO 5). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Paraná, sob o número 1192.117.11.08 (ANEXO 6).

5.1.1 Coleta de material biológico e Extração de DNA

O material coletado, aproximadamente 7mL de sangue periférico por punção intravenosa, foi armazenado em tubos com EDTA (ácido etilenodiaminotertacético) e identificado por códigos específicos. O sangue foi processado (separação do plasma dos elementos figurados por centrifugação 2500 RPM/20 minutos), sendo o plasma e as células sanguíneas estocadas separadamente.

O sangue total foi utilizado na extração de DNA pela técnica de “*salting out*”, no qual ressuspende-se o sangue processado em 10 mL de TKM1 (Tris-HCl 0,01 M pH 7,6; KCl 0,01 M; MgCl₂ 0,01 M; EDTA 0,002M) e 125 µL de IGEPAL. O material é centrifugado a 2500 rpm por 20 minutos, sendo o sobrenadante descartado e repete-se o processo de lavagem com TKM 1 por três vezes.

Segue-se ao último descarte, a adição de 800 µL de TKM2 (Tris-HCl 0,01 M pH7,6; KCl 0,01 M; MgCl₂ 0,01 M; EDTA 0,002 M; NaCl 0,4 M) agitando-se bem. Adiciona-se 50 µL de SDS 10%, invertendo o tubo. O material é incubado em banho-maria a 55°C “*over night*”. Retira-se do banho-maria e adiciona-se 300 µL de NaCl saturado (6 M) e procede com a centrifugação da amostra por 20 minutos, a 12000rpm. O sobrenadante é transferido para um tubo de ensaio e adicionam-se dois volumes de etanol 100% gelado e invertem-se várias vezes até precipitação da molécula de DNA. O DNA é transferido para um tubo de 1,5 mL e ressuspendido em 200 µL de tampão TE (Tris HCl pH8,0 0,01 M e EDTA pH 8,0 0,001 M). A finalização do processo ocorre pela imersão em banho-maria a 55°C por dois dias e congela-se a amostra do DNA obtido.

Após a extração de DNA as amostras foram quantificadas no NanoDrop® 1000, onde foram avaliadas a concentração e a pureza do DNA obtido.

Depois de averiguada as concentrações, as amostras foram diluídas para concentração de 20 ng/µL, a fim de atender as especificações do protocolo de genotipagem.

5.2 GENOTIPAGEM

A genotipagem das variantes do gene *CHAT* (*rs3810950* - alelos A/G, *rs733722* - alelos C/T, *rs3810948* – alelos C/G, *rs1880676* – alelos A/G), *SLC18A3* (*rs2269338* – alelos G/T) foram obtidos por ensaios *TaqMan SNP Genotyping Assays* (*Applied Biosystems*) e termociclador de PCR em tempo real.

A técnica detecta variantes de nucleotídeo único e consiste na amplificação da região entre dois *primers* flanqueadores da região com o *SNP* de interesse e, duas sondas específicas para cada alelo marcadas com fluorescência diferentes para cada uma delas. Caso apenas uma das fluorescências seja liberada, a amostra será dada como homozigota para aquela sonda/alelo específico. Porém, se os dois fluoróforos sejam emitidos a amostra será heterozigota.

Para tanto, as condições utilizadas na PCR para cada *SNP* específico foram compostas de 5µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix*, 0,5 µL da alíquota do Kit de Genotipagem *TaqMan SNP* específico, 2,5 µL de água ultrapura e 2 µL de DNA 20 ng/µL, tendo um volume final de 10µL por reação.

A programação dos ciclos de corrida compreenderam quatro passos: 1º passo de 60 segundos a 60°C; 2º passo de 10 minutos a 95°C; 3º passo repetido 50 vezes de 15 segundos a 95°C intercalados por 90 segundos a 60°C; 4º passo de 30 segundos a 60°C. No primeiro passo ocorre a pré-leitura da fluorescência basal da placa seguida da desnaturação da dupla fita de DNA e, posterior anelamento das sondas e primers, a fim de seguir a amplificação da amostra. Por último, ocorre a pós-leitura, a qual avalia os dados da pré-leitura juntamente com as leituras durante e após a amplificação, estabelecendo a curva padrão para cada amostra e gerando seu respectivo genótipo.

5.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA E MENSURAÇÃO PROTEICA

A mensuração proteica e da atividade enzimática da ChAT, no plasma, dos pacientes com DA (n=107) e controle idoso (n=92) foi realizada previamente por ELISA-Sanduiche (*Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) por SIMÃO-SILVA (2014), de acordo com o protocolo de Vijayaraghavan et al. 2013 (ANEXO 7).

A atividade da butirilcolinesterase (BChE) também foi realizada por SIMÃO-SILVA (2014) segundo o protocolo estabelecido por Darreh-Shori et al. (2006) (ANEXO 8).

5.4 ANÁLISES DE DADOS

Os dados de genotipagem, informações dos pacientes e demais variáveis (escore do MEEM, CDR, GDS, PFEFFER) foram armazenadas e organizadas à priori em planilha eletrônica.

As frequências alélicas, genotípicas e o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg foram obtidos pelo pacote *Genetics* do programa R (*R Development Core Team*, 2008). O Qui-quadrado para tabelas 2x2 e 3x3 foi calculado pelo programa *Clump* (SHAM e CURTIS, 1995) com o intuito de averiguar se havia diferença entre as frequências alélicas e genotípicas dos grupos analisados (DA x CI, DA x CCL, CCI x CI).

Além disso, aplicamos o teste de Shapiro Wilk com correção de Lilliefors nas variáveis atividade e concentração proteica, MEEM, anos de estudo (escolaridade) e idade a fim de verificar o padrão de distribuição. Após análise das distribuições, foram realizadas as comparações de médias por teste t para as amostras com distribuição normal, e por Mann Whitney, para as amostras com distribuição não normal. Ambos os testes foram realizados pelo pacote *Nortest* do programa R.

Para mais, foram feitas análises de regressão múltipla e correlação de *Spearman* pelo programa *Statistica*, versão 10 para Windows. O intervalo de confiança para todas as análises estatísticas realizadas foi de 95% ($p = 0,05$).

6 RESULTADOS

6.1 ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES *CHAT* E *SLC18A3* COM A DA E CCL

6.1.1 Frequências alélicas e genotípicas

As frequências alélicas e genotípicas das variantes do gene *CHAT* (*rs3810950* - alelos A/G, *rs733722* - alelos C/T, *rs3810948* - alelos C/G, *rs1880676* - alelos A/G) e gene *SLC18A3* (*rs2269338* - alelos G/T) encontradas nos grupos da DA, CCL e CI estão representadas nos gráficos (FIGURAS 10, 11, 12, 13 e 14).

A distribuição dos genótipos encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os SNPs *rs733722* (DA, $p=0,434$; CCL, $p=0,475$ e CI, $p=1$), *rs1880676* (DA, $p=1$; CCL, $p=0,718$ e CI, $p=1$) e *rs3810950* (DA, $p=0,678$; CCL, $p=1$ e CI, $p=1$). Para os polimorfismos *rs2269338* e *rs3810948* apenas o grupo de DA não estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p = 0.0335$; $p = 0.0262$, respectivamente).

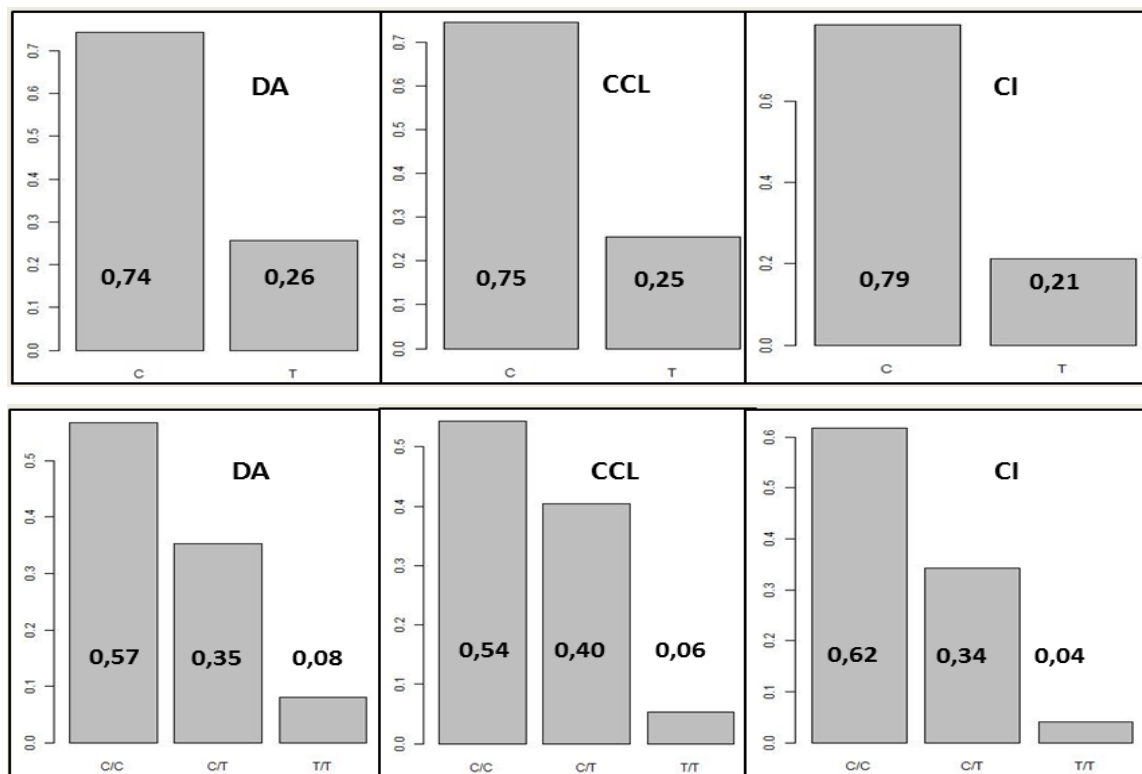


FIGURA 10: FREQUÊNCIAS ALÉLICAS (GRÁFICO SUPERIOR) E GENOTÍPICAS (GRÁFICO INFERIOR) DO *RS733722* DO GENE *CHAT* NOS GRUPOS DA DA, CCL E CI.

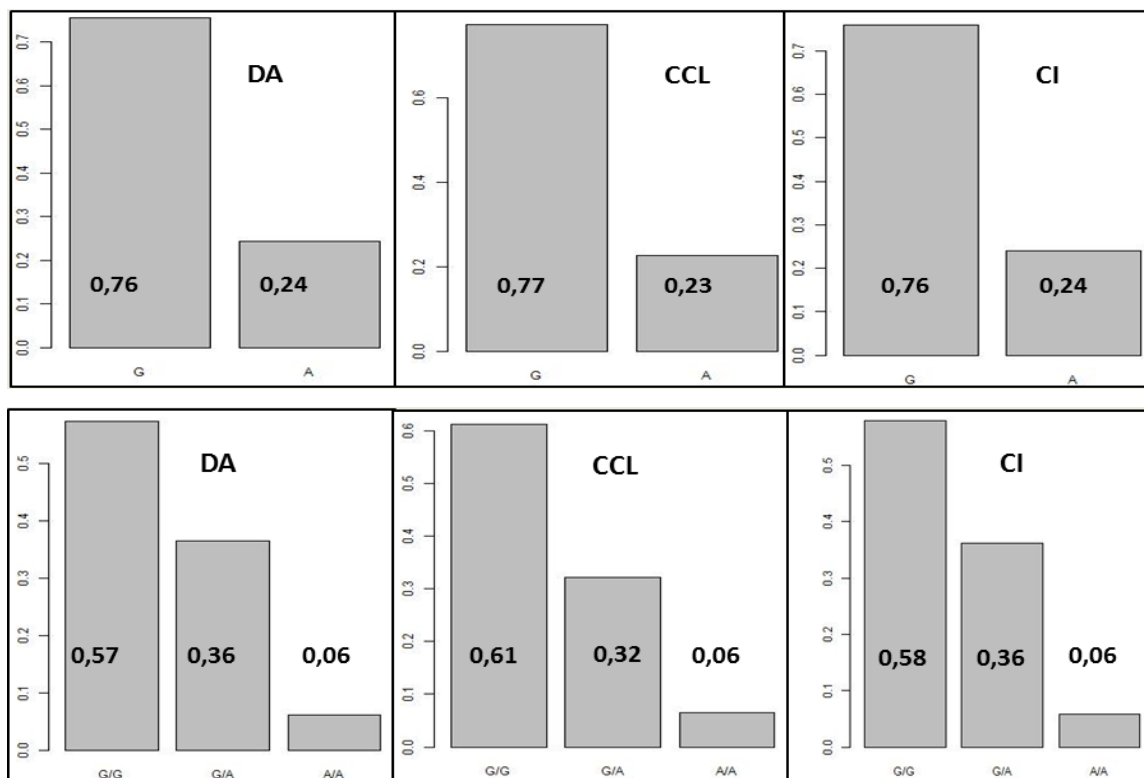


FIGURA 11: FREQUÊNCIAS ALÉLICAS (GRÁFICO SUPERIOR) E GENOTÍPICAS (GRÁFICO INFERIOR) DO *RS1880676* NOS GRUPOS DA DA, CCL E CI.

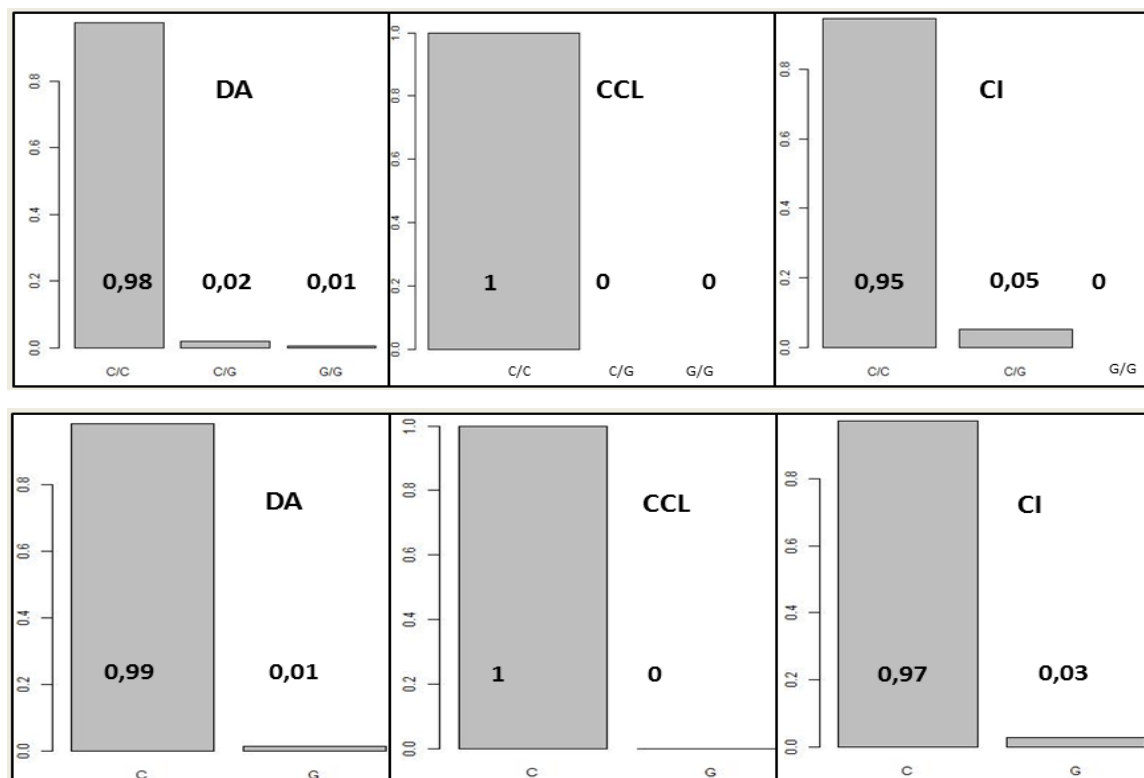


FIGURA 12: FREQUÊNCIAS ALÉLICAS (GRÁFICO SUPERIOR) E GENOTÍPICAS (GRÁFICO INFERIOR) DO *RS3810948* NOS GRUPOS DA DA, CCL E CI.

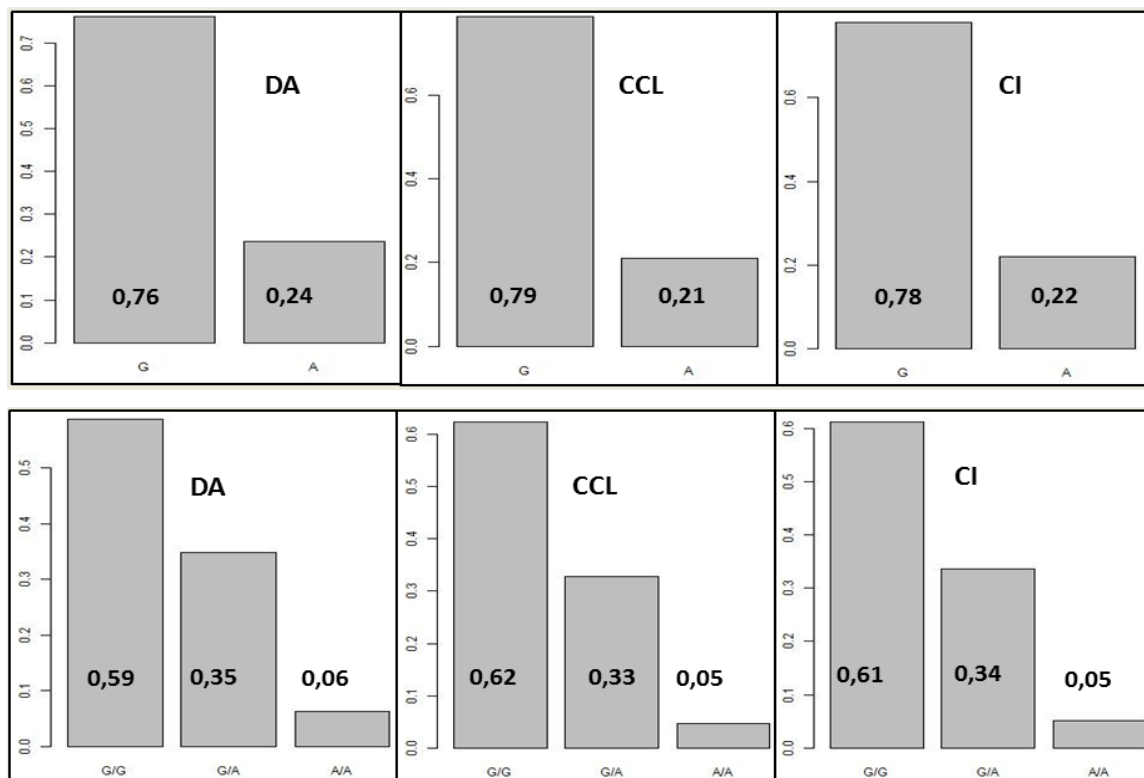


FIGURA 13: FREQUÊNCIAS ALÉLICAS (GRÁFICO SUPERIOR) E GENOTÍPICAS (GRÁFICO INFERIOR) DO *RS3810950* NOS GRUPOS DA DA, CCL E CI.

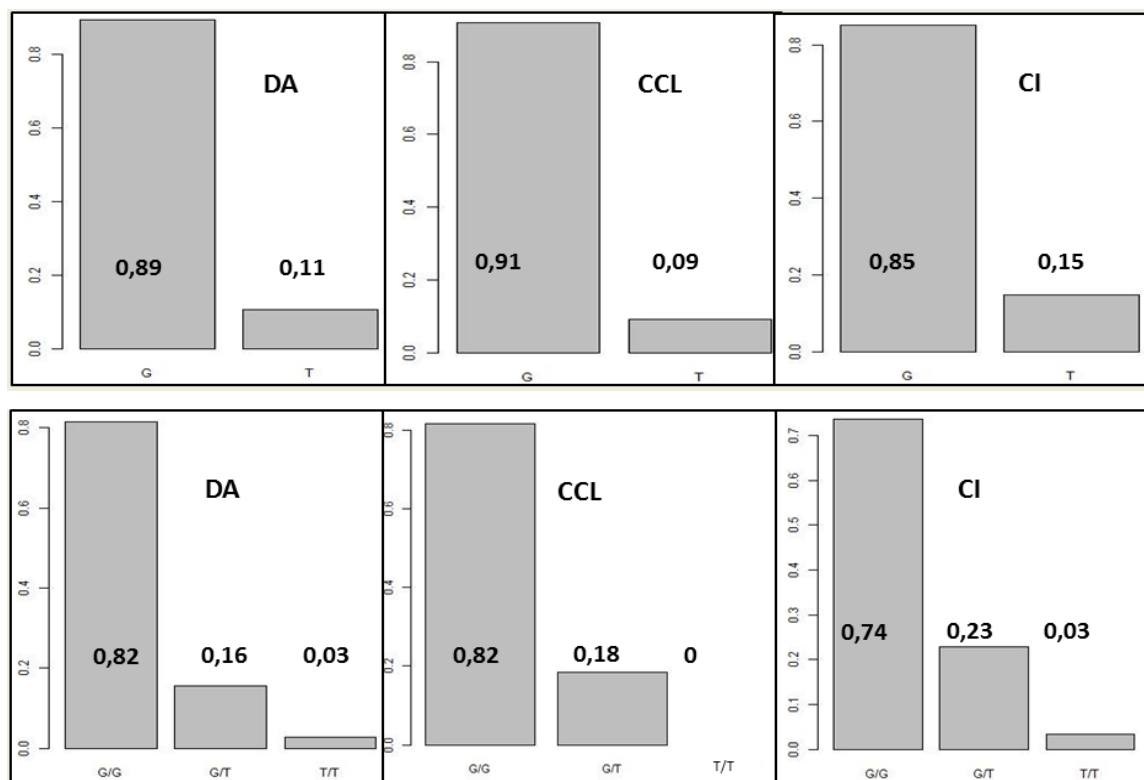


FIGURA 14: FREQUÊNCIAS ALÉLICAS (GRÁFICO SUPERIOR) E GENOTÍPICAS (GRÁFICO INFERIOR) DO *RS2269338*, GENE *VCHAT*, NOS GRUPOS DA DA, CCL E CI.

6.1.2 Comparação entre as frequências alélicas e genóticas

Nenhum alelo ou genótipo dos polimorfismos estudados apresentou frequências diferenciais significativas entre os grupos DA-CI, CCL-CI e DA-CCL (TABELA 2).

TABELA 2. TESTE DO QUI-QUADRADO COMPARANDO AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS ENTRE OS GRUPOS DE DA, CCL E CI.

Gene CHAT - rs733722						
Grupos:		χ^2	p		χ^2	p
DA x CI	Alelo	1,57	0,21	Genótipo	1,84	0,39
CCL x CI		0,83	0,36		0,86	0,65
DA x CCL		0,001	0,97		0,49	0,78

Gene CHAT - rs1880676						
Grupos:		χ^2	p		χ^2	p
DA x CI	Alelo	0,01	0,92	Genótipo	0,01	0,99
CCL x CI		0,09	0,76		0,27	0,87
DA x CCL		0,15	0,69		0,36	0,83

Gene CHAT - rs3810948						
Grupos:		χ^2	p		χ^2	p
DA x CI	Alelo	0,95	0,32	Genótipo	2,69	0,26
CCL x CI		3,05	0,08		3,11	0,21
DA x CCL		1,7	0,19		1,37	0,50

Gene CHAT - rs3810950						
Grupos:		χ^2	p		χ^2	p
DA x CI	Alelo	0,28	0,59	Genótipo	0,2	0,90
CCL x CI		0,03	0,86		0,02	0,99
DA x CCL		0,36	0,54		0,26	0,87

Gene SLC18A3 - rs2269338						
Grupos:		χ^2	p		χ^2	p
DA x CI	Alelo	2,31	0,12	Genótipo	2,6	0,27
CCL x CI		2,23	0,13		2,01	0,36
DA x CCL		0,2	0,65		1,71	0,42

6.2 ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO DA ChAT E DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BChE

Para a investigação do perfil proteico da ChAT e da atividade enzimática da BChE utilizamos apenas parte dos indivíduos com a DA (n=107) e CI (n=92). Os valores das médias dos grupos, assim como o padrão de distribuição e a comparação entre as medianas são mostradas na TABELA 3.

TABELA 3. PERFIL PROTEICO E DE ATIVIDADE DA COLINA-ACETILTRANSFERASE (CHAT) EM PACIENTES COM DA E CI E TESTE DE COMPARAÇÃO DE MEDIANAS.

	DA n=107			CI n=92			DA x CI	
	Médias ± D.P	Medianas	p*	Médias ± D.P	Medianas	p*	p**	
ChAT_prot	7,92 ± 5,34	7,22	0.06	7,1 ± 4,39	33,58	<0,01	0,34	
ChAT_ativ	35,71 ± 21	6,01	0.08	33,27 ± 26,54	29,01	<0,01	0,1	

Nota: ChAT_prot refere-se a concentração proteica, em nmol/mL, e ChAT_ativ à atividade enzimática, em nmol/min/mL. O valor p* é referente à hipótese de distribuição normal dos níveis de atividade e concentração da proteína – teste de Shapiro Wilk com correção de Lilliefors. O valor p** refere-se ao Teste de Mann Whitney para comparação das medianas dos níveis de atividade e concentração de proteína entre DA-CI.

6.2.1 Análise da concentração proteica e atividade enzimática da ChAT de acordo com as variantes da *CHAT* e *SLC18A3*

Para analisarmos se haviam diferenças nas médias e medianas do perfil proteico da ChAT, os grupos de DA e CI foram agrupados por genótipo dos polimorfismos (*CHAT* - *rs3810950*, *rs733722*, *rs1880676* e *SLC18A3* - *rs2269338*) (TABELA 4), seguindo a exploração de dados realizadas pela observação dos “*boxplots*” gerados (APÊNDICE 1). A comparação entre as medianas dos grupos (DAxCI) é mostrada na TABELA 5.

Devido à diferença entre as médias do grupo de DA e mediana no CI do SNP *rs2269338* (*SLC18A3*), também verificamos o padrão da atividade e concentração da ChAT estratificado por alelos para este polimorfismo (TABELA 6).

6.3.2 Análises de Regressão Múltipla

As análises de regressão múltipla foram feitas de acordo com o modelo “*forward stepwise*”, o qual avalia todas as possibilidades de combinações na equação da regressão da variável dependente com as variáveis independentes. Para tal, colocamos como variável dependente a concentração proteica, assim como os níveis de atividade da ChAT. As variantes genéticas, parâmetros clínicos, como o desempenho cognitivo (MEEM), progressão da doença (CDR) e IChEs, escolaridade e atividade da BChE foram utilizadas como variáveis independentes.

Os polimorfismos *rs2269338* ($p= 0,016$; $\beta= -0,23$) e *rs733722* ($p= 0,036$; $\beta= -0,20$), MEEM ($p= 0,017$; $\beta= 0,63$), CDR ($p= 0,056$; $\beta= 0,52$) e o uso de inibidores colinérgicos ($p= 0,03$; $\beta= 0,24$) atuaram como variável independente em relação à concentração proteica nos indivíduos com DA. A atividade enzimática da ChAT mostrou estar relacionada com a atividade da BChE ($p= 0,04$, $\beta= 0,23$).

No grupo CI foi observado que as variantes *rs2269338* ($p= 0,05$; $\beta= -0,21$), a escolaridade ($p= 0,04$; $\beta= 0,41$) e a atividade da butirilcolinesterase ($p=0,00$; $\beta=0,46$) estão interferindo na concentração de proteína da ChAT. Ademais, o MEEM ($p= 0,004$, $\beta= -0,55$) e também atividade da BChE ($p= 0,03$, $\beta= 0,24$) mostraram estar influenciado na atividade da ChAT.

TABELA 4. COMPARAÇÕES DAS MÉDIAS, NO GRUPO DE DA E MEDIANAS NO CI, DA CONCENTRAÇÃO E ATIVIDADE DA CHAT, AGRUPADO POR PORTADOR E NÃO PORTADOR DE ALELO, PARA CADA *SNP* ESPECÍFICO DO GENE *CHAT* (*RS3810950*, *RS1880676*, *RS733722*) E DO GENE *SLC18A3* (*RS2269338*).

<i>rs3810950</i>	DA			CI		
	Portador G (AG+GG)*	Não Portador (AA)*	p	Portador G (AG+GG)**	Não Portador (AA)**	p
	N=99	N= 5		N= 81	N= 6	
ChAT_prot	7,63 ± 5,20	9,43 ± 3,58	0,44	13,64	4,34	0,40
ChAT_ativ	35,52 ± 21,34	39,75 ± 13,37	0,66	28,83	24,67	0,52
<i>rs1880676</i>	DA			CI		
	Portador G (AG+GG)*	Não Portador (AA)*	p	Portador G (AG+GG)**	Não Portador (AA)**	p
	N= 98	N= 5		N= 78	N= 7	
ChAT_prot	7,62 ± 5,22	9,43 ± 3,58	0,44	6,29	4,06	0,23
ChAT_ativ	35,63 ± 21,43	39,75 ± 13,37	0,67	28,32	29,51	0,80
<i>rs733722</i>	DA			CI		
	Portador G (GT+GG)*	Não portador (TT)*	p	Portador G (GT+GG)**	Não portador (TT)**	p
	N= 93	N= 9		N= 84	N= 3	
ChAT_prot	7,87 ± 5,17	6,31 ± 4,73	0,38	6,01	7,60	0,97
ChAT_ativ	35,88 ± 20,96	37,41 ± 23,49	0,83	28,92	31,91	0,35
<i>rs2269338</i>	DA			CI		
	Portador C (CT+CC)*	Não Portador (TT)*	p	Portador C (CT+CC)**	Não Portador (TT)**	p
	N= 102	N= 3		N= 86	N= 2	
ChAT_prot	7,48 ± 4,88	15,08 ± 8,66	0,01	5,92	13,71	0,04
ChAT_ativ	35,63 ± 21,26	48,64 ± 8	0,29	28,82	27,70	0,79

Nota: Para a comparação das médias*, dados paramétricos, utilizamos o teste t (médias e desvios mostrados) e para dados não paramétricos** o teste de Mann Whitney** (medianas e valor de p). A concentração proteica e atividade enzimática foram medidas em nmol/mL. Não foram consideradas as análises estratificadas por genótipo para o *SNP rs3810948* devido este apresentar quase que totalidade das amostras apenas um padrão genotípico.

TABELA 5. VALOR DE P REFERENTE ÀS COMPARAÇÕES ENTRE AS MEDIANAS DE DA E CI, DA CONCENTRAÇÃO E ATIVIDADE DA CHAT, AGRUPADO POR PORTADOR OU NÃO DE ALELO, PARA CADA *SNP* ESPECÍFICO (*RS3810950*, *RS2269338*, *RS1880676* E *RS733722*).

<i>rs3810950</i>	DA x CI			DA x CI		
	Não Portador (AA)	Não Portador (AA)	Valor de p	Portador G (AG+GG)	Portador G (AG+GG)	Valor de p
	N= 9	N= 6		N=99	N=81	
ChAT_prot	10,24	4,34	0,20	7,22	13,64	0,86
ChAT_ATIV	45,16	24,67	0,06	33,58	28,83	0,13

<i>rs1880676</i>	DA x CI			DA x CI		
	Não Portador (AA)	Não Portador (AA)	Valor de p	Portador G (AG+GG)	Portador G (AG+GG)	Valor de p
	N=5	N=7		N=98	N=78	
ChAT_prot	10,24	4,07	0,12	7,22	6,29	0,79
ChAT_ATIV	45,16	29,51	0,12	33,58	28,32	0,12

<i>rs2269338</i>	DA x CI			DA x CI		
	Não portador (TT)	Não portador (TT)	Valor de p	Portador G (GT+GG)	Portador G (GT+GG)	Valor de p
	N=3	N=2		N=102	N=86	
ChAT_prot	15,47	13,71	0,99	7,22	6,01	0,39
ChAT_ATIV	45,33	27,7	0,56	33,58	28,92	0,11

<i>rs733722</i>	DA x CI			DA x CI		
	Não Portador (TT)	Não Portador (TT)	Valor de p	Portador C (CT+CC)	Portador C (CT+CC)	Valor de p
	N=9	N=3		N=93	N=84	
ChAT_prot	6,81	7,6	0,78	7,22	5,92	0,42
ChAT_ATIV	30,22	31,91	0,51	33,58	28,82	0,09

Nota: Comparação dos não portadores de alelo entre os pacientes com DA e controle, assim como os portadores por teste de Mann Whitney.

TABELA 6A. COMPARAÇÕES ENTRE AS MÉDIAS DA CONCENTRAÇÃO E ATIVIDADE DA CHAT ESTRATIFICADO POR ALELO PARA O RS2269338 NA DA.

RS2269338 [T] - DA						
	Média T-	Média T+	p	Desvio Padrão T-	Desvio Padrão T+	p
ChAT_prot	7,27	9,43	0,08	5,15	4,70	0,66
ChAT_ATIV	35,78	36,91	0,83	22,76	12,77	0,005
RS2269338[G] - DA						
	Média G+	Média G-	p	Desvio Padrão G+	Desvio Padrão G-	p
ChAT_prot	7,49	15,09	0,01	4,88	8,67	0,09
ChAT_ATIV	35,64	48,65	0,29	21,26	8,00	0,26

Nota: O sinal + e - indicam a presença e ausência do alelo, respectivamente.

TABELA 6B. COMPARAÇÕES ENTRE AS MEDIANAS DA CONCENTRAÇÃO E ATIVIDADE DA CHAT ESTRATIFICADO POR ALELO PARA O RS2269338, NO CONTROLE IDOSO (CI).

RS2269338 [T] - CI						
	Média T-	Média T+	p	Desvio Padrão T-	Desvio Padrão T+	p
ChAT_prot	7,18	6,17	0,34	4,11	3,65	0,34
ChAT_ATIV	35,85	26,33	0,13	29,35	18,87	0,02
RS2269338[G] - DA						
	Média G-	Média G+	p	Desvio Padrão G-	Desvio Padrão G+	p
ChAT_prot	13,71	6,74	0,04	4,38	3,87	0,02
ChAT_ATIV	27,69	33,39	0,79	30,89	27,23	0,79

Nota: O sinal + e - indicam a presença e ausência do alelo, respectivamente.

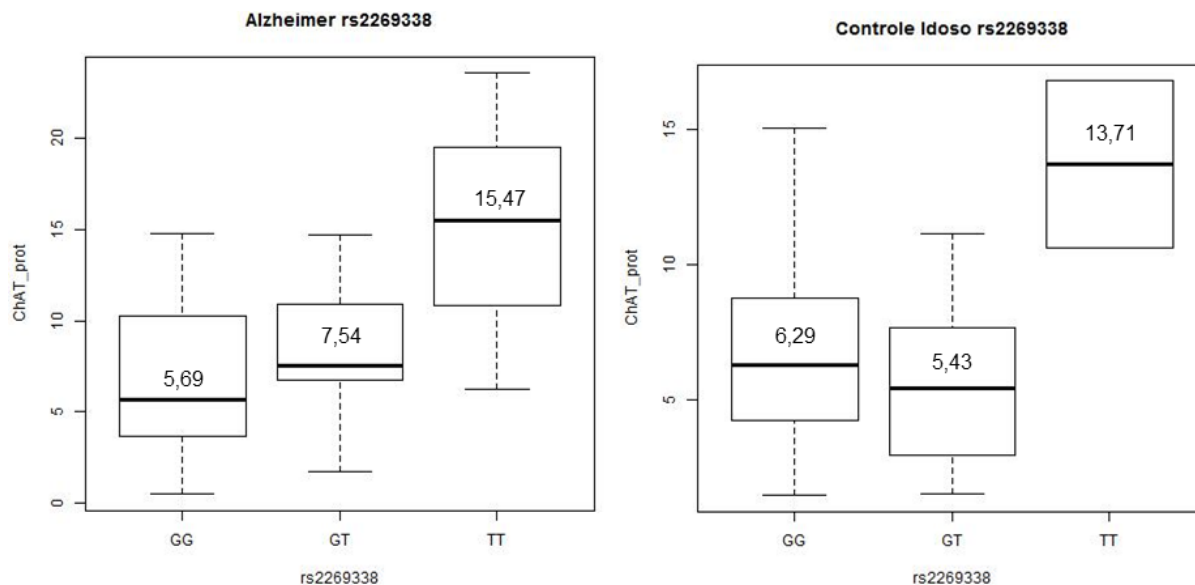


FIGURA 15: PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA DA CHAT EM PACIENTES COM DA E NO GRUPO CONTROLE DE ACORDO COM O POLIMORFISMO *RS2269338* DO GENE *SLC18A3*.

6.3.3 Análises de Correlação

Considerando aos resultados das regressões foi realizada correlação de *Spearman*, nos modelos “*detailed report*” e “*square matrix*”, a fim de verificar o comportamento da atividade da BChE, MEEM, CDR e IChEs no padrão de atividade e concentração proteica da ChAT.

As análises mostraram correlação positiva da atividade da BChE somente com a atividade da ChAT nos pacientes com DA ($p= 0,27$, $p<0,01$). Além disso, o CDR mostrou uma correlação negativa com a atividade da ChAT ($p= -0,20$, $p= 0,004$) e com o MEEM ($p= -0,70$, $p<0,01$). Para as demais variáveis não foi mostrado nenhuma correlação.

No CI, a correlação foi positiva entre a concentração da ChAT e escolaridade ($\rho=0,24$, $p=0,01$), assim como escolaridade com MEEM ($\rho=0,46$, $p<0,01$).

6 DISCUSSÃO

7.1 CARACTERÍSTICA DA POPULAÇÃO E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO

Nossa amostragem de pacientes com DA está de acordo com a prevalência maior em mulheres, assim como a baixa escolaridade (HERRERA et al. 2002, BOTTINO et al. 2008, GODINHO et al., 2010) e a média do MEEM correspondente a outros trabalhos brasileiros (NITRINI et al. 1994; BONNO et al. 2015), corroborando com o padrão apresentado pelos indivíduos do país.

Os estudos de associação entre as variantes do locus colinérgico, genes *CHAT* e *SLC18A3*, *rs3810950*, *rs733722*, *rs3810948*, *rs1880676* e *rs2269338* são controversos quanto ao risco para a doença de Alzheimer.

Mubumbila et al (2002) foram os primeiros a investigar a influência de polimorfismos quanto a DA, mostrando resultados positivos de associação entre DA e o *SNP rs3810950* (OD= 3,7, p= 0,0005) em uma população germânica. A partir disso, diversos trabalhos falharam em replicar esses dados (HAROLD et al., 2003; SCHAWARZ et al., 2003; XU et al., 2013) em populações caucasianas e coreanas, corroborando com os resultados de não associação apresentados neste trabalho.

Os polimorfismos *rs2269338* e *rs3810948*, nos pacientes com DA, apresentaram estar fora do Equilíbrio de Weinberg. Excluímos a possibilidade de erros de genotipagem e de processamento de dados, assim como na estruturação da nossa população, pois somente esses dois SNPs não se adequaram ao EHW dentre as variantes analisadas neste trabalho, assim como outros *SNPs* avaliados pelo nosso grupo de pesquisa (SIMÃO-SILVA et al., 2013; SIMÃO-SILVA, 2014; BONO et al., 2015).

Como o desequilíbrio apresentou-se somente nos indivíduos com DA, as variantes *rs2269338* e *rs3810948* poderiam indicar evidências de associação (WIGGINTON et al., 2005). Contudo, não verificamos associação entre DA e as variantes em desequilíbrio, mas o *rs2269338* (transversão G→T) mostrou influenciar a concentração da enzima ChAT com padrões diferentes de acordo com a presença e ausência do alelo T.

Devido a controvérsias, alguns trabalhos expandiram a análise para mais variantes do gene *CHAT* (HAROLD et al., 2003; COOK et al., 2005; ORTZUK et al.

2006; PICCARDI et al., 2007; GRÜBLATTI et al., 2011; XU et al. 2013), assim como para o gene *SLC18A3* (HAROLD et al., 2003), analisando mais de 15 variantes possivelmente envolvidas no risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer. Contudo, poucos acharam resultados positivos (KIM et al., 2004; GRÜBLATTI et al., 2011; LEE et al., 2012) e outros apontaram estar no intervalo de tendência (ORTZUK et al. 2006; JO et al., 2006; TANG et al., 2008; SCACCHI et al., 2009; XU et al., 2013).

Em relação ao CCL, este é o primeiro trabalho a avaliar associação das variantes genéticas do gene *CHAT* e *SLC18A3*. Na literatura é possível encontrar um único relato sobre associação do *rs3810950*, presente no gene *CHAT*, com o desempenho cognitivo em indivíduos não dementes (MENGEL-FROM et al. 2011), mostrou correlação positiva entre o alelo A da variante com o declínio cognitivo. Contudo, no presente trabalho não verificamos a influência do *rs3810950* com o CCL, assim como os demais polimorfismos. O CCL não se caracteriza como demência, mas apresenta um déficit cognitivo representativo, além do normal quando comparado com o envelhecimento normal (PETERSEN et al., 1999).

Apesar de ambos os genes produzirem proteínas importantes para o correto funcionamento das vias colinérgicas (ODA, 1999) e, portanto, apresentarem características colinérgicas peculiares em DA (WILCOCK et al., 1982; BIERER et al., 1995; BEACH et al., 2000), não observamos diferenças das variações gênicas por si só entre DA, CCL e controle. Ambas as patologias seguem o modelo de herança multifatorial, ou seja, diversos fatores estão contribuindo para o surgimento destes fenótipos. Além disso, alterações no produto gênico final dependerão não apenas de alterações pontuais na sequência de DNA, mas da localização na qual ocorreram e de diversos fatores que influenciam na expressão gênica.

7.2 PERFIL PROTEICO E ENZIMÁTICO DA ChAT

Neste trabalho, mensuramos os níveis de concentração proteica e atividade de ChAT em plasma de pacientes com DA e CI. Vijayaraghavan et al. (2013) mostraram pela primeira vez evidências plausíveis de ChAT em fluídos extracelulares em líquido cefalorraquidiano e plasma, por meio de ensaios

imunohistoquímicos e comparações com amostras de tecido cerebral. Além de que ocorria a produção de ChAT extracelular, via cultura de células tronco embrionárias, linfócitos e astrócito reformulando conceitos literários de que a ChAT atuaria apenas como uma enzima citosólica, localizada principalmente nos terminais colinérgicos (ODA, 1999; GOVINDASAMY et al., 2004).

Similarmente, o presente trabalho reforça a descoberta da colina-acetiltransferase em uma amostra maior de pacientes com DA (n=107) e CI (n=92), no plasma, visto que no trabalho de Vijayaraghavan et al. (2013) foram analisadas nove diferentes “pools” em DA e CI.

Na DA há redução nos níveis de colina-acetiltransferase (ChAT) citosólica cerebral e, conseqüentemente, menor produção de acetilcolina (ACh), gerando uma disfunção colinérgica cortical (WHITEHOUSE et al., 1982; BOISSIERE et al., 1997; MUFSON et al., 2003; KAR et al., 2004; PALASKI e KALMAN, 2008). Contudo, ao avaliarmos os perfis de concentração e atividade de enzima, em nível plasmático, não observamos diferenças significativas nas concentrações e atividade da ChAT entre DA e CI. Isto pode estar relacionado com a manutenção do equilíbrio nos níveis de acetilcolina (ACh) periférica, mesmo na presença das enzimas degradadoras de ACh, a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE) (VIJAYARAGHAVAN et al. 2013).

7.2.1 Influência das variantes genéticas

Ao analisarmos o comportamento proteico e de atividade da ChAT agrupado por genótipo portador e não portador, verificamos a diferença nas medianas da concentração proteica na doença de Alzheimer e no grupo controle, na presença da variante *rs2269338* (transversão G/T) do gene *SLC18A3*, assim como na análise de regressão.

Conforme visto na figura 16, nota-se um padrão diferente entre os genótipos dos pacientes com DA, em que os homozigotos GG apresentam menor nível de proteína, enquanto os homozigotos TT apresentam uma maior concentração. A influência da presença do alelo T no aumento da concentração proteica é evidente e também corroborada com a análise alélica, sendo possível que este atue de forma

recessiva na concentração proteica. No CI averiguamos um padrão semelhante, onde os homozigotos para o alelo T possuem níveis maiores de concentração proteica em relação aos homozigotos GG. Essa semelhança no padrão entre DA e controle, condiz com a não diferença entre as medianas dos grupos.

Outro polimorfismo que mostrou influenciar a concentração proteica é *SNP rs733722* (transição C/T), presente na região promotora do gene, de acordo com a análise de regressão nos pacientes com DA. Harold et al. (2006) mostraram a influência da variante *rs733722* no declínio cognitivo dos pacientes com DA em resposta aos IChE, no qual os indivíduos portadores do alelo apresentaram um menor declínio anual quando comparado com os homozigotos CC. Em nosso trabalho, a variação entre os níveis de concentração proteica pode estar sendo influenciado pelo próprio polimorfismo, assim como pela ação dos anticolinesterásicos.

Além disso, sabe-se que alterações dentro de sequencias promotoras e intergênicas podem alterar o padrão de expressão do gene, seja atenuando, reprimindo ou estimulando a produção de mRNA para um produto gênico final.

Aliás, ocorrem interações importantes nestes locais entre a fita de DNA e proteínas, assim como ligação da DNA polimerase, fatores transcricionais e interação proteína-DNA específicas que controlam os níveis de expressão do gene. Contudo, essas mudanças nem sempre acarretam uma mudança pontual fenotípica, mas podem estar contribuindo na determinação de uma característica adicional.

Este é o primeiro trabalho a verificar a influência de variantes genéticas nos níveis de concentração e atividade proteica da *CHAT* no plasma. Supõe-se que as variantes *rs2269338* - presente no primeiro íntron da *CHAT*, porém dentro do primeiro éxon do *SLC18A3*, *rs3810950* - no éxon 1 e *rs733722* na região promotora, possam estar contribuindo parcialmente nos perfis fenotípicos de atividade e concentração proteica dos pacientes e controles.

7.2.2 Influência dos parâmetros clínicos

O princípio do tratamento com inibidores colinérgicos (IChE) é o aumento da disponibilidade da acetilcolina (ACh) na fenda colinérgica, pela inibição das

colinesterases AChE (donepezil, galantamina e rivastigmina) e BChE (rivastigmina) (CUMMINGS, 2004). Na análise de regressão vimos que os IChE estão influenciando nos níveis de concentração da ChAT. Isso provavelmente ocorra pelo mecanismo de feedback entre a biodisponibilidade de ACh e dos inibidores colinérgicos; na presença dos inibidores, possivelmente ocorre um aumento da disponibilidade de ACh desencadeando uma demanda menor de síntese da enzima colina acetiltransferase, visto que a atividade da ChAT não foi influenciado pelos inibidores.

Na DA, verificamos que os escores do MEEM e do CDR atuaram como variáveis independentes na concentração proteica da ChAT, além de estarem correlacionados negativamente um com o outro. Esses dados vão de encontro com o que é visto na prática clínica, pois pontuações menores no MEEM estão geralmente associadas à demência moderada e grave (CDR2 e CDR3), ou seja, diminuição da função colinérgica com menor desempenho cognitivo (SHINOTAH et al., 2000). Além disso, a diminuição da atividade de ChAT está correlacionado com a piora cognitiva (BASKIN et al, 1999; DEKOSKY et al., 2002).

O CDR também foi correlacionado negativamente com a atividade da ChAT nos indivíduos com DA, uma vez que em estágios mais avançados da doença, mesmo em tratamento colinérgico, apresentam um declínio maior nas conexões colinérgicas, seja de ACh ou de ChAT devido ao curso natural da própria doença (BOTTINO et al., 2012).

No CI, o MEEM mostrou interferir independentemente na atividade da ChAT, além de estar correlacionado positivamente com a escolaridade, assim como a escolaridade com a concentração proteica. A relação entre MEEM e escolaridade já é conhecida, visto que os anos de estudos dos indivíduos são proporcionais ao aumento ou diminuição no escore do teste (BERTOLUCCI et al., 1994; ALMEIDA, 1998). Quanta a influência do MEEM nos níveis de atividade pode ser justificado pelo maior nível de escolarização, e conseqüentemente um aumento na atividade colinérgica decorrente do desempenho cognitivo (BARTUS et al., 1982).

7.2.3 Colina-acetiltransferase (ChAT) versus butirilcolinesterase (BChE)

As colinesterases, butirilcolinesterase (BChE) e acetilcolinesterase (AChE) atuam na hidrólise de acetilcolina, sendo a BChE a principal envolvida na hidrólise de acetilcolina plasmática (LAMPÓN et al., 2012). De acordo com Simão-Silva (2014) e Bono et al. (2015), a atividade de BChE plasmática está diminuída nos pacientes com DA, consequência da presença da própria doença, visto que o sistema colinérgico está seriamente afetado no curso da mesma.

Neste trabalho, a atividade da BChE mostrou estar correlacionada positivamente com os níveis de concentração proteica e de atividade da ChAT nos pacientes e no grupo controle. Na DA, o aumento das enzimas ChAT e BChE pode estar relacionada com a tentativa de manter o equilíbrio nos níveis de acetilcolina extra sináptica (ACh), mesmo na presença das colinesterases (VIJAYARAGHAVAN et al. 2013). Sabe-se da existência do complexo BA β A, em líquido cefalorraquidiano, formado pela proteína ApoE, peptídeos β -amiloide e BChE/AChE, o qual atua de modo efetivo na degradação da ACh, sendo dependente dos níveis de peptídeos β -amiloide (DARREH-SHORI et al., 2009; DARREH-SHORI et al. 2011). Os complexos BA β A tendem a alterar esse equilíbrio na presença de peptídeos A β , aumentando a degradação da ACh pelas colinesterases (DARREH-SHORI et al 2009a; DARREH-SHORI et al 2009b). Os peptídeos A β podem desempenhar um papel chave na regulação extracelular da ACh, seja por fosforilação da ChAT (DOBRANSKY et al., 2003; DOBRANSKY e RYLLET, 2005) ou liberação dos peptídeos extracelular (CIRRITO et al., 2005), diminuindo ou aumentando sua atividade (NUNES TAVARES et al., 2012).

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho não constatou associação dos polimorfismos analisados dos genes *CHAT* (*rs3810950* - alelos A/G, *rs733722* - alelos C/T, *rs3810948* – alelos C/G, *rs1880676* – alelos A/G) e *SLC18A3* (*rs2269338* – alelos G/T) com a doença de Alzheimer e comprometimento cognitivo leve.

Os polimorfismos *rs733722* e *rs2269338* influenciam nos níveis da concentração e atividade da ChAT. Em DA, o *rs733722* interfere na concentração proteica da enzima, podendo predispor em diferentes alterações na resposta aos inibidores colinérgicos. Já o polimorfismo *rs2269338* aumenta os níveis de proteína nos indivíduos homozigotos TT, assim como no controle.

Também reafirmamos a presença de colina acetiltransferase em plasma, por meio da mensuração proteica e de atividade da ChAT em amostras de pacientes com DA e CI. Contudo, diferentemente do esperado, as médias entre os dois grupos não diferiram significativamente.

A influência dos parâmetros clínicos e não clínicos relevantes para a concentração proteica foram o MEEM, CDR e os inibidores colinérgicos em DA. Vimos que o escore do CDR é inversamente proporcional com a atividade da ChAT, ou seja, os níveis da atividade diminuem enquanto que o grau da demência aumenta. No grupo controle observou-se que a concentração proteica da ChAT é influenciada pelo nível de escolaridade, assim como o MEEM. Da mesma forma, o escore do MEEM influencia na atividade da enzima.

Por fim, a atividade da BChE mostrou estar correlacionada positivamente com os níveis de concentração proteica e de atividade da ChAT nos pacientes e no grupo controle, ou seja, o nível de atividade da BChE é proporcional a concentração e atividade de ChAT. Ademais, acredita-se que os peptídeos β -amiloide tenham um papel regulatório nesta relação BChE-ChAT, interferindo na atividade da colina-acetiltransferase e na síntese de acetilcolina (ACh).

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALBERTA, M. S; DEKOSKYB, S. T; DICKSOND, C. D. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the national institute on aging-Alzheimer's association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, 2011; p. 270–279.

ALFONSO, A.; GRUNDAHL, K.; MCMANUS, J.R. et al. Alternative splicing leads to two cholinergic proteins in *Caenorhabditis elegans*. **J. Mol. Biol.**, 1994; p.627-630.

AlzGene <http://www.alzgene.org/> Acesso em janeiro/2014.

ALZHEIMER ASSOCIATION. 2013 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, 2013; p. 208–245.

ALMEIDA, O. P. Mini exame do estado mental e o diagnóstico de demência no Brasil. **Arq Neuropsiquiatr.**, 1998; p.605-612.

BARTUS, R. T. et al. The cholinergic hypothesis of geriatric memory. **Science**, 1982, p. 408-414.

BASKIN, D. S. et al. Brain choline acetyltransferase and mental function in Alzheimer Disease. **Arch. Neurol.**, 1999, p. 1121-1123.

BEACH, TG; KUO, YM; SPIEGEL, K et al. The cholinergic deficit coincides with A β deposition at the earliest histopathologic stages of Alzheimer disease. **Journal Neuropathology Experiencie Neurology**, 2000, p. 308-313.

BEJANIN, S.; CERVINI, R.; MALLET, J. et al. A unique gene organization for two cholinergic markers, choline acetyltransferase and a putative vesicular transporter of acetylcholine. **J. Biol. Chem.**, 1994; p. 21944-21947.

BEJANIN, S.; HABERT, E.; BERRARD, S. et al. Promoter elements of the rat choline acetyltransferase gene allowing nerve growth factor inducibility in transfected primary cultured cells. **J. Neurochem.**, 1992; p.1580-1583.

BELLIER, J. P.; KIMURA, H. Peripheral type of choline acetyltransferase: biological and evolutionary implications for novel mechanisms in cholinergic system. **Journal Of Chemical Neuroanatomy**, 2011; p.225–235.

BELLIER, J.P.; AIMI, Y.; PARK, M.; HISANO, T. et al. Biochemical properties and partial purification of pchat, a novel splice variant of choline acetyltransferase. **Bull. Jap. Neurochem. Soc.**, 2002; p.329.

BERTOLUCCI, P. H., BRUCKI, S. M., CAMPACCI, S. R., JULIANO, Y. O mini-exame do estado mental em uma população geral: impacto da escolaridade. **Arq. Neuropsiquiatr.**, 1994; p. 1-7.

- BERTRAM, L. Alzheimer's disease genetics current status and future perspectives. **International Review of Neurobiology**, 2009, p.167-184
- BERTRAM, L.; BLACKER, D.; MULLIN, K., et al. Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. **Science** 2000; p.2302-2303.
- BIERER, LM; HAROUTUNIAN, V; GABRIEL, S et al. Neurochemical correlates of dementia severity in alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. **Journal Neurochemical**.1995; p.749-760.
- BOISSIERE, F.; FAUCHEUX, B.; AGID, Y, et al. Choline acetyltransferase mRNA expression in the striatal neurons of patients with Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, 1997; p. 169-172.
- BONDAREFF W, MOUNTJOY CQ, ROTH M, et al. Age and histopathologic heterogeneity in Alzheimer's disease. Evidence for subtypes. **Arch Gen Psychiatry**, 1987; p. 412-417.
- BONO, G. F.; SIMAO-SILVA, D. P; BATISTELA, M. S. et al. Butyrylcholinesterase: k variant, plasma activity, molecular forms and rivastigmine treatment in Alzheimer's disease in a Southern brazilian population. **Neurochemistry International**, 2015; p. 57-62.
- BOTTINO, C. M. et al. Estimate of dementia prevalence in a community sample from São Paulo, Brazil. **Dement. Geriatr.Cogn.Disord.**, 2008; p. 291-299.
- BREITNER JC, FOLSTEIN MF. Familial Alzheimer dementia: a prevalent disorder with specific clinical features. **Psychol Med**, 1984; p. 63-80.
- BRUCKI, S. M. D.; MAGALDI, R. M.; MORILLO, L. S. et al. **Demências - Enfoque Multidisciplinar: das bases fisiopatológicas ao diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Atheneu, 2011.
- CAI, Y.; CRONIN, C.N.; ENGEL, A.G. et al. Choline acetyltransferase structure reveals distribution of mutations that cause motor disorders. **Embo J.**, 2004; p. 2047-2058.
- CAIXETA, L. et al .Doença de Alzheimer. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- CARAMELLI, P. **Neuropatologia da Doença de Alzheimer. Neuropsiquiatria geriátrica**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2000, p.107-118.
- CARAMELLI, P.; BARBOSA, MT. Como diagnosticar as quatro causas mais frequentes de demência? **Rev Bras. Psiquiatria**, 2002; p. 7-10.
- CARAMELLI, P.; CHAVES, M. F. L, ENGELHARDT, E et al. Effects of galantamine on attention and memory in Alzheimer's disease measured by computerized neuropsychological tests: Results of the Brazilian Multi-Center galantamine Study. **Arq. Neuropsiquiatr.**, 2004.

CARAMELLI, P; TEIXEIRA, AL; BUCHPIGUEL, CA et al. Diagnosis of alzheimer's disease in Brazil. **Dement Neuropsychol**, 2011; p. 167-177.

CASTELL, X. et al. More than one way to toy with ChAT and VACht. **Journal of Physiology**, 2002; p.61-72.

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

CIRRITO, J.R.; YAMADA, K.A.; FINN, M.B. et al. Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid- β levels in vivo. **Neuron**, 2005; p.913–922.

COOK, LJ; HO, LW; WANG, L. et al. Candidate gene association studies of genes involved in neuronal cholinergic transmission in Alzheimer's disease suggests choline acetyltransferase as a candidate deserving further study. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, 2005; p. 5-8.

CORDER, E. H; SAUNDERS, A. M; STRITTMATTER, W. J et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. **Science**, 1993; p. 921-923.

CUMMINGS, J. L. Treatment of Alzheimer's disease: current and future therapeutic approaches. **Rev. Neurol. Dis.**, 2004; p-60-69.

DALVI, A. Alzheimer's Disease. **Disease a Month** 2012; p. 666-677.

DANYSZ, W.; PARSONS, A. C. Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. **Pharmacol Rev**, 1998.

DARREH-SHORI, T.; ALMKVIST, O.; GUAN, Z.Z. et al. Sustained cholinesterase inhibition in AD patients receiving rivastigmine for 12 months. **Neurology**, 2002; p. 563–572.

DARREH-SHORI, T.; BRIMIJOIN, S.; KADIR, A. et al. Differential csf butyrylcholinesterase levels in Alzheimer's disease patients with the apoe epsilon4 allele, in relation to cognitive function and cerebral glucose metabolism. **Neurobiol Dis.**, 2006; p.326–333.

DARREH-SHORI, T.; MODIRI, N.; BLENNOW, K. et al. The apolipoprotein e epsilon4 allele plays pathological roles in ad through high protein expression and interaction with butyrylcholinesterase. **Neurobiol Aging**, 2011; p.1236–1248.

DARREH-SHORI, T.; MODIRI, N.; LAHAUT, P.; NORDBERG, A. et al. Apolipoprotein e and butyrylcholinesterase synergistically promote ab peptides oligomerization. **Alzheimer's & Dementia**, 2009a.

DARREH-SHORI, T.; MODIRI, N.; NORDBERG, A. et al. ApoE and amyloid β deflate the cholinergic neurotransmission by boosting the activity and stability of cholinesterases in the brain. **Alzheimer's & Dementia**, 2009b.

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

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

DARVESH, S.; HOPKINS, D.A.; GEULA, C. 'Neurobiology of butyrylcholinesterase', **Nat. Rev. Neurosci.**, 2003; p. 131–138.

DAVIS, K. L. et al. Cholinergic markers in Elderly patients with early signs of Alzheimer disease. **JAMA**, 1999, p. 1401-1406.

DE GOIS, S.; HOUHOU, L; ODA, Y. et al. Is RE1/NRSE a common cis-regulatory sequence for ChAT and VACHT genes? **J BiolChem**, 2000, p.36683-36690.

DEKOSKY, S. T. et al. Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. **Annals of Neurology**, 2002.

DOBRANSKY, T.; BREWER, D.; LAJOIE, G. et al. Phosphorylation of 69-kda choline acetyltransferase at threonine 456 in response to amyloid- β peptide 1–42. **J Biol Chem.**, 2003; p. 5883–5893.

DOBRANSKY, T.; RYLETT, R. J. A model for dynamic regulation of choline acetyltransferase by phosphorylation. **Journal Of Neurochemistry**, 2005; p. 305–313.

DSV-IV-TRTM – Manual Diagnostico E Estatístico De Transtornos Mentais. Trad.CláudiaDornelles; - 4.Ed.Rev.- Porto Alegre: Artmed, 2002.

DUYCKAERTS, C.; DICKSON, D. W. Neuropathology of Alzheimer's disease. **International Society of Neuropathology Press**, 2003, p. 47-65.

ELLISON, D.; LOVE, S.; CHIMELLI, L. et al. **Neuropathology, a reference text of CNS pathology**, 2nd ed. Philadelphia: Mosby, 2004; p. 549-584.

ENGELHARDT, E. et al. Tratamento da Doença de Alzheimer. **Arq. Neuropsiquiatr** 2005, p. 1104-1112.

ERICKSON, J. D. et al. Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. **The Journal of biological chemistry**. 1994, p. 21929-21932.

FARRER LA, CUPPLES LA, HAINES JL, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis. **JAMA** 1997, p.1349–56

FERRI, C. P et al. Global prevalende of dementia: at a Delphi Consensus study. **Lancet**, 2005, p. 2112-2117.

FOLSTEIN, M.F., FOLSTEIN, S.E., MCHUGH, P.R. Mini-Mental State: a practical method for grading the cognitive state of patients for clinician. **J. Psychiatr. Res.**, 1975; p. 189-198.

FORMARI, LHT; GARCIA, LP; HILBIG, A; FERNANDEZ, LL. As Diversas Faces Da Síndrome Demencial: Como Diagnosticar Clinicamente? **Scientia Medica**, 2010, p.185-193.

FRIDMAN, C. et al. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. **RevPsiqClín.** 2004, p. 19-25.

FROTA, NAF, NITRINI R, DAMASCENO, BP et al. Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer. **DementNeuropsychol**, 2011, p. 5-10.

GABRIELLE, P.; JEANA, M.; LORENZA, E.C. Cytosolic choline acetyltransferase binds specifically to cholinergic plasma membrane of rat brain synaptosomes to generate membrane-bound enzyme. **Neurochem. Res**, 2003; p,543–549.

GEARING, M.; MIRRA, S. S.; HEDREEN, J. C. et al. The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part X. Neuropathology confirmation of the clinical diagnosis of Alzheimer's disease. **Neurology**, 1995, p. 461-466.

GIACOBINI, E.; SPIEGEL, R.; ENZ, A. et al. Inhibition of acetyl- and butyryl-cholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: correlation with cognitive benefit. **J. Neural Transm.** 2002, p. 1053–1065.

GILL, A. S. K; ISHAK, B. M. B; DOBRANSKY, B. R. et al. 82-kda choline acetyltransferase is in nuclei of cholinergic neurons In human cns and altered in aging and Alzheimer disease **Neurobiology Of Aging**, 2007; p.1028–1040.

GOATE A, CHARTIER-HARLIN MC, MULLAN M, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. **Nature**; 1991, p. 704–06.

GODINHO, C.; GORCZEWSKI, I.; HEISLER, A. Clinical and demographic characteristics of elderly patients with dementia assisted at an outpatient clinic in Southern Brazil. **Dement Neuropsychol.**, 2010; p. 42-46.

GONZÁLEZ- CASTANEDA, R. E. et al. Neural restrictive silencer factor and choline acetyltransferase expression in cerebral tissue of Alzheimer's disease patients: A pilot study. **Genetics and Molecular Biology**, 2013, p.28-36.

GOVINDASAMY, L.; PEDERSEN, B.; LIAN, W. et al. Structural insights and functional implications of choline acetyltransferase. **Journal of Structural Biology**, 2004, p. 226-235.

GROSMAN, D.D.; LORENZI, M.V.; TRINIDAD, A.C. et al. The human choline acetyltransferase gene encodes two proteins. **J Neurochem.**, 1995; p.484–491.

GRÜNBLATT, E.; ANDREAS REIF, A.; JUNGWIRTH, S. Genetic variation in the choline o-acetyltransferase gene in depression and Alzheimer's disease: the vita and milano studies. **Journal of Psychiatric Research**, 2011, p. 1250-1256.

HAHM, S. H.; CHEN, L.; PATEL, C. et al. Upstream sequencing and functional characterization of the human cholinergic gene locus. **J Mol Neuroscience**, 1997, p. 223-236.

HAHM, S. H.; CHEN, L.; PATEL, C.; ERICKSON, J.; BONNER, T.I.; WEIHE, E. et al. Upstream sequencing and functional characterization of the human cholinergic gene locus. **J Mol Neurosci.**, 1997; p.223–36.

HAHN, M.; HAHN, S.L.; STONE, D.M.; JOH, T.H. Cloning of the rat gene encoding choline acetyltransferase, a cholinergic neuron-specific marker. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.**, 1992; p.4387–4391.

HAN, L; COLE, M; BELLAVANCE, F et al. Tracking cognitive decline in alzheimer's disease using the mini-mental state examination: meta analysis. **Int Psychogeriatr**, 2000; p. 231-247.

HAROLD, D.; ABRAHAM, R.; HOLLINGWORTH, P. et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. **Nat Genet**, 2009, p.1088–1093.

HAROLD, D.; MACGREGOR, S.; PATTERSON, CE et al. A single nucleotide polymorphism in chat influences response to acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's. **PharmacogeneticsAnd Genomics**, 2006; p. 75-77.

HAROLD, D.; PEIRCE, T.; MOSKIVINA, V. et al. Sequence variation in the chat locus show no association with late-onset Alzheimer's disease. **Human Genet**, 2003; p. 258-267.

HARVEY RJ, SKELTON-ROBINSON M, ROSSOR MN. The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. **J NeurolNeurosurg Psychiatry** 2003; p. 1206–09.

HEBERT LE, SCHERR PA, BECKETT LA, et al. Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population. **JAMA** 1995; p.1354-1359.

HERRERA J.; CARAMELLI, P.; NITRINI, R. Estudo epidemiológico populacional de demência na cidade de Catanduva- estado de São Paulo-Brasil. **Revista Psiquiatria de Clínica**, 2002.

HERSH, L. B.; PEET, M. Effect of salts on the physical and kinetic properties of human placental choline acetyltransferase. **J. Neurochem.**, 1978; p. 1087-1093.

HOLLINGWORTH, P.; HAROLD, D.; SIMS, R. et al. Common variants at *ABCA7*, *MS4A6A/MS4A4E*, *EPHA1*, *CD33* AND *CD2AP* are associated with Alzheimer's disease. **Nat Genet**, 2011, p.429–435.

HOLTZMAN DM, MORRIS JC, GOATE AM. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. **SciTransl Med** 2011.

IBANEZ, C.F.; ERNFORS, P.; PERSSON, H. Developmental and regional expression of choline acetyltransferase mRNA in the rat central nervous system. **J. Neurosci. Res.** 1999; p.163–171.

JO, A. S.; AHN, K.; KIM, J. et al. *APOE* e 4 dependent association of the choline acetyltransferase gene polymorphisms (2384G>A and 1882G>A) with Alzheimer's disease. **Clinica Chimica Acta**, 2006, p. 179-182.

KAR, S.; SLOWIKOSKI, S. P; WESTAWAY, D et al. Interactions between β -amyloid and central cholinergic neurons: Implications for Alzheimer's disease. **J Psychiatric Neuroscience**, 2004, p. 427-441.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its biological function. **Life Sci.** 2003; p. 2101-2109.

KENGAKU, M.; MISAWA, H.; DEGUCHI, T. Multiple mRNA species of choline acetyltransferase from rat spinal cord. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, 1993; p.71–76.

KIM, A.R.; RYLETT, R.J.; SHILTON, B.H. Substrate binding and catalytic mechanism of human choline acetyltransferase. **Biochemistry**, 2006; p.14621–14631.

KIM, K. W.; SUH, Y. J.; PARK, W. Y. et al. Choline acetyltransferase G +4 A polymorphism confers a risk for Alzheimer's disease in concert with Apolipoprotein E e4. **Neuroscience Letters**, 2004; p.182-186.

KITAMOTO, T.; WANG, W.; SALVATERRA, P.H. et al. Structure and organization of the *Drosophila* cholinergic locus, **J. Biol. Chem.**, 1998; p. 2706-2713.

KNOPMAN, D. S.; DEKOSKY, S. T.; CUMMINGS, J. L. et al. Practice parameter: Diagnosis of dementia. Reports of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology**, 2001; p. 1143-1153.

LAMBERT, J.C.; HEATH, S.; EVEN, G. et al. Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CR1* associated with Alzheimer's disease. **Nat Genet**, 2009, p.1094–1099.

LAMPÓN, N.; HERMIDA-CADAHIA, E.F.; RIVEIRO, A.; TUTOR, J.C. Association between butyrylcholinesterase activity and low-grade systemic inflammation. **Ann. Hepatol.**, 2012, p. 356–363.

LEE, J. J.; SANGMEE, A. J.; PARK, J. H. et al. Choline acetyltransferase 2384 G>A polymorphism and the risk of Alzheimer Disease. **Alzheimer Disease Disorders**, 2012, p.81-87.

- LI, Y. J.; SCOTT, W. K.; HEDGES, D.J., et al. Age at onset in two common neurodegenerative diseases is genetically controlled. **American Journal Human Genetics**, 2002; p. 985-993.
- MALLET, J. et al. The cholinergic locus: ChAT and VACHT genes. **Journal Physiology**, 1998, p.145-147.
- MASSOULIE, J. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. **Neurosignals**, 2002; p.130–143.
- MENGEL-FROM, J. et al. Genetics variants in the choline acetyltransferase (ChAT) gene are modestly associated with normal cognitive function in the elderly. **Genes BrainBehav**. 2011.
- Mesulam, M.M. et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, 2002; p.627–639.
- MESULAM, M.M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P. et al. Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. **Neurobiol. Dis.**, 2002, p. 88–93.
- MISAWA, H.; ISHII, K.; DEGUCHI, T. Gene expression of mouse choline acetyltransferase. Alternative splicing and identification of a highly active promoter region. **J. Biol. Chem.**, 1992; p.20392-20399.
- MISAWA, H; MATSUURA, J.; ODA Y. et al. Human choline acetyltransferase mRNAs with different 5'-region produce a 69-kDa major translation product. **Mol Brain Res.**, 1997; p.323–333.
- MORRIS JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. **Neurology**, 1993; p.2412-2414.
- MONTANO, M. B. M. M; RAMOS, L. R. Validade da versão em português da Clinical Dementia Rating. **Rev Saúde Pública**, 2005; p. 912-917.
- MUBUMBILA, V.; SUTTER, A; PTOK, U et al. Identification of single nucleotide polymorphism in the choline acetyltransferase gene associated with Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, 2002; p. 9-12.
- MUFSON, E. J.; GINSBERG, S. D.; IKONOMOVIC, M. D et al. Human cholinergic basal forebrain: Chemoanatomy and neurologic dysfunction. **J Chem Neuroanat**, 2003; p. 233-242.
- NACIFF, J. M; BEHBEHANI, M. M.; MISAWA, H. Identification and Transgenic Analysis of a Murine Promoter that Targets Cholinergic Neuron Expression. **Journal of Neurochemistry**, 1999; p.17-28.
- NACIFF, J.M.; MISAWA, H.; DEDMAN, J.R. et al. Molecular characterization of the mouse vesicular acetylcholine transporter gene. **Neuroreport.**, 1997; p. 3467-3473.

- NAJ, A.C.; JUN, G.; BEECHAM, G.W. et al. Common variants at *MS4A4/MS4A6E*, *CD2AP*, *CD33* and *EPHA1* are associated with late-onset Alzheimer's disease. **Nat Genet**, 2011; p.436–441.
- NITRINI R, CARAMELLI P, BOTTINO CMC, et al. Diagnósticos de Doença De Alzheimer no Brasil. **Arquivos De Neuropsiquiatria**, 2005, p.720-727.
- NITRINI, R.; BOTTINO, C. M.; ALBALA, C. et al. Prevalence of dementia in Latin America: a collaborative study of population-based cohorts. *Int Psychogeriatric*, 2009. p. 622-630.
- NITRINI, R.; LEFÈVRE, B. H.; MATHIAS, S. C. Testes neuropsicológicos de aplicação simples para o diagnóstico de demência. **Arqu Neuropsiquiatr.**, 1994; p. 457-465.
- NORDBERG, A.; SVENSSON, A. L. Cholinesterase Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's Disease. **Drug Safety**, 1998; p.465-480.
- NOURHASHEMI, F; OUSSET, PJ; GILLETE-GUYONNET, S et al. A 2-year follow-up of 233 very mild (cdr 0.5) Alzheimer's disease patients. **Int J Geriatr Psychiatry**. 2008, p. 460-465.
- NUNES-TAVARES, N.; SANTOS, L. E.; STUTZ, B.; BRITO-MOREIRA, J.; KLEIN, W. L. et al. Inhibition of choline acetyltransferase as a mechanism for cholinergic dysfunction induced by amyloid- β peptide oligomers. **J Biol Chem.**, 2012; p.19377–19385.
- O'BRIEN, K.K.; SAXBY, B.K.; BALLARD, C.G. et al. Regulation of attention and response to therapy in dementia by butyrylcholinesterase. **Pharmacogenetics**, 2003; p.231–239.
- ODA, Y.; NAKANISHI, I.; DEGUCHI, T. A complementary dna for human choline acetyltransferase induces two forms of enzyme with different molecular weights in cultured cells. **Mol Brain Res**, 1992; p.287–294.
- ODA, Yoshio. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. **Pathology International**, 1999; p.921-937.
- OHNO, K.; TSUJINO, A.; BRENGMAN, J.M. et al. Choline Acetyltransferase Mutations Cause Myasthenic Syndrome Associated With Episodic Apnea In Humans. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2001; p.2017–2022.
- OZTURK, A.; DEKOSKY, S. T.; KAMBOH, M. I. Genetic variation in the choline acetyltransferase (CHAT) gene may be associated with the risk of Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, 2006; p. 1440-1444.
- PAKASKI, M.; KALMAN, J. Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. *NeurochemInt*, 2008; p. 103-111.

PARNETTI, L.; MIGNINI, F.; TOMASSONI, D; TRAINI, E.; AMENTA, F. Cholinergic precursors in the treatment of cognitive impairment of vascular origin: Ineffective approaches or need for re-evaluation? **Journal of the Neurological Sciences**, 2007, p. 264-269.

PERRY, E.K., PERRY, R.H., BLESSED, G., TOMLINSON, B.E. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of alzheimer type. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v. 4, p. 273–277, 1978.

PETERSEN, R. C. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. **Journal Of Internal Medicine**, 2004; p.183–194.

PETERSEN, R. C.; DOODY, R.; KURZ, A. et al. CURRENT CONCEPTS IN MILD COGNITIVE IMPAIRMENT. **Arch Neurol.**, 2001; p. 1985–92.

PETERSEN, R. C.; GLENN, E.S.; STEPHEN, C. W. Mild cognitive Impairment: Clinical characterization and outcome. **Arch Neurol.**, 1999, p. 303-308.

PICCARDI, MP.; CONGIU, D.; SQUASSINA, A et al. Alzheimer's disease: case-control association study of polymorphisms in ACHE, CHAT, and BCHE genes in a Sardinian sample. **American Journal Of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, 2007, p. 895–899.

POHANKA, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.**, 2011; p. 219-230.

PRINCE, M.; BRYCE, R.; ALBANESE, E. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. **Alzheimer's & Dementia**, 2013; p. 63–75.

SALES, M.; SUEMOTO, C.; TOPCIU, F. Severe mini-mental state examination: a brief cognitive assessment for patients with moderate and severe dementia. **Alzheimer's & Dementia**, 2011, p.s263.

SASTRY, B.V.; JANSON, V.E.; CHATURVEDI, A.K. Inhibition of human sperm motility by inhibitors of choline acetyltransferase. **J Pharmacol Exp Ther.**, 1981; p.378–384.

SCACCHI, R.; GAMBINA, G.; MORETTO, G.; CORBO, R Met al. Variability of ache, bche, and chat genes in the late-onset form of Alzheimer's disease and relationships with response to treatment with donepezil and rivastigmine. **American Journal Of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, 2009; p. 502–507.

SCHWARZ, S.; EISELE, T.; DIEHL, J et al. Lack of association between a single nucleotide polymorphism within the choline acetyltransferase gene and patients with Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, 2003; p.167-170.

SERRETTI, A.; OLGATI, P.; DE RONCHI D. Genetics of Alzheimer's disease. A rapidly evolving field. **Journal of Alzheimer's disease**, 2007; p. 73-92.

SESHADRI, S.; FITZPATRICK, A.L.; IKRAM, M.A. et al. Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. **JAMA** 2010, p.1832–1840.

SHERRINGTON R, ROGAEV EI, LIANG Y, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. **Nature**; 1995, p.754–760.

SHINOTOH, H.; FUKUSHI, K.; NAGATSUKA, S.; TANAKA, N. et al. Progressive loss of cortical acetylcholinesterase activity in association with cognitive decline in Alzheimer's disease: a positron tomography study. *Ann Neurol.* 2000; p.194-200.

SIMÃO-SILVA, D. P. **Estudo de associação entre variantes dos genes *BCHE*, *APOE*, *SLITRK3*, *MME* E *GHRL* E perfil das proteínas *APOE*, as colinesterases *BCHE/ACHE* e a doença de Alzheimer.** Curitiba, 2014. 141f. Tese de Doutorado em Genética. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SIMÃO-SILVA, D.P.; BERTOLUCCI, P.H.; LABIO, R.W. et al. Association analysis between K and -116A variants of butyrylcholinesterase and Alzheimer's disease in a Brazilian population. **Chemico-Biological Interactions**, 2012; p. 358-360.

TALMELLI, L. F. da S.; GRATÃO, A. C. M.; KUSUMOTA, L.; RODRIGUES, R. A. P. Nível de independência funcional e déficit cognitivo em idosos com doença de Alzheimer. **Rer Esc Enf USP**, 2010, p.933-939.

TANG, M.; RAO, D.; MA, C.; GUO, Y.; HAN, H.; LING, K.; LING, Y. Evaluation of choline acetyltransferase gene polymorphism (2384 G/A) in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Dementia And Geriatric Cognitive Disorders**. 2008; p. 9–14.

TOOYAMA, I.; HIROSHI, K. A protein encoded by an alternative splice variant of choline acetyltransferase mRNA is localized preferentially in peripheral nerve cells and fibers. **Journal Of Chemical Neuroanatomy**, 2000; p.217–226.

VIJAYARAGHAVAN, S.; AZADEH KARAMI, A.; SHAHIN AEINEHBAND, S. et al. Regulated extracellular choline acetyltransferase activity— the plausible missing link of the distant action of acetylcholine in the cholinergic anti-inflammatory pathway. **PlosOne**, 2013; p. 1-15.

WALSH, D. M; SELKOE, D. J. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. **Neuron**, 2004; p. 181–193.

WHITEHOUSE, P.J.; PRICE, D.L.; STRUBLE, R. G et al. Alzheimer's disease and senile dementia: Loss of neurons in the basal forebrain. **Science**, 1982; p.1215-1237.

WIGGINTON, J. E; CUTLER, D. J; ABECASIS, R. G. A note on exact tests of Hardy-Weinberg Equilibrium. **Am. J. Hum. Genet.**, 2005; p. 887–883.

WILCOCK, GK; ESIRI, MM; BOWEN, DM et al. Alzheimer's disease. correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities. **Journal Neurology Science**, 1982; p.407-417.

WINBLAD, B.; PALMER, K; KIVIPELTO, M. et al. Mild cognitive impairment – beyond controversies, towards a consensus: report of the international working group on mild cognitive impairment. **Journal Of Internal Medicine**, 2004; p. 240–246.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dementia: a public health priority**. Disponível em: <http://www.who.int/mental_health/publications/dementia_report_2012/en/>. Acesso em: 10/07/2015.

XU, X.; WANG, Y.; WANG, L. et al. Meta-Analyses of 8 polymorphisms associated with the risk of the Alzheimer's Disease. **Plos One**, 2013, p. 1-9.

ZHU CW, SANO M. Economic considerations in the management of Alzheimer's disease. **ClinInterv Aging**, 2006; p.143-54.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – BOXPLOTS DO PERFIL DA ChAT NA GRUPO DA DA E CI
APÊNDICE 2 – ARTIGO

APÊNDICE 1 – BOXPLOTS DO PERFIL DA ChAT NA GRUPO DA DA E CI

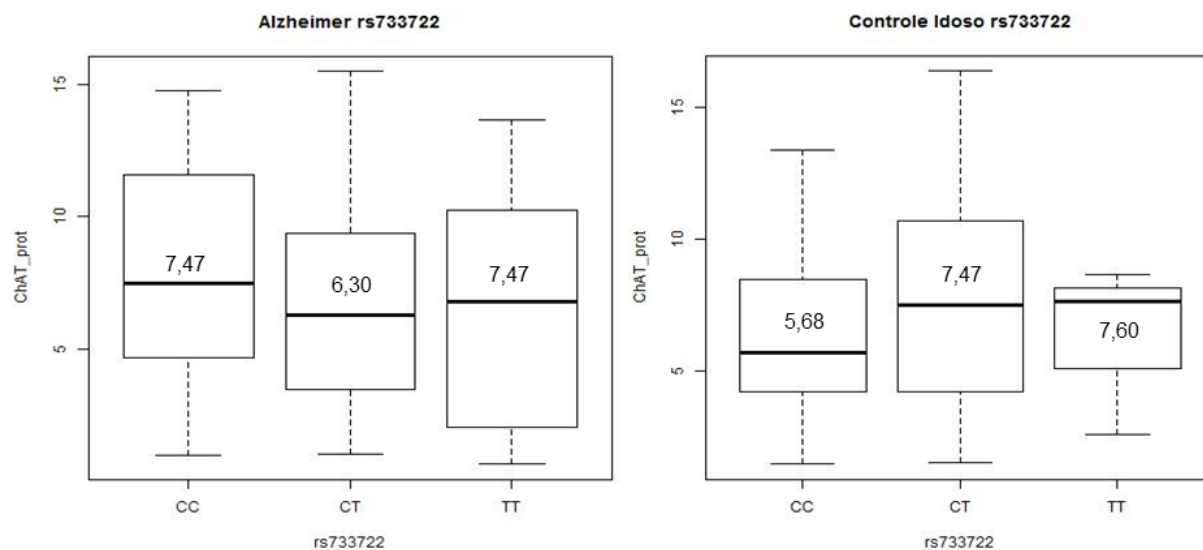


Figura 1: Concentração proteica da ChAT (nmol/min/mL), em DA e CI, de acordo com o genótipo do polimorfismo *rs733722*, com os valores de suas respectivas medianas.

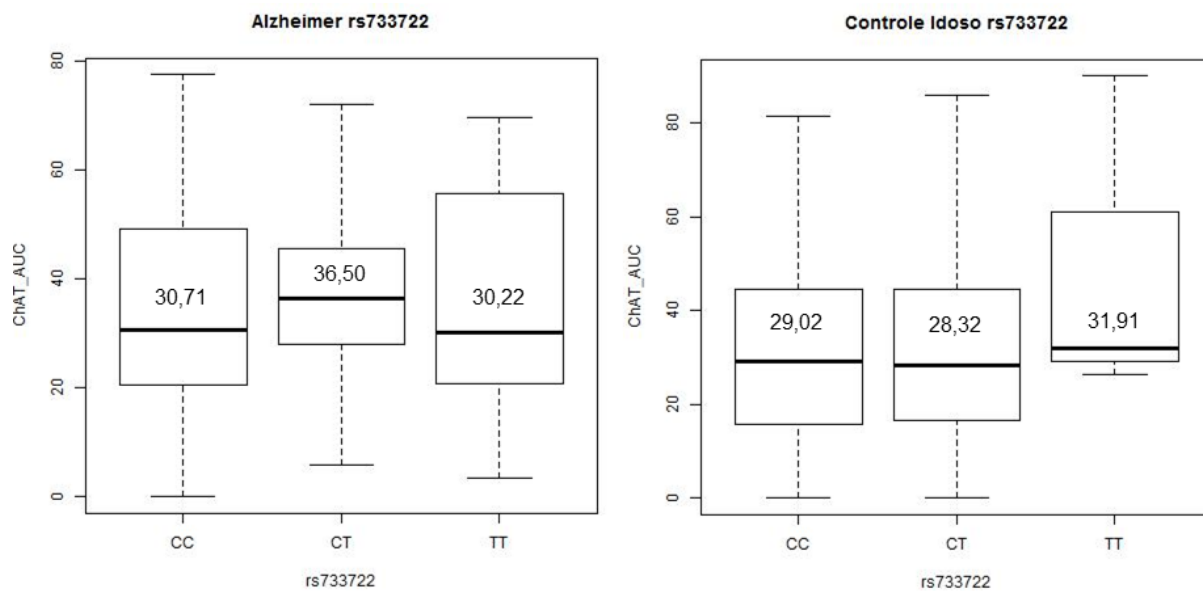


Figura 2: Atividade enzimática da ChAT (nmol/min/mL), em DA e CI, de acordo com o genótipo do polimorfismo *rs733722*, com os valores de suas respectivas medianas.

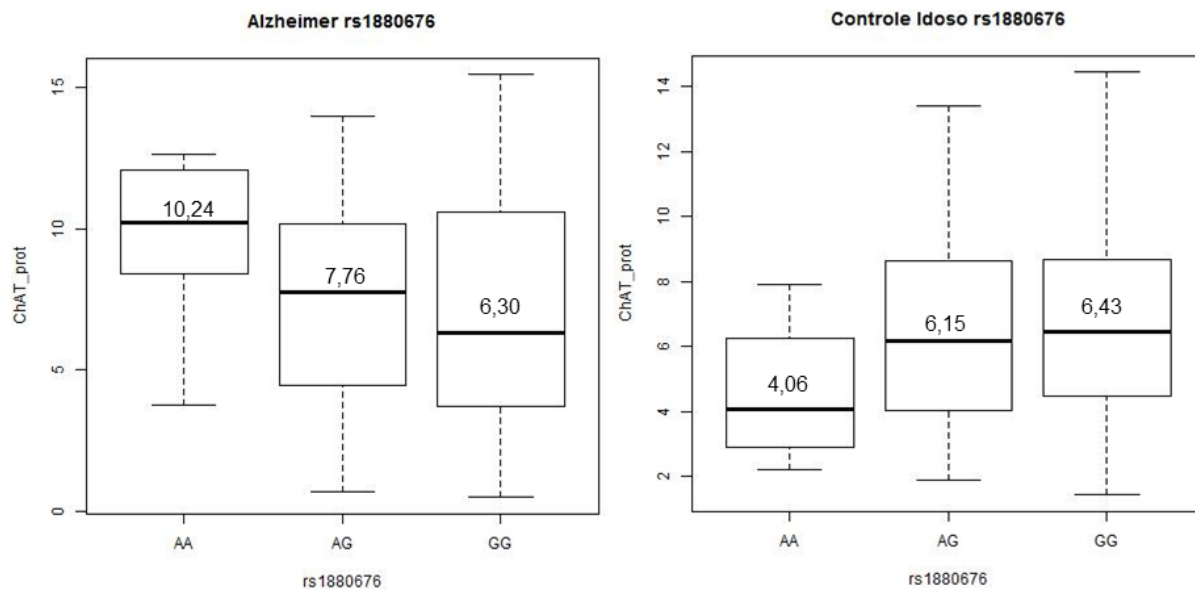


Figura 3: Concentração proteica da ChAT (nmol/min/mL), em DA e CI, de acordo com o genótipo do polimorfismo *rs1880676*, com os valores de suas respectivas medianas.

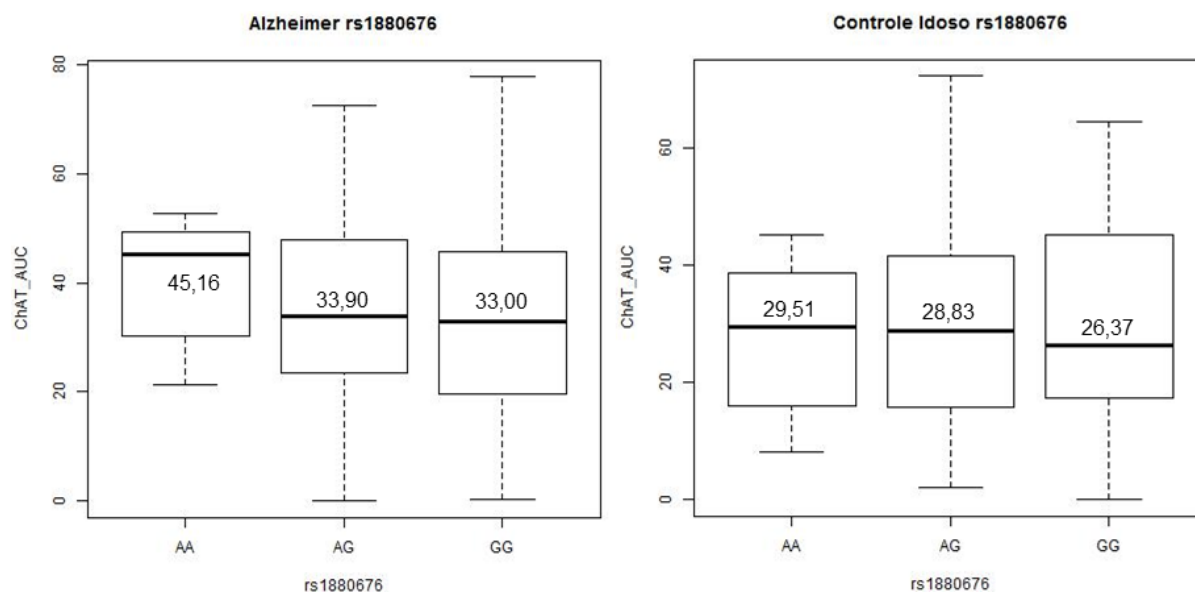


Figura 4: Atividade enzimática da ChAT (nmol/min/mL), em DA e CI, de acordo com o genótipo do polimorfismo *rs1880676*, com os valores de suas respectivas medianas.

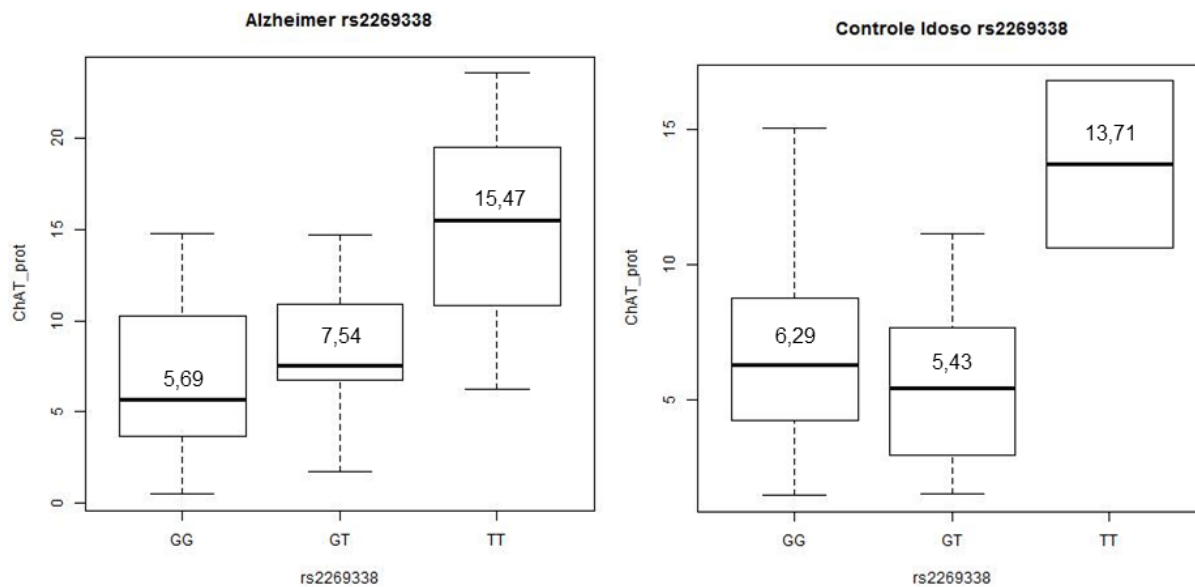


Figura 5: Concentração proteica da ChAT (nmol/min/mL), em DA e CI, de acordo com o genótipo do polimorfismo *rs2269338*, com os valores de suas respectivas medianas.

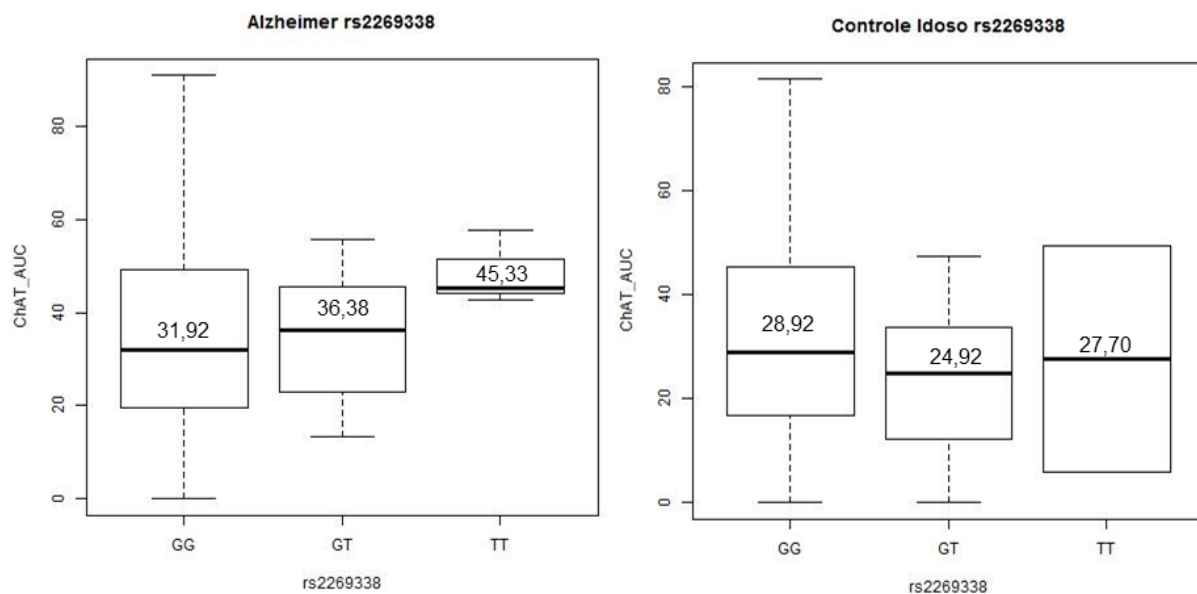


Figura 6: Atividade enzimática da ChAT (nmol/min/mL), em DA e CI, de acordo com o genótipo do polimorfismo *rs2269338*, com os valores de suas respectivas medianas.

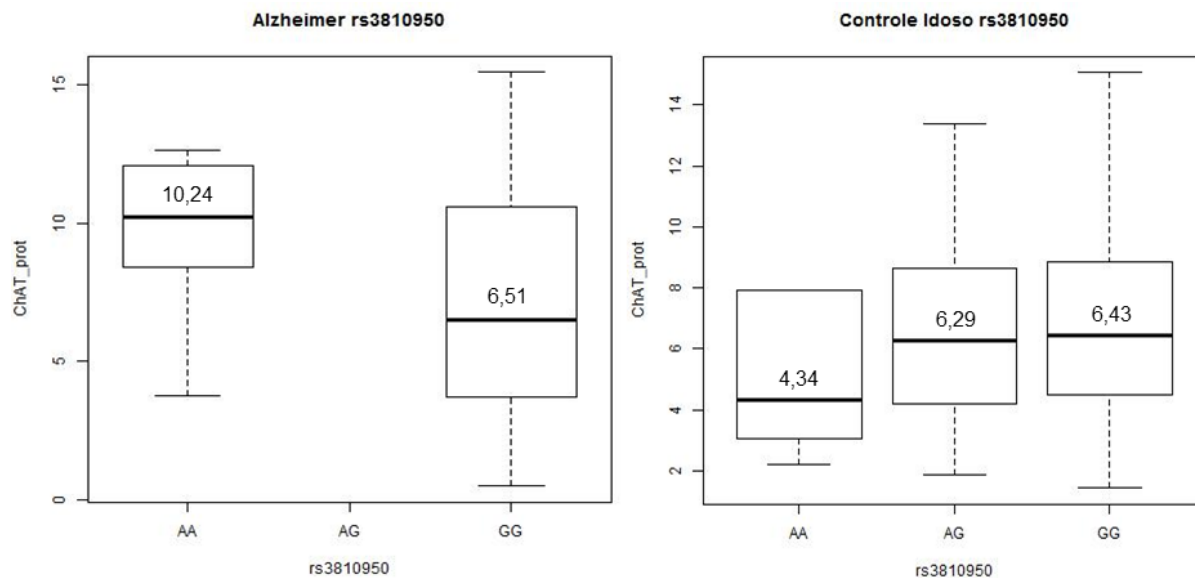


Figura 7: Concentração proteica da ChAT (nmol/min/mL), em DA e CI, de acordo com o genótipo do polimorfismo *rs3810950*, com os valores de suas respectivas medianas.

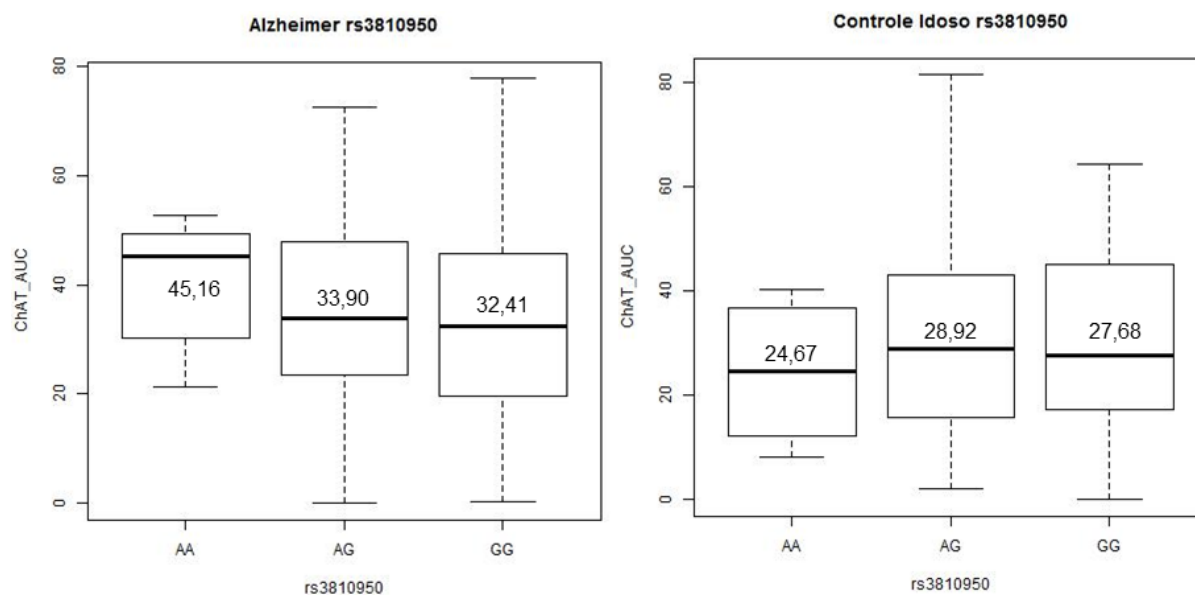


Figura 8: Atividade enzimática da ChAT (nmol/min/mL), em DA e CI, de acordo com o genótipo do polimorfismo *rs3810950*, com os valores de suas respectivas medianas.

APÊNDICE 2 - ARTIGO

INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS E VARIÁVEIS CLÍNICAS NO PERFIL PROTEICO DA ChAT EM PLASMA DE PACIENTES COM DOENÇA DE ALZHEIMER

INTRODUÇÃO

A DA é caracterizada pela perda progressiva de memória e de outras funções cognitivas, implicando em inabilidades de atividades cotidianas do indivíduo acometido (FROTA et al., 2011). Patologicamente, ocorre a perda de neurônios, principalmente no neocórtex e hipocampo, com acúmulo de placas amilóides e de emaranhados neurofibrilares contendo proteína tau hiperfosforilada (DUYCKAERTS & DICKSON, 2003).

O gene colina-O-acetiltransferase (*CHAT*) codifica a proteína colina-acetiltransferase (ChAT) que catalisa a biossíntese da acetilcolina. A síntese da ChAT ocorre dentro do pericário dos neurônios colinérgicos e não colinérgicos (BELLIER et al., 2011; LEE et al., 2012), além de ser encontrada dentro de células não neuronais (HERSH e PEET, 1978; SASTRY et al., 1983; KAWASHIMA e FUJI, 2003). Porém, dados recentes mostraram concentração proteica e atividade de ChAT em fluídos extracelulares, como em líquido cefalorraquidiano e plasma (VIJAYARAGHAVAN et al. 2013). Além disso, Vijayaraghavan et al. (2013) mostraram a produção de ChAT extracelular via cultura de células tronco embrionárias, linfócitos e astrócitos, reformulando conceitos literários de que a ChAT atuaria apenas como uma enzima citosólica, localizada principalmente nos terminais colinérgicos (ODA, 1999; GOVINDASAMY et al., 2004).

O gene transportador vesicular da acetilcolina (*SLC18A3*) codifica a proteína transportadora vesicular da acetilcolina – VACHT. A VACHT transporta a ACh citoplasmática e a armazena em vesículas sinápticas até sua liberação na fenda colinérgica (HAHM et al., 1997; MALLETT et al., 1998). Os dois genes formam o locus colinérgico, pois são regulados e expressos por mecanismos semelhantes devido ao compartilhamento de um mesmo promotor e ao processamento alternativo que ocorre (NACIFF et al., 1999). Ambos os genes produzem proteínas de importante valor nas funções neurofisiológicas, principalmente para um correto desempenho do sistema colinérgico (NORDERG e SVENSSON, 1998).

A ChAT influencia uma ampla gama de funções neurofisiológicas dependente dos processos colinérgicos, incluindo desempenho cognitivo, excitação, sono, movimento e o processamento de informação visual (ODA, 1999). Visto que alterações nessas atividades estão associadas com alguns transtornos neurodegenerativos, dentre eles a doença de Alzheimer (WILCOCK et al., 1982; BIERER et al., 1995; BEACH et al., 2000), pode-se inferir que variantes presentes no gene influenciam para diferentes níveis de concentração e atividade enzimática da ChAT.

Assim sendo, mensuramos os perfis proteicos e enzimáticos da ChAT nos pacientes com DA e grupo controle em plasma a fim de validar, em uma amostra maior, a presença e atividade da enzima. Ademais, investigamos a interferência das variantes genéticas do gene *CHAT* (*rs3810950*, *rs733722*, *rs1880676*) e do gene *SLC18A3* (*rs2269338*), assim como das variáveis clínicas (MEEM, CDR, IChE) e escolaridade no perfil da ChAT.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

No total foram utilizadas 198 amostras da população do Estado do Paraná, sendo que 107 casos eram idosos com a Doença de Alzheimer e 92 indivíduos idosos cognitivamente saudáveis, predominantemente eurodescentes. As amostras foram provenientes do Ambulatório de Disfunção Cognitiva do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) e do Ambulatório de Distúrbios da Memória e do Comportamento (ADEMEC), do Instituto de Neurologia de Curitiba (INC).

O critério diagnóstico para os pacientes com DA seguiu os padrões do NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's disease and Related Disorders Association*) (MCKHANN et al., 2011) com adaptações das recomendações do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia (FROTA et al., 2011).

O grupo controle, idosos cognitivamente saudáveis, foi avaliado por meio de breve anamnese e pelos testes de rastreio, o Mini-Exame do Estado Mental (MEEM), GDS -15 (Escala de Depressão Geriátrica de Yesavage) e PFEFFER.

Foram excluídos portadores de doenças infectocontagiosas (hepatite, malária, doença de Chagas, HIV), alcoólatras, histórico prévio de Acidente Vascular Cerebral ou lapso de perda de memória, atividades de vida diárias comprometidas pela cognição, queixas persistentes de falta de memória, MEEM abaixo do esperado e sintomas de depressão.

Os pacientes e seus acompanhantes, assim como o grupo controle foram informados sobre a pesquisa e, caso aceitassem participar assinavam o Termo de Consentimento Livre-Esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), sob o número 1192.117.11.08.

Para o presente trabalho a função cognitiva global será referida por meio do teste de rastreio padrão MEEM (Mini-Exame de Estado Mental) (FOLSTEIN et al., 1975) e o estado da doença foi mensurado pelo CDR (*Clinical Dementia Rating*) (MORIS, 1993).

Genotipagem dos polimorfismos

O DNA genômico total foi extraído do sangue periférico pelo método *salting out* (Lahiri e Nurnberger, 1991 com modificações) e diluído para concentração final de 20 ng/μL. A genotipagem foi realizada por ensaios *TaqMan SNP Genotyping Assays* (Applied Biosystems) e termociclador de PCR em tempo real.

Para tanto, as condições utilizadas na PCR, para cada *SNP* específico, foram compostas de 5μL de *TaqMan Universal PCR Master Mix*, 0,5 μL da alíquota do Kit de Genotipagem *TaqMan SNP* específico, 2,5 μL de água ultrapura e 2 μL de DNA 20 ng/μL, tendo um volume final de 10μL por reação.

A programação dos ciclos de corrida compreenderam quatro passos: 1º) passo de 60 segundos a 60°C; 2º) passo de 10 minutos a 95°C; 3º) passo repetido 50 vezes de 15 segundos a 95°C intercalados por 90 segundos a 60°C; 4º) passo de 30 segundos a 60°C.

Mensuração proteica e enzimática da ChAT

A mensuração proteica e enzimática da ChAT no plasma foi realizada por ELISA-Sanduiche (*Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) de acordo com o protocolo de Vijayaraghavan et al. 2013.

Análises Estatísticas

Utilizamos o teste de Shapiro Wilk com correção de Lilliefors nas variáveis atividade e concentração proteica, MEEM e anos de estudo (escolaridade) a fim de verificar a hipótese de distribuição normal pelo pacote *Nortest* do programa R.

Após análise das distribuições, foram feitas as comparações das médias por teste t e por Mann Whitney, para as amostras paramétricas e não paramétrica no programa Statistica, versão 10 para Windows, assim como as análises de regressão múltipla e correlação de *Spearman*. O intervalo de confiança para todas as análises estatísticas realizadas foi de 95% ($p= 0,05$).

RESULTADOS

Na TABELA 1 mostram-se os valores das médias de atividade e concentração proteica nos pacientes com a doença de Alzheimer e grupo controle, bem como o padrão de distribuição e a comparação entre as medianas.

TABELA 1. Perfil proteico e de atividade da colina-acetiltransferase (ChAT) em pacientes com DA e CI.

	DA n=107		CI n=92		DA x CI	
	Médias \pm D.P	p^*	Médias \pm D.P	p^*	p^{**}	Z
ChAT_prot	7,92 \pm 5,34	0.06	7,1 \pm 4,39	<0.01	0,34	0,94
ChAT_ativ	35,71 \pm 21,00	0.08	33,27 \pm 26,54	<0.01	0,10	1,63

Nota: ChAT_prot refere-se a concentração proteica, em nmol/mL, e ChAT_ativ à atividade enzimática, em nmol/min/mL. O valor p^* é referente a hipótese de distribuição normal dos níveis de atividade e concentração da proteína – teste de Shapiro Wilk com correção de Lilliefors. O valor p^{**} refere-se ao Teste de Mann Whitney para comparação das medianas dos níveis de atividade e concentração de proteína entre DA-CI.

Na tabela 2, estão reunidas as médias e medianas agrupadas por genótipo de cada polimorfismo (*CHAT* - *rs3810950*, *rs733722*, *rs1880676* e *SLC18A3* - *rs2269338*) dentro de cada grupo (DAxDA; CIxCI) e a comparação entre os grupos (DAxCI). Também verificamos o padrão da atividade e concentração da ChAT estratificado por alelos, contudo, assim como nas comparações agrupados por

portador e não portador, apenas o polimorfismo *rs2269338* mostrou valor significativo em relação a concentração proteica (DA, $p=0,01$; CI, $p=0,04$) (FIGURA 1).

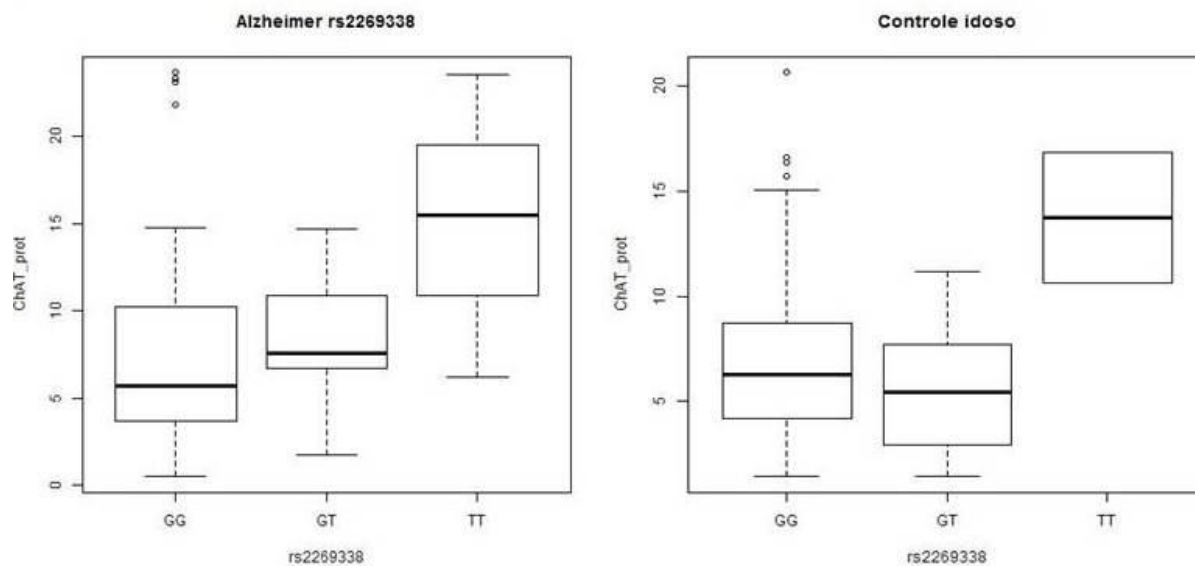


FIGURA 1: Padrão da concentração proteica da ChAT em pacientes com DA e no grupo controle de acordo com os genótipos do polimorfismo *rs2269338* do gene *SLC18A3*.

As análises de regressão múltipla foram feitas de acordo com o modelo “*forward stepwise*”, onde colocamos como variável dependente a concentração proteica e a atividade da ChAT. As variantes genéticas, parâmetros clínicos (MEEM, CDR, GDS e IChEs) e escolaridade entraram como variáveis independentes.

Em relação à concentração proteica, os polimorfismos *rs2269338* ($p=0,016$; $\beta=-0,23$) e *rs733722* ($p=0,036$; $\beta=-0,20$), MEEM ($p=0,017$; $\beta=0,63$), CDR ($p=0,056$; $\beta=0,52$) e o uso de inibidores colinérgicos ($p=0,03$; $\beta=0,24$) mostraram atuar como variável independente nos indivíduos com DA. No controle foi observado que as variantes *rs2269338* ($p=0,05$; $\beta=-0,21$), a escolaridade ($p=0,04$; $\beta=0,41$) e o MEEM ($p=0,004$; $\beta=-0,55$) estão interferindo na concentração de proteína da ChAT.

Ademais, foi realizada correlação de *Spearman*, nos modelos “*detailed report*” e “*square matrix*” a fim de verificar o comportamento do MEEM, CDR e IChEs no padrão de atividade e concentração proteica da ChAT.

As análises mostraram correlação negativa entre o CDR e a atividade da ChAT ($\rho=-0,20$, $p=0,004$), bem como com o MEEM ($\rho=-0,70$, $p<0,01$) em DA. Nos controles, a correlação foi positiva entre a concentração da ChAT e

escolaridade ($\rho=0,24$, $p=0,01$), assim como escolaridade com MEEM ($\rho=0,46$, $p<0,01$). Para as demais variáveis não foi mostrado nenhuma correlação.

TABELA 2. COMPARAÇÕES ENTRE AS MÉDIAS E MEDIANAS DA CONCENTRAÇÃO E ATIVIDADE DA CHAT, AGRUPADO POR PORTADOR E NÃO PORTADOR DE ALELO, PARA CADA *SNP* ESPECÍFICO (*RS3810950*, *RS2269338*, *RS1880676* E *RS733722*) DENTRE (DAXDA; CIXCI) E ENTRE (DAXCI) OS GRUPOS .

	DA			CI			DA x CI		DA x CI	
	Portador G (AG+GG)	Não Portador (AA)	p	Portador G (AG+GG)**	Não Portador (AA)**	p	Não Portador (AA)	Não Portador (AA)	Portador G (AG+GG)	Portador G (AG+GG)
							Valor de p		Valor de p	
<i>rs3810950</i>										
ChAT_prot	7,63 ± 5,20	9,43 ± 3,58	0,44	6,01	4,34	0,40				
ChAT_ativ	35,52 ± 21,34	39,75 ± 13,37	0,66	29,01	24,67	0,52	0,20		0,86	
<i>rs1880676</i>										
ChAT_prot	7,62 ± 5,22	9,43 ± 3,58	0,44	6,01	4,06	0,23				
ChAT_ativ	35,63 ± 21,43	39,75 ± 13,37	0,67	29,01	29,51	0,80	0,12		0,79	
<i>rs2269338</i>										
ChAT_prot	7,48 ± 4,88	15,08 ± 8,66	0,01	6,01	13,71	0,04				
ChAT_ativ	35,63 ± 21,26	48,64 ± 8,00	0,29	29,01	27,7	0,79	0,99		0,39	
<i>rs733722</i>										
ChAT_prot	7,87 ± 5,17	6,31 ± 4,73	0,38	6,01	7,60	0,97				
ChAT_ativ	35,88 ± 20,96	37,41 ± 23,49	0,83	29,01	31,91	0,35	0,78		0,42	

Nota: Para a comparação das médias, dados paramétricos, utilizamos o teste t (médias e desvios mostrados) e para dados não paramétricos** o teste de Mann Whitney** (medianas e valor de p). Comparamos os não portadores entre os pacientes com DA e controle, assim como os portadores por teste de Mann Whitney.

DISCUSSÃO

Neste trabalho, mensuramos os níveis de concentração proteica e atividade de ChAT em plasma de pacientes com doença de Alzheimer e controle idoso, reforçando a descoberta da ChAT em uma amostra maior de DA (n=107) e controle (n=92), assim como visto por Vijayaraghavan et al. (2013).

Na DA há redução nos níveis de colina-acetiltransferase (ChAT) citosólica cerebral e, conseqüentemente, menor produção de acetilcolina (ACh), gerando uma disfunção colinérgica cortical (WHITEHOUSE et al., 1982; BOISSIERE et al., 1997; MUFSON et al., 2003; KAR et al., 2004; PAKASKI e KALMAN, 2008). Contudo, ao avaliarmos os perfis de concentração e atividade de enzima, em nível plasmático, não observamos diferenças significativas nas concentrações e atividade da ChAT entre DA e controle. Isto pode estar relacionado com a manutenção do equilíbrio nos níveis de acetilcolina (ACh) periférica, mesmo na presença das enzimas degradadoras de ACh, a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE) (VIJAYARAGHAVAN et al. 2013).

Em relação as variáveis genéticas, verificamos a diferença nas medianas da concentração proteica em DA e no grupo controle na presença da variante *rs2269338* (transversão G→T) do gene *SLC18A3*, assim como na análise de regressão. Conforme visto na figura 1, nota-se um padrão diferente entre os genótipos dos pacientes com DA, onde os homozigotos GG apresentam menor nível de proteína, enquanto os homozigotos TT mostram uma maior concentração. A influência da presença do alelo T no aumento da concentração proteica é evidente e também corroborada com a análise alélica, sendo possível que este atue de forma recessiva na concentração proteica. Nos controles averiguamos um padrão semelhante, onde os homozigotos para o alelo T possuem níveis maiores de concentração proteica em relação aos homozigotos GG. Essa semelhança no padrão entre DA e controle, condiz com a não diferença entre as medianas dos grupos.

Outro polimorfismo que mostrou influenciar a concentração proteica é *SNP rs733722* (transição C→T), presente na região promotora do gene, de acordo com a análise de regressão nos pacientes com DA. De acordo com Harold et al. (2006), a variante *rs733722* influencia no declínio cognitivo dos pacientes em resposta aos IChE. No trabalho, os indivíduos portadores do alelo T apresentaram um menor declínio anual quando comparado com os homozigotos CC. A variação entre os

níveis de concentração proteica pode estar sendo influenciado pelo próprio polimorfismo, assim como pela ação dos anticolinesterásicos.

Na análise de regressão vimos que os IChE estão influenciando nos níveis de concentração da ChAT. Isso provavelmente ocorra pelo mecanismo de feedback entre a biodisponibilidade de ACh e dos inibidores colinérgicos; na presença dos inibidores, possivelmente ocorre um aumento da disponibilidade de ACh desencadeando uma demanda menor de síntese da enzima colina acetiltransferase, visto que a atividade da ChAT não foi influenciado pelos inibidores.

Em DA, verificamos que os escores do MEEM e do CDR atuaram como variáveis independentes na concentração proteica da ChAT, além de estarem correlacionados negativamente um com o outro. Esses dados vão de encontro com o que é visto na prática clínica, pois pontuações menores no MEEM estão geralmente associadas à demência moderada e grave (CDR2 e CDR3) (SHINOTOH et al., 2000). Além disso, a diminuição da atividade de ChAT está correlacionado com a piora cognitiva (BASKIN et al, 1999; DEKOSKY et al., 2002)

Ademais, o CDR também foi correlacionado negativamente com a atividade da ChAT nos indivíduos com DA, uma vez que em estágios mais avançados da doença, mesmo em tratamento colinérgico, apresentam um declínio maior nas conexões colinérgicas, seja de ACh ou de ChAT devido ao curso natural da própria doença (BOTTINO et al., 2012).

Nos controles, o MEEM mostrou interferir independentemente na atividade da ChAT, além de estar correlacionado positivamente com a escolaridade, assim como a escolaridade com a concentração proteica.

A relação entre MEEM e escolaridade já é conhecida, visto que os anos de estudos dos indivíduos são proporcionais ao aumento ou diminuição no escore do teste (BERTOLUCCI et al., 1994; ALMEIDA, 1998). Quanta a influencia do MEEM nos níveis de atividade pode ser justificado pelo maior nível de escolarização e conseqüentemente um aumento na atividade colinérgica decorrente do desempenho cognitivo (BARTUS et al., 1982).

CONCLUSÃO

Este é o primeiro trabalho a verificar a influencia de variantes genéticas nos níveis de concentração e atividade proteica da *CHAT* em plasma. Supõe-se que os polimorfismos *rs733722* e *rs2269338* possam estar contribuindo parcialmente nos

perfis fenotípicos de atividade e concentração proteica dos pacientes com DA e nos controles. Na DA, o *rs733722* interfere na concentração proteica da enzima, podendo predispor em diferentes alterações na resposta aos inibidores colinérgicos. Já o polimorfismo *rs2269338* aumenta os níveis de proteína nos indivíduos homocigotos TT, assim como no controle.

Também reafirmamos a presença de colina acetiltransferase, por meio da mensuração proteica e de atividade da enzima, em amostras de pacientes com DA e controle. Contudo, as médias entre os dois grupos não diferiram significativamente.

A influência dos parâmetros clínicos e não clínicos relevantes para a concentração proteica foram o MEEM, CDR e os inibidores colinérgicos em DA. Vimos que o escore do CDR é inversamente proporcional com a atividade da ChAT, ou seja, os níveis da atividade diminuem enquanto que o grau da demência aumenta.

No grupo controle observou-se que a concentração proteica da ChAT é influenciada pelo nível de escolaridade, assim como o MEEM. Da mesma forma, o escore do MEEM influencia na atividade da enzima.

Desta forma, reafirmamos a presença de colina acetiltransferase, por meio da mensuração proteica e de atividade da enzima, em amostras de pacientes com DA e controle. Contudo, apesar das médias entre os dois grupos não diferiram significativamente, a identificação de fatores que influenciam no perfil da ChAT e as interações complexas entre estes é de suma importância para compreensão e caracterização dessas variáveis visando melhorar o tratamento e elucidação do mecanismo da DA.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, O. P. Mini exame do estado mental e o diagnóstico de demência no Brasil. **Arq Neuropsiquiatr.**, 1998; p.605-612.

BARTUS, R. T. et al. The cholinergic hypothesis of geriatric memory. **Science**, 1982, p. 408-414.

BASKIN, D. S. et al. Brain choline acetyltransferase and mental function in Alzheimer Disease. **Arch. Neurol.**, 1999, p. 1121-1123.

BEACH, TG; KUO, YM; SPIEGEL, K et al. The cholinergic deficit coincides with A β deposition at the earliest histopathologic stages of Alzheimer disease. **Journal Neuropathology Experiencie Neurology**, 2000, p. 308-313.

BELLIER, J. P.; KIMURA, H. Peripheral type of choline acetyltransferase: biological and evolutionary implications for novel mechanisms in cholinergic system. **Journal Of Chemical Neuroanatomy**, 2011; p.225–235.

BERTOLUCCI, P. H., BRUCKI, S. M., CAMPACCI, S. R., JULIANO, Y. O mini-exame do estado mental em uma população geral: impacto da escolaridade. **Arq. Neuropsiquiatr.**, 1994; p. 1-7.

BIERER, LM; HAROUTUNIAN, V; GABRIEL, S et al. Neurochemical correlates of dementia severity in alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. **Journal Neurochemical**.1995; p.749-760.

BOISSIERE, F.; FAUCHEUX, B.; AGID, Y, et al. Choline acetyltransferase mRNA expression in the striatal neurons of patients with Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, 1997; p. 169-172.

BOTTINO, C. M. et al. Estimate of dementia prevalence in a community sample from São Paulo, Brazil. **Dement. Geriatr.Cogn.Disord.**, 2008; p. 291-299.

DEKOSKY, S. T. et al. Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. **Annals of Neurology**, 2002.

DUYCKAERTS, C.; DICKSON, D. W. Neuropathology of Alzheimer's disease. **International Society of Neuropathology Press**, 2003, p. 47-65.

FOLSTEIN, M.F., FOLSTEIN, S.E., MCHUGH, P.R. Mini-Mental State: a practical method for grading the cognitive state of patients for clinician. **J. Psychiatr. Res.**, 1975; p. 189-198.

FROTA, NAF, NITRINI R, DAMASCENO, BP et al. Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer. **DementNeuropsychol**, 2011, p. 5-10.

GOVINDASAMY, L.; PEDERSEN, B.; LIAN, W. et al. Structural insights and functional implications of choline acetyltransferase. **Journal of Structural Biology**, 2004, p. 226-235.

HAHM, S. H; CHEN, L.; PATEL, C.; ERICKSON, J.; BONNER, T.I.; WEIHE, E. et al. Upstream sequencing and functional characterization of the human cholinergic gene locus. **J Mol Neurosci.**, 1997; p.223–36.

HAROLD, D.; MACGREGOR, S.; PATTERSON, CE et al. A single nucleotide polymorphism in chat influences response to acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's. **PharmacogeneticsAnd Genomics**, 2006; p. 75-77.

HERSH, L. B.; PEET, M. Effect of salts on the physical and kinetic properties of human placental choline acetyltransferase. **J. Neurochem.**, 1978; p. 1087-1093.

KAR, S.; SLOWIKOSKI, S. P; WESTAWAY, D et al. Interactions between β -amyloid and central cholinergic neurons: Implications for Alzheimer's disease. **J Psychiatric Neuroscience**, 2004, p. 427-441.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its biological function. **Life Sci.** 2003; p. 2101-2109.

LEE, J. J.; SANGMEE, A. J.; PARK, J. H. et al. Choline acetyltransferase 2384 G>A polymorphism and the risk of Alzheimer Disease. **Alzheimer Disease Disorders**, 2012, p.81-87.

MALLET, J. et al. The cholinergic locus: ChAT and VACHT genes. **Journal Physiology**, 1998, p.145-147.

MORRIS JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. **Neurology**, 1993; p.2412-2414.

MUFSON, E. J.; GINSBERG, S. D.; IKONOMOVIC, M. D et al. Human cholinergic basal forebrain: Chemoanatomy and neurologic dysfunction. **J ChemNeuroanat**, 2003; p. 233-242.

NACIFF, J. M; BEHBEHANI, M. M.; MISAWA, H. Identification and Transgenic Analysis of a Murine Promoter that Targets Cholinergic Neuron Expression. **Journal of Neurochemistry**, 1999; p.17-28.

NORDBERG, A.; SVENSSON, A. L. Cholinesterase Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's Disease. **Drug Safety**, 1998; p.465-480.

ODA, Yoshio. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. **Pathology International**, 1999; p.921-937.

PAKASKI, M.; KALMAN, J. Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. **NeurochemInt**, 2008; p. 103-111.

SASTRY, B.V.; JANSON, V.E.; CHATURVEDI, A.K. Inhibition of human sperm motility by inhibitors of choline acetyltransferase. **J Pharmacol Exp Ther.**, 1981; p.378-384.

SHINOTOH, H.; FUKUSHI, K.; NAGATSUKA, S.; TANAKA, N. et al. Progressive loss of cortical acetylcholinesterase activity in association with cognitive decline in Alzheimer's disease: a positron tomography study. **Ann Neurol.** 2000; p.194-200.

VIJAYARAGHAVAN, S.; AZADEH KARAMI, A.; SHAHIN AEINEHBAND, S. et al. Regulated extracellular choline acetyltransferase activity— the plausible missing link of the distant action of acetylcholine in the cholinergic anti-inflammatory pathway. **PlosOne**, 2013; p. 1-15.

WHITEHOUSE, P.J.; PRICE, D.L.; STRUBLE, R. G et al. Alzheimer's disease and senile dementia: Loss of neurons in the basal forebrain. **Science**, 1982; p.1215-1237.

WILCOCK, GK; ESIRI, MM; BOWEN, DM et al. Alzheimer's disease. correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities. **Journal Neurology Science**, 1982; p.407-417.

ANEXOS

ANEXO 1 – AVALIAÇÃO CLÍNICA DE DEMÊNCIA (CDR).....	91
ANEXO 2 – TESTE DE RASTREIO: MINI EXAME DO ESTADO MENTAL (MEEM).....	92
ANEXO 3 – TESTE DE RASTREIO: ESCALA DE DEPRESSÃO GERIÁTRICA (GDS-15).....	93
ANEXO 4 – TESTE DE RASTREIO: ATIVIDADES INSTRUMENTAIS DE VIDA DIÁRIA (PFEFFER).....	94
ANEXO 5 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO.....	95
ANEXO 6 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	97
ANEXO 7 – PROTOCOLO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA E MENSURAÇÃO PROTEICA DA ChAT.....	98
ANEXO 8 – PROTOCOLO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BChE.....	101

Demência	Nenhuma CDR 0	Questionável CDR 0,5	Leve CDR 1	Moderada CDR 2	Grave CDR 3
Memória	Sem perda da memória; esquecimento inconstante	Esquecimento leve consistente, relembra parcialmente eventos. "Esquecimento Benigno".	Perda moderada da memória, mais acentuada para eventos recentes. Interferência nas atividades da vida diária.	Perda grave da memória; com retenção apenas de dados fortemente consolidados, novos dados são rapidamente perdidos.	Perda grave da memória; apenas fragmentos permanecem.
Orientação	Orientação plena.	Orientação plena, exceto dificuldade branda com datas.	Dificuldade moderada com datas, orientado quanto ao "espaço" onde se realiza o exame; pode apresentar desorientação geográfica.	Dificuldade grave com datas; desorientação usual quanto ao tempo. Permanece quanto ao espaço.	Orientação apenas em relação a pessoas.
Julgamento e resolução de problemas	Resolve problemas do dia-a-dia, incluindo atividades comerciais e financeiras; capacidade de julgamento adequado quando comparada ao desempenho anterior.	Incapacidade leve para resolver problemas, identificar similaridades e diferenças.	Dificuldade moderada no manejo de problemas, identificação de similaridades e diferenças. Julgamento social usualmente preservado.	Enorme incapacidade para manejar problemas, similaridades e diferenças. Julgamento social comprometido.	Incapaz de fazer julgamentos ou resolver problemas.
Assuntos Comunitários	Funcionalmente independente ao nível usual de trabalho, compras, atividades voluntárias e grupos sociais.	Leve incapacidade nestas atividades.	Incapaz de funcionar independentemente nestas atividades, ainda que possa se engajar em algumas. Parece normal quando casualmente inspecionado.	Sem pretensão de manter funções independentes fora do domicílio. Parece suficientemente bem para ser levado a atividades fora do domicílio.	Parece muito doente para ser levado para fora do domicílio.
Atividades domésticas e passatempo	Vida doméstica, passatempo e interesse intelectual bem mantidos	Vida doméstica, passatempo e interesse intelectual levemente comprometidos.	Incapacidade leve, porém definitiva, para atividades do lar. Abandono de atividades mais difíceis e passatempos complicados. Outros interesses abandonados.	Somente as ações simples estão preservadas; interesse restrito.	Ausência de atividades significantes no domicílio.
Cuidado Pessoal	Plenamente capaz de manter auto-cuidados.	Plenamente capaz de manter auto-cuidados.	Necessita de "incentivo".	Requer assistência no vestuário, higiene e manejo de itens pessoais.	Requer muita ajuda no cuidado pessoal; incontinência frequente.

MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL

(Folstein, Folstein & McHugh, 1.975)

Paciente: _____

Data da Avaliação: ____/____/____ Avaliador: _____

ORIENTAÇÃO

- Dia da semana (1 ponto)()
- Dia do mês (1 ponto)()
- Mês (1 ponto)()
- Ano (1 ponto)()
- Hora aproximada (1 ponto)()
- Local específico (apartamento ou setor) (1 ponto)()
- Instituição (residência, hospital, clínica) (1 ponto)()
- Bairro ou rua próxima (1 ponto)()
- Cidade (1 ponto)()
- Estado (1 ponto)()

MEMÓRIA IMEDIATA

- Fale 3 palavras não relacionadas. Posteriormente pergunte ao paciente pelas 3 palavras. Dê 1 ponto para cada resposta correta()
Depois repita as palavras e certifique-se de que o paciente as aprendeu, pois mais adiante você irá perguntá-las novamente.

ATENÇÃO E CÁLCULO

- (100 - 7) sucessivos, 5 vezes sucessivamente (1 ponto para cada cálculo correto)()
(alternativamente, soletrar MUNDO de trás para frente)

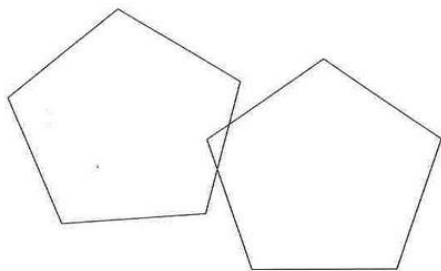
EVOCAÇÃO

- Pergunte pelas 3 palavras ditas anteriormente (1 ponto por palavra)()

LINGUAGEM

- Nomear um relógio e uma caneta (2 pontos)()
- Repetir "nem aqui, nem ali, nem lá" (1 ponto)()
- Comando: "pegue este papel com a mão direita dobre ao meio e coloque no chão (3 pts)()
- Ler e obedecer: "feche os olhos" (1 ponto)()
- Escrever uma frase (1 ponto)()
- Copiar um desenho (1 ponto)()

ESCORE: (____/30)



ESCALA GERIÁTRICA DE DEPRESSÃO (GDS-15 E GDS-5)

Paciente: _____ Data: _____

GD S-5	01. Você está satisfeito, de modo geral, com sua vida?	SIM	NÃO	GDS -15
	02. Você tem ficado aborrecido com frequência?	SIM	NÃO	
	03. Você se sente inútil do jeito que está hoje?	SIM	NÃO	
	04. Você prefere mais ficar em casa do que sair e fazer coisas novas?	SIM	NÃO	
	05. Você se sente sem esperança da situação atual em que se encontra?	SIM	NÃO	
	06. Você tem medo que alguma coisa de ruim lhe aconteça? (Sempre está a cabeça)	SIM	NÃO	
	07. Você se sente frequentemente desamparado?	SIM	NÃO	
	08. Você acha que é maravilhoso estar vivo agora?	SIM	NÃO	
	09. Você acha que sua vida está vazia?	SIM	NÃO	
	10. Você acha que a maioria das pessoas está melhor que você? (estado geral)	SIM	NÃO	
	11. Você acha que tem mais problemas de memória do que a maioria? (mesma idade)	SIM	NÃO	
	12. Você deixou muitos de seus interesses e atividades? (abriu mão nos últimos tempos)	SIM	NÃO	
	13. Você está de bom humor a maior parte do tempo?	SIM	NÃO	
	14. Você se sente cheio de energia?	SIM	NÃO	
	15. Você se sente feliz a maior parte do tempo?	SIM	NÃO	

Total: _____

Pontuação:

- Os escores inferiores a 05 são normais;
- Entre 05 e 10 indicam depressão leve a moderada;
- Escores maiores que 10 indicam depressão grave.

ATIVIDADES INSTRUMENTAIS DE VIDA DIÁRIA – PFEFFER

Paciente: _____ Data: _____

01. Ele(a) manuseia seu próprio dinheiro?	0 1 2 3
02. Ele(a) é capaz de comprar roupas, comida, coisas para a casa sozinho(a) ?	0 1 2 3
03. Ele(a) é capaz de esquentar a água para o café e apagar o fogo?	0 1 2 3
04. Ele(a) é capaz de preparar uma comida?	0 1 2 3
05. Ele(a) é capaz de manter-se em dia com as atualidades, com os acontecimentos da comunidade ou da vizinhança?	0 1 2 3
06. Ele(a) é capaz de prestar atenção, entender e discutir um programa de rádio ou televisão, um jornal ou uma revista?	0 1 2 3
07. Ele(a) é capaz de lembrar-se de compromissos, acontecimentos familiares, feriados?	0 1 2 3
08. Ele(a) é capaz de manusear seus próprios remédios?	0 1 2 3
09. Ele(a) é capaz de passear pela vizinhança e encontrar o caminho de volta pra casa?	0 1 2 3
10. Ele(a) pode ser deixado(a) em casa sozinho(a) de forma segura?	0 1 2 3

Total: _____/30

Pontuação:

- 0 - Normal, ou nunca fez, mas poderia fazê-lo agora;
- 1 - Faz com dificuldades, ou nunca o fez e agora teria dificuldade;
- 2 - Necessita de ajuda;
- 3 - Não é capaz.



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Eu ou responsável por.....
, autorizo a participação na
 pesquisa: "ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIANTES DE GENES COMO BCHE, APOE, SLITRK3,
 NEP E GENES DA FAMÍLIA MLR HUMANA E A DOENÇA DE ALZHEIMER". Concordo com o
 armazenamento e guarda do material genético e utilização deste material para pesquisas científicas
 futuras nos termos citados na Carta de Informação. Tenho pleno conhecimento dos procedimentos
 que serão submetidos conforme descritos anteriormente. Assino o presente termo, após ter lido a
 Carta de Informação, entendido e não ter mais nenhuma dúvida.

Curitiba, de de 2014

Ass.:

RG:

Data: Telefone:

.....

Controle idoso

D. A.

Nome:

Local de Nascimento:

Data de nascimento: Idade:

Cor: Descendência

Medicamentos em uso:

Fuma?

Consome álcool:

Doenças anteriores:

Doenças na família (genéticas ou senis):



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



Parentes com demência (qual):.....

Profissão:.....

Quando apareceram os primeiros sinais de demência:.....

Quais foram os sintomas:.....

.....

Mudanças de comportamentos/personalidade (quais).....

.....

Down na família?:.....

Exame clínico neurológico:.....

.....

Alimentação:.....

Sono:.....

Escolaridade.....

Responsável:.....

Resposta ao inibidor:

Horário tomou inibidor:

Efeito colateral ao inibidor:.....

Data da coleta de sangue:.....

OBS:.....

Peso:..... Altura:..... C.A:.....

Dados laboratoriais:

Responsáveis:

Prontuário N. _____

Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza

Msc. Dsiane Priscila Simão-Silva

Dr. Mauro Piovezan

Centro Politécnico - Jardim das Américas - Caixa Postal 19071 - CEP 81531-980 - Curitiba, Brasil
 tel/(+41) 33611587 / 33611684 - fax (+41) 33611793 - e-mail/ppg-gen@ufpr.br



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa



Curitiba, 30 de setembro de 2011.

Ilmo (a) Sr. (a)
Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Daiane Priscila Simão-Silva
Spencer Luiz M. Payão

Nesta

Prezados Pesquisadores,

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**Associação entre variantes dos genes BCHE, APOE, SLITRK3, NEP e genes da família MLR Humana e a doença de Alzheimer**” está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 31 de agosto de 2011 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 24 de setembro de 2011.

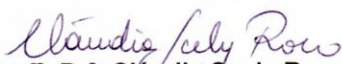
Registro **CEP/SD**: 1192.117.11.08

CAAE: 0137.0.091.000-11

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do 1º relatório parcial e/ou de conclusão: 1º/04/2012.

Atenciosamente


Prof.ª. Dr.ª. Cláudia Seely Rocco
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

PROCOLO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA E MENSURAÇÃO PROTEICA DA ChAT (TAHER DARREH-SHORI)

Mensuração da atividade de ChAT:

- 1) Coat the plate with coating buffer (CB, Carbonate buff pH 9.8) containing **Monoclonal Anti-human ChAT antibody (MAB 3447- 1:250_____μL Ab in mL CB)** dilution. Add **75μl/well** and Incubate ON at 4° C.
- 2) Wash the plate 1x 5min with TBS or PBS. (1...)
- 3) Take **40μl** of the original sample into a separate PCR tube/plate and denature it using the following procedure: Incubating the samples at 90°C in water bath for 10min (USE PCR instead).
95→ 20 sec. 99→8 min 30→ 20 sec. 3 cycles
Then put the samples back in ice for few minutes and centrifuge gently.
- 4) Apply **10μl/well** of native (original sample), denatured samples and standards as triplicates (Undiluted CSF or brain homogenate were used); Note: Use plasma (**F= 60→ 100X=> P1=0,6 μM**) for standards starting from S1= 100X in dilution buffer P1=0,6 μg/ml to P8= 0,005 μg/ml, the standards should be diluted in the dilution buffer containing, TBS; 0.1% EDTA and 0.05% Triton X-100 with pH 7.4 “**without BSA and NaN₃**”. Use **50μl/well** of choline standards starting from S1=50μM to S9=0.39, 2fold dilution in series in dilution buffer. (OBS: Don't apply MAB 3447 to Choline standards and its blank);
- 5) **Cocktail-A** (OBS! This table is for 1.25X (10μl samples +40μl cocktail A);
- 6) Incubate the plate with 40 μl/well of Cocktail A (to plasma standards and samples alone and not for choline standards) for 1hr at 38.5°C with shaking. (Note: The time should be taken into account right from plate incubation till addition of **cocktail B**.
- 7) Keep the plate back in ice and then centrifuge it.

- 8) Add **25µl** of Cocktail B to all wells and read the plate at 500nm for absorbance. (Kinetic ,shaking & abs, important to check the plates name on Magellan).
- 9) After the activity measurements, incubate the plate ON at 4°C.

Composition of cocktail- A:

C Stock	C master mix	Cf in the well	Volume/ml	Volume
Acetyl-CoA 10mM (<i>Mw</i> = 809.57 g/mol) <i>Must be fresh</i>	62.5 µM	50 µM	6.25 µl	µl
PTA (2507 U/ml)	1.25 U/ml	1 U/ml	0.50 µl	µl
AP (<i>Mw</i> = 184.06 g/mol)	8.75 mM	7 mM	2.72 mg	mg
Chl Cl 1 mM (<i>Mw</i> = 139.63 g/mol)	18,75 µM	10 µM (in 75µl/well)	18,75 µl	µl
Eserine 10 mM (<i>Mw</i> = 324.4 g/mol)	0.75 mM	0.6 mM	75 µl	µl
New Dilution Buffer	-----	-----	896.78 µl	µl
Total Volume			1000 µl	ml

Composition of cocktail- B:

OBS! This table is for 3X (50µl “samples & Coc. A” + 25µl cocktail B)

Stock conc (mM)	C in master mix	Final Conc.	Volume/ ml	Volume
Choline oxidase 50 U/ml	0.93 U/ml	0.31 U/ml	18.6 µl	µl
Streptavidin horseradish peroxidase 5000 u	1/5000	1/15000	0.2 µl	µl
Phenol <i>Mw</i> = 94.11 g/mol	6.3 mM	2.1 mM	0.6 mg	mg
4-Aminoantipyrine <i>Mw</i> =203.24 g/mol	3 mM	1.0 mM	0.6 mg	mg
1xPBS	-----	-----	981.2 µl	µl
Total Volume			1000 µl	µl

Mensuração da concentração proteica de ChAT:

- 10) Read the plate for EP at 500nm.
- 11) Wash the plate 3X with TBS-T ^{0.05%}. (1...2...3...)

- 12) Block the plate with 100 μ l/well TBS-T^{0.05%} with 5% BSA and 0.01%NaN₃ for 30min at 38°C with shaking.
- 13) Wash the plate 3X with TBS-T^{0.05%}. (1...2...3...)
- 14) Incubate with **50 μ l/well**, 1:1750 dilution of Anti – ChAT rabbit polyclonal antibody (**Anti ChAT PAB 14536**, Abnova) (**PAB 14536**- 1:1750___ μ L Ab in mL TBS-T^{0.05%}) in TBS-T^{0.05%} with **1% BSA** and 0.01%NaN₃ for **60min** at 38°C with shaking. (Azadeh LB2, page 21)
- OBS: PAB Ab +%50 Glycerol → Ab conc. =1/2, use 1/1750 instead of 1/3500 (Azadeh LB2, page 21)**
- 15) Add **25 μ l** of **Bovine anti-rabbit IgG AP** (sc 2376) diluted **1:2000 In total volume (75 μ l/well)** (**IgG AP 2376**- 1:2000___ μ L Ab in___mL TBS-T^{0.05%}) in TBS-T^{0.05%} with 5% BSA and 0.01%NaN₃ for 30min at 38°C with shaking.
- 16) Wash the plate 4X with TBS-T^{0.05%} and 1X with DEA buffer (DEA; 1.0 M Diethanolamine Buffer with 1 mM Magnesium Chloride, pH 9.8. sigma). (1...2...3...4...5...)
- 17) Incubate the plate at RT with the substrate solution **75/well** (P-Nitro phenyl –Na₂– 6H₂O, 3.7mg/ml of DEA buffer) and read the plates endpoint several times at 405nm for absorbance, read it until the absorbance of Plasma Standard 1 reaches around 2- 2,5.

PROTOCOLO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BChE POR ELISA-SANDUICHE (SIMÃO-SILVA, 2014)

1. **Coating of 3E8 Ab17246 (Mouse anti-BChE, monoclonal; abcam)** as capturing Ab (Dilution Factor, DF= 1/1000), by adding μ L inmL Coating buffer (CB, Carbonate buf, pH 9.5). (**Obs! If glycerol not added to stock Ab, it can be used as 1/2000**)

2. Add 75 μ L/well and incubate **ON at 4°C** (kl:.....- kl:.....)

3. Wash 3x5min with TBS (w1....., w2....., w3.....)

4. **Blocking** by adding 125 μ L/well of a 5%BSA–Coating buffer and Incubate at **RT for 1 hr** (kl:.....- kl:.....).

5. **Wash 3x5min** with TBS-T^{0.05%} (100 μ L/Well), (w1....., w2....., w3.....)

6. **Incubate with the Ag** (50 μ L/Well) i.e. the standards (S1-S8;: S1= pool plasma) and the diluted Plasma samples (400x in NDB) **~2 hrs at RT** (kl:.....- kl:.....).

7. **ADD MMB1** (25uL/well) and Read Kinetic the plate at 405 nm. The reading intervals should be 1min.

MMB1

	Stock conc	Conc in mix 3X	Volume
BTC	50mM; 15,87mg/mL	15mM	
DTNB	10mM; 3,96mg/mL	1.2mM	
BW	1mM	0,003mM	
Na K phosphate			
Total			

8. **Incubate ON at 4°C**

9. **Wash 3x5min** with TBS-T^{0.05%} (125 μ L/Well), (w1....., w2....., w3.....)

10. **Incubate with Ab82307 (Rabbit anti-BChE, polyclonal; abcam) 1/1000 in 0.5%BSA-TBS-T^{0.05%}) 75 μ L/well for 1 hr at RT** (kl:.....- kl:.....). (**Obs! We diluted the stock with glycerol for 1.5X (200 μ L Gly to 400 μ L Ab stock), thus if glycerol not added to stock Ab, it can be used at 1/1500 dilution)**)

11. **Wash 3x5min with TBS-T^{0.05%}** (w1....., w2....., w3.....)

12. **Incubation with Anti-Rabbit-AP (sc-2376)** dilute μ L of AP-Ab (DF= 1:1000) inmL **0.5% BSA-TBS-T_{0.05%}** buffer. Add 75 μ L/Well and incubate at **RT for 1 hr** or ON at 4 C (kl:.....-kl:.....).

13. **Wash 2x5min with TBS-T^{0.05%}** (w1....., w2.....) and 1x with Tris Buffer. w3.....).

14. **Substrate Incubation at RT** for hrs (kl.....- kl.....) **75 μ L/Wells:** Make a fresh solution by dissolvingmg of p-Nitrophenyl-Na₂-6H₂O (**10mM; Mw=371.12**) inmL **Tris Buffer** (15.76mg Tris in 500mL H₂O; 250 μ L of MgCl₂.6 H₂O (1M); 100 μ L of NaN₃ 20% pH 9.0) i.e. **3.7 mg/mL of Tris Buffer.**

15. **Read Kinetic the plate at 405 nm:** Then read the plate by **Endpoint** immediately.

16. **Wash 2x5min** with TBS-T^{0.05%} (100 μ L/Well), (w1....., w2.....), put in refrigerator ON.

17. **Wash 1x5min** with TBS-T_{0.05%} (100 μ L/Well)

18. **Incubate with MMA** (75 μ L/well) and Read Kinetic the plate at 405 nm. The reading intervals should be 1/2min.

MMB2

	Stock conc	Conc in mix 3X	Volume
BTC	50mM; 15,87mg/mL	5mM	
DTNB	10mM; 3,96mg/mL	0,4mM	
Na K phosphate			
Total			