

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NALINI DRIELI JOSVIAK

Avaliação da Atividade da Butirilcolinesterase associada às variantes *BCHE* K,  
*BCHE* -116A e *APOE4* em Demências não Alzheimer

CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NALINI DRIELI JOSVIAK

Avaliação da Atividade da Butirilcolinesterase associada às variantes *BCHE* K,  
*BCHE* -116A e *APOE4* em Demências não Alzheimer

Tese de Doutorado  
apresentado ao Programa de  
Pós Graduação em Genética  
da Universidade Federal do  
Paraná.

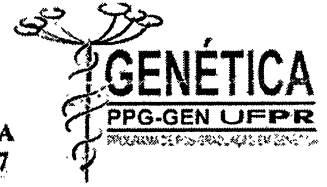
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Lupe  
Furtado-Alle

CURITIBA

2016



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA  
CENTRO POLITÉCNICO - JARDIM DAS AMÉRICAS - CAIXA  
POSTAL 19071 - CEP 81531-990 - CTBA, BRASIL 41 3361 1587  
PPG-GEN@UFPR.BR



### PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de NALINI DRIELI JOSVIK, intitulada: "Avaliação da Atividade da Butirilcolinesterase associada às variantes *BCHE K*, *BCHE -116A* e *APOE4* em Demências não Alzheimer", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

Curitiba, 17 de novembro de 2016

**Dr.<sup>a</sup> Lupe Furtado Alle**  
Dep. Genética/UFPR – presidente

**Dr.<sup>a</sup> Daiane Priscila Simão-Silva**  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

**Dr. Sergio Monteiro de Almeida**  
HC/UFPR

**Dr.<sup>a</sup> Luciane Viater Tureck**  
Pós-doutoranda/PPG-GEN/UFPR

**Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza**  
Dep. Genética/UFPR

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. DEMÊNCIA: DEFINIÇÃO.....	2
2.2. NEUROANATOMIA FUNCIONAL.....	3
2.3. DEMÊNCIA FRONTO TEMPORAL (DFT).....	4
2.4. DEMÊNCIA COM CORPOS DE LEWY (DCL).....	6
2.5. COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE (CCL).....	9
2.6. BUTIRILCOLINESTERASE HUMANA.....	10
2.7. APOLIPOPROTEÍNA ApoE.....	12
3. OBJETIVOS.....	14
3.1. GERAL.....	14
3.2. ESPECÍFICOS.....	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1. AMOSTRAS E ORGANIZAÇÃO DA PESQUISA.....	15
4.2. GENOTIPAGEM POR TAQ-MAN.....	16
4.3. MEDIDA DA ATIVIDADE DA BCHE.....	17
4.3.1. REAGENTES.....	17
4.3.2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA E LEITURA.....	17

4.4. ANÁLISE DOS DADOS.....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5.1. CAPÍTULO 1: REVIEW OF MEAN GENES AND PROTEINS ASSOCIATED WITH TAU-POSITIVE FRONTOTEMPORAL DEMENTIA.....	19
5.2. CAPÍTULO 2: PLASMA BUTYRYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN DEMENTIA WITH LEWY BODIES: A POSSIBLE MARKER FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS BETWEEN ALZHEIMER AND LEWY? .....	19
5.3. CAPÍTULO 3: HIGHER FREQUENCY OF THE APOE 4 ALLELE AND LOWER BUTYRYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN WOMEN WITH COGNITIVE IMPAIRMENT: POSSIBLE PROGNOSIS MARKERS FOR DEVELOPING ALZHEIMER'S DISEASE.....	19
6. REFERÊNCIAS .....	20
7. APÊNDICES.....	28

### ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - Subdivisão do córtex cerebral.....	4
FIGURA 2 - Gene humano da apolipoproteína E .....	13

## RESUMO

Demência ou Transtorno Neurocognitivo Maior, pode ser definido como uma síndrome caracterizada por declínio progressivo de uma ou mais funções cognitivas, de tal forma que possa interferir no desempenho social ou ocupacional diário do indivíduo. Um estágio pré demência denominado Comprometimento Cognitivo Leve não preenche os critérios para demência mas apresenta domínios cognitivos afetados não característicos do envelhecimento normal. A butirilcolinesterase (BChE), codificada pelo gene *BCHE*, é uma enzima que hidrolisa ésteres de colina, inclusive a acetilcolina. Dessa forma, variantes do gene *BCHE*, que podem afetar a atividade da BChE, são importantes na investigação de doenças com déficit colinérgico. O alelo e4 do gene *APOE* é considerado o maior fator de risco para a doença de Alzheimer (DA) esporádica e, considerando que 10-15% dos pacientes com Comprometimento Cognitivo Leve progridem para DA, torna-se importante a avaliação deste alelo em estados pré demência. O objetivo inicial desta tese foi avaliar a atividade da BChE, assim como as variantes *BCHE* K, *BCHE* -116A e *APOE* 4 em Demência com Corpos de Lewy, em Demência Frontotemporal e no Comprometimento Cognitivo Leve. Em virtude do reduzido número de pacientes com Demência Frontotemporal, estes foram excluídos das análises, sendo esta doença incluída no presente estudo por meio da publicação de uma revisão dos principais genes e proteínas associados a Demência Frontotemporal tau-positiva. Todos os pacientes e controles foram genotipados por ensaio de discriminação alélica Taq-Man e a atividade da BChE foi medida por espectrofotômetro de microplaca TECAN. Foi verificada uma atividade da BChE significativamente reduzida em pacientes com Demência com Corpos de Lewy quando comparados a Alzheimer e ao grupo Controle, independente das variantes K e -116A. Já para o Comprometimento Cognitivo Leve, verificamos uma atividade menor da BChE influenciada pela variante -116A em mulheres e uma frequência maior do alelo e4. Esses resultados reforçam a importância da Butirilcolinesterase em doenças que afetam a cognição, apontando um caminho para o uso da BChE e/ou suas variantes como marcadores de diagnóstico diferencial ou como marcadores prognósticos.

**Palavras-Chave:** Butirilcolinesterase, *BCHE* K, *BCHE* -116A, Comrometimento Cognitivo Leve, Demência com Corpos de Lewy.

## **ABSTRACT**

Dementia or Major Neurocognitive Disorder, can be defined as a syndrome characterized by progressive decline of one or more cognitive functions interfering with daily functioning. A pre-dementia stage called Mild Cognitive Impairment does not meet the criteria for dementia but has affected cognitive domains not characteristic of normal aging. Butyrylcholinesterase is an enzyme encoded by the *BChE* gene responsible for the hydrolysis of acetylcholine, thereby research of variants of this gene are important in diseases with cholinergic deficit. The *APOE* 4 allele is considered the greatest risk factor for sporadic Alzheimer's disease (AD), considering that 10-15% of patients with mild cognitive impairment progress to AD, it is important to evaluation of this allele in states pre dementia. The aim of this study was to evaluate the Butyrylcholinesterase activity, as well as *BCHE* K, *BCHE* -116A and *APOE*4 variants in Dementia with Lewy Bodies, Frontotemporal dementia and Mild Cognitive Impairment. Because of small number of patients with Frontotemporal Dementia, these were excluded from the analysis, and this disease included in this study through the publication of a review of the mean genes and proteins associated with tau-positive frontotemporal dementia. All patients and controls were genotyped for allelic discrimination assay Taq-Man and the BChE activity was measured by spectrophotometer microplate TECAN. We found lower plasma BChE activity in patients with Dementia with Lewy Bodies compared to elderly controls and to Alzheimer's disease independent of the presence of K or -116A variants. For Mild Cognitive Impairment, there was less BChE activity influenced by variant -116A and a higher frequency *APOE* e4 allele, both in women with MCI. These results reinforce the importance of butyrylcholinesterase and its relation to diseases that affect cognition and instigates further study for possible use of BChE activity as a prognosis or differential marker.

**Keywords:** Butyrylcholinesterase, *BCHE* K, -116A, Mild Cognitive Impairment, Dementia with Lewy Bodies.

## 1. INTRODUÇÃO

As demências podem ser classificadas em duas categorias: degenerativas e não degenerativas. As demências não degenerativas são decorrentes de acidentes vasculares (como a Demência Vascular), processos infecciosos, traumatismos, deficiências nutricionais, tumores, dentre outras patologias. Já as demências degenerativas têm origem predominantemente cortical como a Doença de Alzheimer (DA), Demência por Corpos de Lewy (DCL), Demência Frontotemporal (DFT) e um estado de pré-demência denominado de Comprometimento Cognitivo Leve (CCL). A Butirilcolinesterase (BChE) é uma enzima multifuncional que catalisa a hidrólise de ésteres de colina endógena, como a acetilcolina. A BChE também atua como um substituto da Acetilcolinesterase (AChE), mantendo e regulando a transmissão colinérgica quando esta enzima está ausente ou com sua atividade comprometida. No cérebro humano, a BChE é expressa em um número elevado de áreas neuronais de funções cognitivas, o que indica que a BChE pode ter um papel importante nas funções dos circuitos tálamo-corticais e, portanto, na cognição. Com o aumento da expectativa de vida, o envelhecimento populacional tornou-se fato, trazendo consigo uma maior prevalência de doenças crônico-degenerativas, acometendo parte da população pré-senil e senil de todo o mundo. Desse modo, é de extrema importância conhecer melhor essas patologias, no sentido de buscar novas formas de tratamento já que as demências não dispõem de uma terapêutica de cura. Sabe-se que o diagnóstico definitivo da maioria das síndromes demenciais depende do exame neuropatológico, por isso a importância de estudos com a biologia e genética molecular que fornecem novas perspectivas para o diagnóstico diferencial e precoce das demências. O alelo e4 do gene *APOE* é considerado o maior fator de risco para a doença de Alzheimer esporádica e ainda se estima que 10-15% dos pacientes com CCL progridem para DA, assim justifica-se a avaliação deste alelo no Comprometimento Cognitivo Leve a fim de averiguar sua possível participação como um alelo prognóstico. Variantes do gene *BCHE* tem sido associadas a alterações na atividade enzimática da Butirilcolinesterase. Sendo



esta enzima responsável pela hidrólise de acetilcolina, avaliar sua atividade se torna importante na Demência com Corpos de Lewy, na Demência Frontotemporal e no Comprometimento Cognitivo Leve, pois estas condições apresentam déficit colinérgico.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. DEMÊNCIA: DEFINIÇÃO**

Segundo o Manual Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais 5ª. Edição (DSM-V – Associação Americana de Psiquiatria, 2013) os critérios para o diagnóstico de Transtornos Neurocognitivos são baseados na evidência de declínio de uma ou mais áreas de domínio cognitivo relatado e documentado através de testes padronizados, causando prejuízo na independência do indivíduo para as suas atividades da vida diária.

O diagnóstico sintromico de demência está diretamente associado à avaliação cognitiva e funcional do indivíduo, com constatação da deterioração ou declínio cognitivo em relação à condição prévia do indivíduo (Abreu 2005). Para análise cognitiva global, o *Mini Mental State Examination* é o teste recomendado (Apêndice 1), tendo importante papel quanto ao rastreamento. Avaliações mais específicas das funções cognitivas podem ser obtidas mediante testes breves, de fácil e rápida aplicação pelo clínico, como os de memória (evocação tardia de listas de palavras ou de figuras, por exemplo), os de fluência verbal (número de animais listados em um minuto) e o desenho do relógio. Para avaliação funcional recomenda-se o questionário de *Pfeffer* (Apêndice 2). Um exame neurológico minucioso, aliado a exames laboratoriais e de neuroimagem, complementam a avaliação clínica inicial (Fornari 2010).

Exames laboratoriais realizados são geralmente os seguintes: hemograma completo; concentração sérica de ureia; creatinina; tirotoxina (T4) livre; hormônio tireoideo-estimulante (TSH); albumina; enzimas hepáticas (TGO, TGP, Gama- GT); vitamina B12 e cálcio; reações sorológicas para sífilis e HIV.

O exame LCR (líquor céfalo-raquidiano), a tomografia computadorizada (TC), ou preferencialmente a Ressonância Magnética (RM), deve ser realizada

com a finalidade de excluir outras possibilidades diagnósticas. O SPECT (Tomografia computadorizada por Emissão de Fóton Único) não é recomendado rotineiramente, mas pode auxiliar no diagnóstico de outras demências, em especial as de forma degenerativa, como Doença de Alzheimer, Demência Frontotemporal e Demência por corpos de Lewy (Radanovick 2015, Araújo 2010).

## **2.2. NEUROANATOMIA FUNCIONAL**

Para o estudo dos comprometimentos cognitivos julga-se importante um conhecimento básico anatômico e fisiológico do sistema nervoso central para uma melhor compreensão dos sintomas ocasionados pelo declínio cognitivo. O encéfalo consiste de grandes regiões, cada uma responsável por algumas das atividades vitais. Estas incluem o cerebelo, tronco encefálico, télencéfalo e diencéfalo, sendo este último o que constitui o sistema límbico, responsável pelas emoções e comportamentos sociais e ainda por abrigar o Hipocampo, responsável pela memória. (Engelhardt 2009). O córtex cerebral é a parte mais desenvolvida do cérebro humano e é constituído pelo télencéfalo, responsável pelos pensamentos, funções cognitivas, processos de percepção e a capacidade de produzir e entender a linguagem. O córtex cerebral pode ser dividido em áreas que têm função específica, por exemplo, existem áreas envolvidas nos processos de visão, audição, tato, movimentos e olfato. Outras áreas são responsáveis pelo pensamento e raciocínio. O córtex cerebral também pode ser subdividido em quatro principais setores ou lobos (Figura1): lobo frontal; parietal; temporal e occipital. Apesar de haver alguma sobreposição de funções entre os lobos, cada um é conhecido por uma ou duas funções específicas. O lobo frontal abriga a área motora (responsável pelas instruções nos movimentos), responsável pelo planejamento e execução dos atos motores voluntários. A área responsável pela produção da fala está localizada no giro frontal inferior, no hemisfério que é dominante para a linguagem (quase sempre o hemisfério esquerdo). As faculdades de planejamento, representação mental do mundo externo, comportamento emocional e personalidade também são atribuídas aos lobos frontais. O lobo

parietal está envolvido no processamento dos sinais que vêm das sensações. A informação visual oriunda do lobo occipital atinge o córtex parietal de associação e também o lobo frontal e ela auxilia na orientação visual dos movimentos voluntários. Lobos occipitais são especializados nos processos da visão. Os campos oculares occipitais afetam os movimentos dos olhos, controlando os movimentos convergentes, constrição e acomodação pupilares. Lobos temporais estão relacionados à memória, à audição, ao processamento e percepção de informações sonoras e à capacidade de entender a linguagem. Esse lobo também está relacionado ao processamento visual de ordem superior (Moore 2011, Berne 2000, Ackerman 1992).

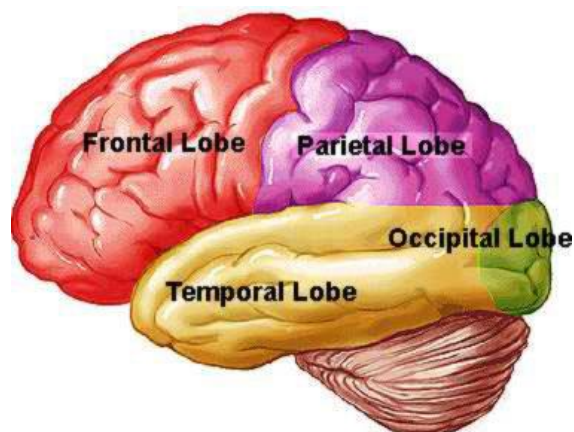


FIGURA 1 - Subdivisão do córtex cerebral. FONTE: <http://www.apppsychology.com>

### **2.3. DEMÊNCIA FRONTO TEMPORAL (DFT)**

A DFT é uma síndrome neuropsicológica marcada por disfunção dos lobos frontal e temporal (Araújo 2010, Neto 2005), geralmente associada a atrofia dessas estruturas e relativa preservação das regiões cerebrais posteriores (Fornari 2010). Clinicamente, manifesta-se relativamente cedo (por volta dos 57 anos ou menos) com igual incidência entre homens e mulheres, sendo rara depois dos 75 anos (Araújo 2010).

A DFT tem início insidioso e caráter progressivo, com um discreto comprometimento da memória episódica, mas com importantes alterações comportamentais, de personalidade e alterações na linguagem. As alterações comportamentais podem ser isolamento social, apatia, perda de crítica, desinibição, impulsividade, irritabilidade, inflexibilidade mental, sinais de hiperoralidade, descuido da higiene pessoal, sintomas depressivos, estereotipias motoras, exploração incontida de objetos no ambiente, distrabilidade (Josviak 2015, Araújo 2010).

O lobo pré-frontal pode dividir-se em três áreas diferentes: orbitobasal ou ventromedial; médio ou dorso-lateral. A lesão em cada uma das áreas provoca manifestações clínicas diferentes. Quando a DFT atinge área orbitobasal gera desinibição, condutas anti sociais, comportamentos estereotipados e hiperatividade sexual. Estes pacientes têm falhas específicas no início da doença, sobretudo na tomada de decisão, havendo uma demora para tomar decisões.

Se a disfunção predomina na região medial haverá apatia e a redução da fluência verbal será evidenciada quando houver lesões nas áreas dorso-laterais.

Assim, há três fenótipos clínicos distintos para a DFT. A forma de apresentação mais comum é a DFT comportamental (variante frontal), a qual se caracteriza por progressivas mudanças comportamentais e de personalidade que incluem comportamento social anormal, padrão de alimentação não usual e comportamentos ritualizados. Ao contrário da doença de Alzheimer, tais sintomas surgem precocemente, a despeito de testes cognitivos normais ou minimamente anormais ao início. A segunda variante da DFT manifesta-se sob a forma de uma afasia de fluência em estágios iniciais, havendo dificuldade para encontrar a palavra certa, porém a compreensão de seu significado encontra-se preservada. O comportamento e a interação social estão frequentemente inalterados até estágios tardios da doença, quando o paciente torna-se mudo, esta variante da DFT também pode ser chamada de Afasia Progressiva não Fluente. A terceira forma de apresentação é conhecida como variante temporal da DFT ou demência semântica. Caracteristicamente manifesta-se sob a forma de uma afasia progressiva, havendo dificuldade para

nomear objetos e compreender palavras (o que reflete a predominância de disfunção no lobo temporal esquerdo), além de reconhecer objetos e faces (refletindo uma disfunção temporal direita). Na demência semântica, as alterações comportamentais apresentam-se de forma muito semelhante as alterações da DFT variante frontal, em contrapartida, na afasia progressiva não fluente as alterações de comportamento quase sempre estão ausentes nos estágios iniciais da doença, podendo aparecer mais tardiamente (Josviak 2015, Fornari 2010, Neto 2005, Araújo 2010).

#### **2.4. DEMÊNCIA COM CORPOS DE LEWY (DCL)**

A demência com corpos de Lewy (DCL) acomete cerca de 20% dos pacientes com demência. Clinicamente, a DCL manifesta-se através de uma síndrome demencial gradualmente progressiva, onde ocorrem: 1) flutuações da função cognitiva em questão de minutos ou horas; 2) alucinações visuais vividas, persistentes e recorrentes; 3) parkinsonismo. Dentre as manifestações citadas, pelo menos duas devem ocorrer para haver o diagnóstico provável da DCL. A memória permanece preservada nas fases iniciais, sendo mais prejudicadas as habilidades visuo-espaciais, a atenção e a função executiva. Podem-se adicionar ao quadro clínico quedas de repetição, desmaios, sensibilidade, delírios, depressão e disfunções comportamentais do sono (Walker 2012, Zupancic 2011, Aarsland 2008, Rahkonen 2003, Tastsch 2002, Caramelli 2002, McKeith 2000).

A Demência por corpos de Lewy pode ser confundida á Parkinson, se os sinais de demência precedem o parkinsonismo em aproximadamente um ano, o DCL é o diagnóstico mais provável. Em contrapartida, caso o parkinsonismo preceda a síndrome demencial em mais de um ano, a doença de Parkinson passa a ser o foco das atenções (Fornari 2010; Araújo 2010, Neto 2005).

A DCL caracteriza-se por inclusões citoplasmáticas da proteína alfa-sinucleína (corpos de Lewy - CL), a qual se deposita em neurônios corticais e do tronco encefálico (Fornari 2010). Os corpos de Lewy consistem em agregados de determinadas proteínas, como proteínas neurofilamentares,

ubiquitina e, principalmente, alfa-sinucleína (Teixeira 2004). No entanto, podem ocorrer outros eventos patológicos relacionados à doença de Alzheimer, como as placas senis e uma menor extensão de emaranhados neurofibrilares (Araújo 2010).

DCL apresenta extenso déficit na neurotransmissão colinérgica. A atividade colinérgica neocortical desses pacientes é mais gravemente comprometida do que nos pacientes com DA, o que pode estar associado à presença das alucinações visuais e à gravidade global do déficit cognitivo. Medicamentos que aumentem a função colinérgica central parecem ser alternativas no tratamento desses pacientes (Perry 2009, Shimada 2009, Tatsch 2002).

Muitos casos de DCL apresentam alterações patológicas típicas de DA. Demonstrou-se que a quantidade de placas senis encontradas no neocórtex de pacientes com DCL se assemelha à encontrada em DA. Em comparação com pacientes com DA pura, os exames de imagem com ressonância magnética dos pacientes com DCL mostram formação hipocampal relativamente intacta (Forstl 1999). A presença de emaranhados neurofibrilares na região neocortical de pacientes com DCL é infrequente e largamente confinada ao lobo temporal. É uma das principais distinções entre DCL e DA. Dependendo do critério diagnóstico usado, os casos de DCL podem ser classificados como DA, se for considerado apenas as placas senis, ou não, se forem também incluídos os emaranhados (Tatsch 2002).

Caracteristicamente, a DCL é uma demência que, por definição, exige a presença de declínio cognitivo suficiente para interferir no funcionamento sócio-ocupacional do indivíduo, marcada pela presença de parkinsonismo espontâneo, alucinações visuais recorrentes e flutuação das funções cognitivas. Rigidez e bradicinesia são os sinais parkinsonianos mais freqüentes, sendo incomum a ocorrência de tremor de repouso, sobretudo nos pacientes mais idosos. Esses sinais estão presentes em 25 a 50% dos casos com DCL inicial, manifestando-se na grande maioria com a evolução da doença (McKeith 2000). As alucinações visuais tendem a ser complexas e detalhadas, envolvendo, por exemplo, figuras humanas ou objetos animados. Os pacientes com alucinações visuais tendem a apresentar maior quantidade de corpos de Lewy em estruturas temporais, como o giro parahipocampal e a

amígdala (Harding 2002). Postula-se também que as alucinações estejam associadas a déficits corticais mais significativos de acetilcolina, o que têm implicações terapêuticas na DCL (Teixeira 2004).

Em relação à flutuação cognitiva, podem-se observar episódios recorrentes de delirium, com interferência no estado de consciência e de atenção sem causa aparente. Esses episódios têm duração variável de horas a dias. Os déficits de atenção e visuo-espaciais tendem a ser bastante pronunciados, podendo haver relativa preservação da memória e da linguagem nos casos iniciais (Horimoto 2003).

Comparativamente a pacientes com DA, os pacientes com DCL têm melhor rendimento em tarefas de memória verbal e pior em tarefas de habilidades visuo-espaciais. No Mini Exame do Estado Mental, por exemplo, a incapacidade de copiar os pentágonos é mais sugestiva de DCL que DA (Ala 2001). Na DCL as alterações de memória são principalmente de evocação e menos de aquisição ou de consolidação como ocorre na DA, sugerindo comprometimento preferencial de vias subcorticais envolvendo os núcleos da base (Teixeira 2004). Assim, a DCL exhibe perfil misto de alterações neuropsicológicas corticais e subcorticais, o que reflete a natureza do processo patológico. Outros sinais que sugerem o diagnóstico de DCL incluem a grande sensibilidade ao uso de neurolépticos, podendo ocorrer quadros graves de parkinsonismo e mesmo síndrome neuroléptica maligna, e a ocorrência de quedas repetidas. Esta pode relacionar-se tanto à instabilidade postural, que acompanha o parkinsonismo, como à susceptibilidade a síncope e outras alterações autonômicas também presentes na DCL. Distúrbios do sono são também frequentes na DCL.

Em suma, duas das seguintes características centrais são necessárias para o diagnóstico de DCL provável e uma para o diagnóstico de DCL possível: a) cognição flutuante com oscilações marcantes da atenção e do estado de alerta; b) alucinações visuais recorrentes que são tipicamente bem formadas e detalhadas; c) sinais de parkinsonismo espontâneo (Teixeira 2004).

## 2.5. COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE (CCL)

No período de envelhecimento é normal que ocorram mudanças nos desempenhos cognitivos, porém, quando há um comprometimento cognitivo maior do que o esperado para a faixa etária e escolaridade do indivíduo, ainda sem comprometer o desenvolvimento de vida social diária do indivíduo, trata-se de um quadro de Comprometimento Cognitivo Leve (CCL). Pessoas com CCL podem permanecer estáveis ou voltar à normalidade ao longo do tempo, porém mais da metade progride para alguma forma de demência no período de cinco anos (Gauthier 2006, Rabelo 2009) e cerca de 10-15% progridem para Alzheimer em 1 ano enquanto que a taxa de progressão de indivíduos saudáveis para Alzheimer não passa de 2% ao ano (Radanovick 2015, Petersen 2001, Petersen 1999).

Estudos epidemiológicos para CCL são escassos, a prevalência geral na população idosa de 80-90 anos de idade varia de 15-20% e pode chegar a 40% após os 90 anos (Rabelo 2009, Lopez 2003), sendo a forma amnésica a mais prevalente (Petersen 2010). No Brasil, Chaves 2009 encontrou uma incidência de 13 indivíduos por 1000 idosos.

O CCL se caracteriza pela queixa de memória, corroborada por um familiar e pelo comprometimento da memória apresentado pelos testes neuropsicológicos de rastreio, como o MEEM (Mini Exame de Estado Mental – Apendice 1). A perda de memória episódica é maior que a esperada, mas não preenche os critérios aceitos para a demência (DSM-V). Embora ocorra comprometimento leve da função cognitiva, as atividades da vida diária permanecem intactas. Desse modo, o CCL é uma condição intermediária entre envelhecimento normal e a demência, sendo um fator de risco para o desenvolvimento da segunda.

As queixas de memória constantemente estão associadas ao declínio em outras funções cognitivas. Desse modo, é possível classificar o CCL em vários subtipos tais como o amnésico, de múltiplos domínios (linguagem, funções executivas, habilidades visuoespaciais com ou sem alteração da memória) e de um único domínio que não a memória. As etiologias podem ser variadas, sendo que o do subtipo amnésico, especialmente quando compromete outras funções



cognitivas, tem grande chance de evoluir para a doença de Alzheimer, enquanto que o subtipo sem alteração de memória tem maior chance de progredir para outros tipos de demência (Radanovick 2015, Winblad 2004, Petersen, 1999).

## 2.6. BURITILCOLINESTERASE HUMANA

A BChE é codificada pelo gene *BCHE* (3q26.1-q26.2) que é formado por quatro éxons, com 2.444 pb e três introns, com 62.115 pb. A proteína madura com 574 aminoácidos corresponde à tradução de 1.722 pb. O exon 1 (149 pb) contém sequências não traduzidas. O exon 2 contém 83% da sequência codificadora da proteína madura, incluindo a extremidade N-terminal e a serina do sítio ativo. O éxon 3 possui 167 pb. O exon 4 (604 pb) codifica para a extremidade C-terminal da proteína e apresenta a região 3' não traduzida que possui dois sinais de poliadenilação (Fonte: NCBI).

Mais de 65 variantes já foram descritas para o gene *BCHE* (Souza 2005). A variante *K* (A539T), resulta de um polimorfismo na posição 1699 (rs1803274; alelos, A/G) causada por uma mutação de ponto (exon 4) que substitui a alanina (GCA) por treonina (ACA) na posição 539, região C-terminal da BChE (Bartels 1992). A variante *K* foi associada a uma redução de cerca de 30% no número de moléculas circulantes que pode ser devida a menores níveis de síntese ou à sua degradação acelerada (Rubinstein 1978), pois a mutação dista do centro catalítico da enzima. Estudos mais recentes sugerem que não seria a variante *K* a responsável pela diminuição na atividade enzimática e sim outra variante que estaria em desequilíbrio de ligação, a variante -116 A (rs1126680), com frequência descrita para a população caucasiana entre 5,0-9,3% (Simão-Silva 2013, Furtado-Alle 2008, Sherry 2001).

A BChE é uma colinesterase (ChEs) sintetizada no fígado e amplamente distribuída em diferentes tecidos humanos, incluindo o sangue e o cérebro (Darvesh 1998, Dasvesh 2003, Wescoe 1947). Um ser humano adulto tem dez vezes mais BChE do que AChE nos tecidos e a maior quantidade aparece no

plasma e fígado (Manoharan 2007, Lockridge 2015), sendo a BChE a principal enzima de hidrólise de acetilcolina no plasma (Bono 2014, Lampón 2012).

Nos vertebrados as colinesterases são a butirilcolinesterase e a acetilcolinesterase (AChE). Estas enzimas compartilham 54,45% de identidade nucleotídica (Nunes 2007). Ambas apresentam inúmeras funções fisiológicas, dependendo da sua localização e tempo de expressão (Soreq 2001). Análises filogenéticas indicam que estas duas enzimas surgiram a partir de um precursor comum cuja função era de hidrolisar a acetilcolina. Portanto, os genes *ACHE* e *BCHE* surgiram por duplicação de genes após o surgimento de sistemas colinérgicos (Toutant 1989, Johnson 2012). Assim, *BCHE* parece ser um bom exemplo de um gene que tenha sobrevivido por sub funcionalização, pela proposta de que os dois genes dividem as funções do gene original (Johnson 2012).

A atividade da acetilcolina no cérebro é terminada pela ação hidrolítica das colinesterases (ChEs). Inibidores destas enzimas têm sido desenvolvidos para aumentar a atividade de neurônios colinérgicos sobreviventes em pacientes com DA (Lahiri 2003) e DCL. Cerca de 10-15% das células na amígdala e hipocampo são reguladas pela BChE independentemente da AChE (Darvesh 1998). Na Doença de Alzheimer ocorre redução da AChE em até 85% em regiões específicas do cérebro, enquanto os níveis de BChE aumentam de acordo com a progressão da doença (Perry 1978, Arendt 1992, Greig 2005, Bono 2014).

A BChE é uma enzima multifuncional. É conhecido que a BChE catalisa a hidrólise de ésteres de colina endógena como a acetilcolina, propionilcolina e preferencialmente a butirilcolina (Silver 1974), bem como o secretagogo do hormônio de crescimento, a grelina (De Vriese 2004). A BChE também atua como um substituto da AChE, mantendo e regulando a transmissão colinérgica quando esta enzima está ausente ou com sua atividade comprometida (Li 2000).

No cérebro humano, a BChE é expressa em quantidade elevada em áreas neuronais de funções cognitivas (Darvesh 1998, Darvesh 2003). O que indica que a BChE pode ter um papel importante nas funções dos circuitos tálamo-corticais e, portanto, na cognição (Steriade 1997, Manoharan 2006).

## 2.7. APOLIPOPROTEÍNA E – ApoE

A ApoE é uma glicoproteína polimórfica com importante papel na absorção, transporte e redistribuição de colesterol, que é necessário ao reparo e manutenção do tecido nervoso (Mahley 2000). É sintetizada em vários órgãos, principalmente no fígado, pelas células hepáticas parenquimatosas e no encéfalo pelos astrócitos, consistindo de uma das principais lipoproteínas do sistema nervoso central (Mahley 1988, Mahley 1984, Boyle 1985). ApoE atua como principal veículo no transporte de lipídios e colesterol no fluido cerebrospinal e intervém nos processos de regeneração do tecido nervoso, na regulação imunológica e na modulação do crescimento e diferenciação celular (Siest 1995, Mahley 2000).

Os neurônios possuem receptores para endocitose da ApoE e defeitos na ApoE ou em seus receptores podem provocar o acúmulo de lipoproteínas (Xu 1998). As funções de mediação, captação e redistribuição de colesterol dentro do SNC, realizados por intermédio da ApoE, são importantes para plasticidade cerebral. A plasticidade cerebral é a capacidade que o cérebro tem em se remodelar em função das experiências do sujeito, reformulando as suas conexões em função das necessidades e dos fatores do meio ambiente (Moestrup 1992, Rebeck 1993, Bu 1994).

O gene *APOE* possui três alelos comuns (e2, e3 e e4) e produz três isoformas protéicas que diferem somente em dois resíduos de aminoácido nas posições 112 e 158 (Weisgraber 1981), sendo apoE2 (Cys112, Cys158), apoE3 (Cys112, Arg158) e apoE4 (Arg112 Arg158) (Mahley 1995) (Figura 2). Outras variantes extremamente raras da *APOE* são a *APOEe1*, *APOEe5* e *APOEe7*.

O *APOEe3* é o alelo com maior frequência (70-80%) em comparação com 15-20% para *APOEe4* (Mahley 2006). Portadores do alelo *APOEe4* em homozigose tem um risco 10 vezes maior para manifestação da doença de Alzheimer (Corder 1993, Roses 1996), sendo este considerado o maior fator de risco para Alzheimer esporádico (Simao-Silva 2008, Vijayaghavan 2016). Cerca de 40-65% dos pacientes DA tem pelo menos uma cópia do *APOEe4* (Huang 2006).

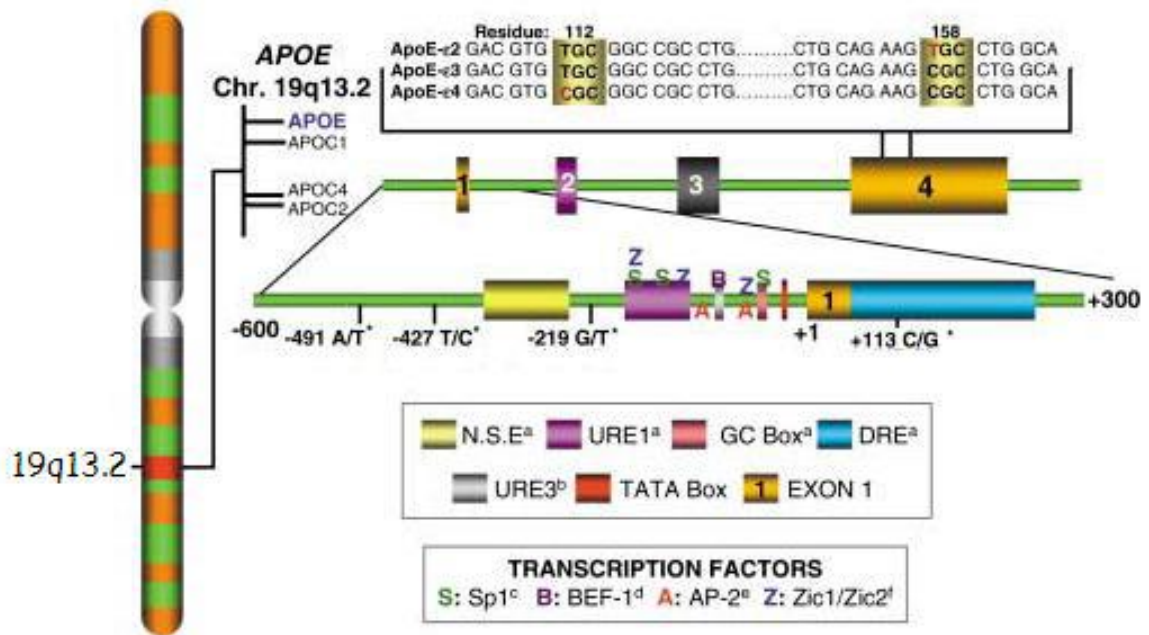


FIGURA 2 - Gene humano da apolipoproteína E. a e b: elementos regulatórios de transcrição; c à f: fatores de transcrição; \* localização dos polimorfismos do promotor. FONTE: Laws et al. (2003)

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. GERAL

Avaliar os polimorfismos *BCHE* K, -116A, *APOE4* e a atividade da BChE em pacientes com Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) e pacientes com Demência com corpos de Lewy (DCL).

#### 3.2. ESPECÍFICOS

- ✓ Genotipar as variantes K e -116A do gene *BCHE* em pacientes com CCL e DCL, comparar com grupo Controle e verificar se existe associação;
- ✓ Genotipar a variante e4 do gene *APOE* em pacientes com CCL e DCL, comparar com grupo Controle e verificar se existe associação;
- ✓ Medir a atividade da Butirilcolinesterase no soro de pacientes com CCL e DCL,
- ✓ Verificar o efeito dos polimorfismos na atividade da BChE para CCL e DCL
- ✓ Correlacionar a atividade da BChE com o Sexo.
- ✓ Comparar a média da atividade da BChE em DCL versus a média da atividade da BChE em Doença de Alzheimer.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. AMOSTRAS E ORGANIZAÇÃO DA PESQUISA**

As amostras de Demência com Corpos de Lewy, Comprometimento Cognitivo Leve e Doença de Alzheimer foram constituídas através da coleta de sangue de pacientes acompanhados pelo Ambulatório de Neurologia do Hospital das Clínicas de Curitiba e do Instituto de Neurologia de Curitiba (INC). Os pacientes eram diagnosticados segundo critérios utilizados na prática clínica por médicos neurologistas. Todos os indivíduos que aceitaram participar voluntariamente da pesquisa assinaram uma carta de consentimento aprovada pelo comitê de ética. Pacientes com história de má nutrição, doença hepática, câncer e obesidade foram excluídos do estudo. A amostra Controle foi composta por idosos cognitivamente normais, podendo ser os cuidadores dos próprios pacientes e/ou idosos atendidos pelo Centro Desportivo da UFPR, os critérios de exclusão foram: doenças do fígado, má nutrição, câncer, obesidade, história e ou resultados de exames sugestivos de doença psiquiátrica ou neurológica. Todos os indivíduos, casos e controles, foram submetidos a testes neuropsicológicos de rastreio como o Mini Exame de Estado Mental (MEEM) e Escala de Depressão Geriátrica (GDS).

Este trabalho foi um dos que iniciou a linha de pesquisa com demências pelo Laboratório de Polimorfismos e Ligação, sendo dividido em duas etapas:

- a) Dois anos (rotineiramente de segunda a sexta) de acompanhamento no Ambulatório de Neurologia do Hospital de Clínicas e no Instituto de Neurologia de Curitiba, incluindo as seguintes atividades: esclarecimento e convite para a pesquisa; preenchimento de uma ficha cadastral com os dados clínicos revelantes, como IMC, câncer, doenças do fígado, níveis de vitamina B12 e depressão; aplicação dos testes de rastreio e coleta do sangue. No mesmo dia as amostras eram processadas para a separação do plasma e a extração do DNA era realizada semanalmente. Os pacientes e controles recebiam um código e todos os dados das

fichas e testes de rastreio eram lançados em uma planilha de excel. Essas dados ainda eram transcritos em códigos (Ex. 1:sim; 2:não) para as análises estatísticas.

- b) Nos anos seguintes foram iniciadas as padronizações das técnicas de genotipagem e medida da atividade enzimática, um novo protocolo foi desenvolvido e adaptado para o uso do Espectrofotometro de microplaca TECAN até então nunca utilizado pelo laboratório. Após padronizações, as genotipagens e medida da atividade foram iniciadas. Nesse período verificou-se que a quantidade de amostras para a Demência Fronto Temporal (prevista para ser analisada no projeto) foi muito pequena (19), o que impossibilitou o estudo (levando-se ainda em consideração que esta demência se subdivide em 3 tipos distintos o N é ainda menor). Mediante este fato, foi realizada uma Revisão de Literatura sobre a Genética da Demencia Fronto Temporal, já publicada na Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia (Capitulo 1). Por fim, foram realizadas as análises estatísticas e dois manuscritos foram elaborados para publicação.

#### **4.2. GENOTIPAGEM POR TAQ-MAN**

O DNA total foi extraído a partir de amostras de sangue periférico por método de *Salting out* (Lahiri 1991) e diluído para uma concentração final de 20 ng / mL. As genotipagens para as variantes e4, K (rs1803274) e -116A (rs1126680) foram realizadas pelo aparelho ViiA 7 Real-Time PCR system da *Life technologies*, localizado no Laboratório de Oncogenética do Departamento de Genética da UFPR. As análises foram feitas com o software *ViiA 7 Real-Time PCR System*. Após o término de cada corrida, os valores dos picos de fluorescência para VIC e FAM foram anotados e transferidos para o *Microsoft Excel* onde serão gerados gráficos que possibilitem a genotipagem visual para cada amostra.

### 4.3. MEDIDA DA ATIVIDADE DA BCHE

O método foi desenvolvido por Dietz *et al.* (1972), modificado por Evans e Wroe (1978) e para esta tese adaptado para uso em um Espectrofotômetro de microplaca, TECAN.

#### 4.3.1. REAGENTES

O tampão fosfato 0,1 M utilizado na reação (pH 7,6) é preparado pela mistura de duas soluções “a” e “b” até a obtenção do pH adequado. A solução “a” contém 4,73 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>anidro (PM = 141,96) em 1000 mL de água destilada. A solução “b” contém 13,61 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>anidro (PM = 136,09) em 1000 mL de água destilada. O DTNB (ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico) (0,423 mM) é dissolvido em tampão fosfato na proporção de 167g por 1000 mL. O substrato (propioniltiocolina 100 mM) é preparado com 303 mg de iodeto de propioniltiocolina (PM = 303,2) em 10 mL de água destilada.

#### 4.3.2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA E LEITURA

75µL de plasma diluído (1/100 em água destilada), são adicionados a um tubo ependorf contendo 660µL de tampão-DTNB. Posteriormente, 245µL da mistura é adicionado em cada um dos pocinhos da microplaca. Coloca-se a Microplaca no Espectrofotômetro aquecido a 25°C por 15min, e em seguida adiciona-se 5µL do substrato em cada pocinho e inicia-se a leitura. A primeira leitura, chamada A0, deve ser efetuada imediatamente após a colocação dos reagentes. As leituras A1, A2 e A3 são efetuadas com um, dois e três minutos a partir da leitura A0. Após as quatro leituras, deve ser calculado o Δ/minuto (variação de absorbância por minuto). Para a obtenção da atividade (KU/L), Δ/minuto é multiplicado pelo fator de correção 93,6. Essa metodologia é baseada na hidrólise da propioniltiocolina pela BChE, produzindo ácido propiônico e tiocolina, a qual reage com o DTNB, gerando 5-tio-2-nitrobenzoato de coloração amarela.



#### **4.4. ANÁLISE DOS DADOS**

O teste do qui-quadrado foi utilizado para comparar as variáveis categóricas e calculado pelo software Clump (Clump 1995). O teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors foi utilizado para testar a normalidade de distribuição das variáveis. As comparações entre as médias foram realizadas pelo teste t (variáveis paramétricas) ou pelo teste de Mann-Whitney (variáveis não-paramétricas). A análise de regressão múltipla foi realizada para avaliar o efeito independente das variáveis sobre a atividade da BChE. O nível de significância de 5% foi adotado para todas as análises estatísticas realizadas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. **CAPÍTULO 1:** *Review of main genes and proteins associated with tau-positive frontotemporal dementia.*

5.2. **CAPÍTULO 2:** *Plasma Butyrylcholinesterase activity in Dementia with Lewy Bodies: a possible marker for differential diagnosis between Alzheimer and Lewy?*

5.3. **CAPÍTULO 3:** *Higher frequency of the APOE 4 allele and lower Butyrylcholinesterase activity in women with Cognitive Impairment: possible prognosis markers for developing Alzheimer's disease*

# Revisão dos principais genes e proteínas associadas à demência frontotemporal tau-positiva

*Review of main genes and proteins associated with tau-positive frontotemporal dementia*

ARTIGO DE REVISÃO / REVIEW ARTICLE

Nalini Drieli Josviak<sup>1</sup>  
Meire Silva Batistela<sup>1</sup>  
Daiane Priscila Simão-Silva<sup>1</sup>  
Gleyse Freire Bono<sup>1</sup>  
Lupe Furtado-Alle<sup>2</sup>  
Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza<sup>1</sup>

## Resumo

O objetivo desta revisão foi apresentar os genes *APOE* e *MAPT* e as proteínas *ApoE* e *tau* como marcadores genéticos que vêm sendo estudados na demência frontotemporal com inclusões tau-positivas, os quais poderão, futuramente, auxiliar no diagnóstico diferencial. A demência frontotemporal é um transtorno neurocognitivo marcado por disfunção dos lobos frontais e temporais, geralmente associada à atrofia dessas estruturas e relativa preservação das regiões cerebrais posteriores. Clinicamente, manifesta-se por volta dos 57 anos de idade, com igual incidência entre homens e mulheres. A demência frontotemporal tem início insidioso e caráter progressivo, com discreto comprometimento da memória episódica, mas com importantes alterações comportamentais, de personalidade e na linguagem. Devido às semelhanças possíveis entre as manifestações clínicas das demências (inclusive a doença de Alzheimer), há grande dificuldade no diagnóstico diferencial, sendo necessário um exame clínico e neuropsicológico detalhado do indivíduo acometido, além de exames bioquímicos e de neuroimagem. O gene *MAPT* codifica a proteína tau e sua função principal é estabilizar os microtúbulos. Em células nervosas saudáveis, a proteína tau é normalmente encontrada nos axônios, ao contrário dos achados descritos nos transtornos neurocognitivos, em que a proteína se encontra distribuída no corpo celular e nos dendritos. A apolipoproteína E (*ApoE*) é uma glicoproteína polimérfica, codificada pelo gene *APOE*, que tem importante papel na absorção, transporte e redistribuição de colesterol, necessário ao reparo e manutenção do tecido nervoso. Com o aumento da expectativa de vida e controle da natalidade, o envelhecimento populacional tornou-se fato, trazendo consigo maior prevalência de doenças crônico-degenerativas, de modo que é de extrema importância conhecer melhor essas doenças, no sentido de buscar novas formas de tratamento, visto que as demências não dispõem ainda de cura. Sabe-se que o diagnóstico definitivo da maioria das síndromes demenciais depende do exame neuropatológico, mas conclui-se que, com o avanço tecnológico, bem como técnicas de biologia e genética molecular, novas perspectivas têm surgido para o diagnóstico diferencial e precoce das demências.

**Palavras-chave:** Demência.  
Genética. Diagnóstico.  
Demência Frontotemporal.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Paraná. Departamento de Genética, Laboratório de Polimorfismos e Ligação, Setor de Ciências Biológicas. Curitiba, PR, Brasil.

## Abstract

This review aimed to present the *APOE* and *MAPT* gene and ApoE and tau proteins as genetic markers that have been studied in frontotemporal dementia, which may in future help in the differential diagnosis. Frontotemporal dementia is a neurocognitive disorder characterized by frontal and temporal lobes dysfunction, often associated with atrophy of these structures and relative preservation of posterior brain regions. Clinically, it manifests around 57 years-old, with same incidence in men and women. Frontotemporal dementia has an insidious and progressive onset, with a mild impairment of episodic memory, but with significant behavioral, personality and language changes. Due to possible similarities between the clinical manifestations of dementia (including Alzheimer's disease) there is a great difficulty in the differential diagnosis, which needs detailed clinical and neuropsychological examination of individuals affected, further biochemical and neuroimaging exams. *MAPT* gene encodes tau protein, its main function is to stabilize microtubules. In healthy nerve cells, tau protein is usually found in the axons, in contrast to the findings described in neurocognitive disorders in which protein is distributed in the cell body and dendrites. The apolipoprotein E (ApoE) is a polymorphic glycoprotein, encoded by the *APOE* gene, which plays an important role in absorption, transport and redistribution of cholesterol, necessary for the repair and maintenance of nervous tissue. Because of increasing life expectancy and birth control, population aging has become fact, bringing a higher prevalence of chronic diseases, so it is extremely important to know more about these diseases, in order to seek new ways of treating dementias seen that do not have a cure. It is known that the definitive diagnosis of most dementia depends on neuropathological examination, however, with technological advances and techniques of molecular biology and genetics, new opportunities have emerged for the early and differential diagnosis of dementias.

**Key words:** Dementia.  
Genetics. Diagnostic.  
Frontotemporal Dementia.

## INTRODUÇÃO

Demência ou transtorno neurocognitivo maior<sup>1</sup> se caracteriza pelo declínio progressivo em múltiplos domínios cognitivos, comprometendo as atividades sociais e ocupacionais do indivíduo acometido.<sup>2-4</sup> As demências podem ser classificadas em duas categorias: degenerativas e não degenerativas. As demências não degenerativas são decorrentes de outras condições patológicas, como os processos infecciosos, traumatismos, deficiências nutricionais, tumores, dentre outros. Já as demências degenerativas têm sua origem predominantemente cortical, como é o caso da demência frontotemporal (DFT).<sup>5-7</sup> A DFT tem início insidioso e caráter progressivo,

com discreto comprometimento da memória episódica, mas com importantes alterações comportamentais, de personalidade e alterações na linguagem.<sup>8</sup>

Há três fenótipos clínicos distintos para a DFT. A forma de apresentação mais comum é a DFT comportamental (variante frontal), a qual se caracteriza por progressivas mudanças comportamentais e de personalidade, que incluem comportamento social anormal, padrão de alimentação não usual e comportamentos ritualizados. Ao contrário da doença de Alzheimer, tais sintomas surgem precocemente, a despeito de testes cognitivos normais ou minimamente anormais ao início.

A segunda variante da DFT manifesta-se sob a forma de uma afasia de fluência em estágios iniciais, havendo dificuldade para encontrar a palavra certa, porém a compreensão de seu significado encontra-se preservada. O comportamento e a interação social estão frequentemente inalterados até estágios tardios da doença, quando o paciente torna-se mudo, esta variante da DFT também pode ser chamada de afasia progressiva não fluente (APNF).

A terceira forma de apresentação é conhecida como variante temporal da DFT ou demência semântica (DS); caracteristicamente manifesta-se sob a forma de uma afasia progressiva, havendo dificuldade para nomear objetos e compreender palavras (o que reflete a predominância de disfunção no lobo temporal esquerdo), além de reconhecer objetos e faces (refletindo uma disfunção temporal direita).

Na demência semântica, as alterações comportamentais apresentam-se de forma muito semelhante às alterações da DFT variante frontal; em contrapartida, na APNF as alterações de comportamento quase sempre estão ausentes nos estágios iniciais da doença, podendo aparecer mais tardiamente.<sup>5,8,9</sup>

Além dessas três formas mais comuns, há ainda um subtipo mais raro, a DFT associada à doença do neurônio motor (DFT-DNM).<sup>10</sup> Apesar dessas sintomatologias bem definidas para DFT, na prática clínica muitos transtornos neurocognitivos apresentam semelhanças ou sobreposição de sintomas, dificultando o diagnóstico clínico diferencial.

Nesse cenário, estudos genéticos tornam-se importantes para a descoberta de marcadores que auxiliem o diagnóstico diferencial entre as demências. Cerca de 30% a 50% dos pacientes com DFT comportamental apresentam história familiar positiva, enquanto que para os pacientes com os subtipos DS e APNF, a frequência de história familiar positiva é bem mais baixa.

Mutações nos genes *MAPT* e *PGRN* estão presentes em cerca de 50% dos casos familiares, porém outras mutações menos frequentes, aproximadamente 5% dos casos familiares, também já foram descritas para os genes *VCP*, *CHMP2B*, *TARDP* e *FUS*.<sup>11-16</sup> É importante lembrar que, patologicamente, as DFTs se dividem em tau-positivas e tau-negativas; nesta revisão consideram-se as DFTs tau-positivas, as quais incluem as mutações no gene *MAPT*.

Um dos primeiros genes candidatos em estudos genéticos para a demência frontotemporal (DFT) foi o gene *MAPT*, que codifica a proteína tau (*microtubule-associated protein tau*). Em 1994, estabeleceu-se pela primeira vez uma relação entre o cromossomo 17 e a DFT. Posteriormente, diversas mutações no gene *MAPT*, associadas à disfunção da proteína tau, foram relacionadas à neurodegeneração e, assim, se ampliou o espectro clínico das alterações neurológicas pelas mutações neste gene. A frequência das mutações no gene *MAPT* varia entre 0% e 17% quando não há caso familiar; porém, quando há história familiar, essa frequência aumenta de 7,6% a 50%.<sup>17,18</sup>

Um gene muito explorado em estudos com demências é o *APOE*, especialmente seus alelos e4 e e2. Em 1993, descobriu-se ser o alelo e4 um forte fator de risco genético para a doença de Alzheimer (DA).<sup>19</sup> Desde então, vários estudos confirmaram que a posse do alelo e4 aumentam o risco para DA.<sup>20,21</sup> No entanto, o uso de marcadores para esse gene em outras demências ainda permanece ineficaz.<sup>22</sup>

Estudos de associação entre o alelo e4 e DFT são inconclusivos e controversos. Alguns encontraram uma frequência maior deste alelo em pacientes com DFT do que em controles,<sup>21,23,24</sup> enquanto outros estudos demonstraram frequências equivalentes em ambos.<sup>25</sup>

Outro alelo do gene *APOE* (e2) também já foi descrito associado em alguns trabalhos liderados pelo grupo de pesquisa de Verpillat,<sup>26</sup>

que determinaram as frequências genótípicas do *APOE* em 94 pacientes, não relacionados, com DFT e 392 controles sem déficits cognitivos ou perturbações comportamentais, encontrando associação significativa para o genótipo  $\epsilon 2\epsilon 2$  e DFT. O resultado foi ainda mais significativo no grupo com história familiar positiva. Para a metanálise do polimorfismo do *APOE* na DFT, o mesmo grupo de pesquisa reuniu dez estudos caso-controle com o genótipo disponível ou informações alélicas (total de 364 pacientes e 2.671 controles), mas o genótipo  $\epsilon 2\epsilon 2$  não atingiu significância estatística.

Devido à heterogeneidade de diagnóstico, os pesquisadores analisaram, por um lado, os estudos com amostras neuropatologicamente confirmadas, e por outro, os estudos clínicos de amostras com diagnóstico provável, constatando, assim, aumento significativo na frequência de alelos  $\epsilon 2$  nos pacientes confirmados neuropatologicamente. Os autores concluíram que o *APOE* alelo  $\epsilon 2$  pode ser fator de risco para a DFT, mas que os dados devem ser interpretados com cautela, devido à raridade do genótipo  $\epsilon 2\epsilon 2$ .<sup>26</sup>

Muitos polimorfismos estão envolvidos diretamente com a neurotoxicidade, como por exemplo, mutações no gene da proteína precursora  $\beta$ -amiloide (*APP*), e/ou nos genes da presenilina (*PSEN1* e *PSEN2*). Mais de 28 mutações nesses genes já foram descritas como associadas à doença de Alzheimer, mas estes podem estar envolvidos no desenvolvimento de outras demências, exatamente pelo fato de alterações funcionais resultarem em toxicidade para o sistema nervoso.<sup>27-32</sup> No entanto, poucos estudos de associação desses genes com a DFT têm sido realizados.

Mutações no gene da progranulina (*PGRN*) foram identificados como uma das causas

principais da degeneração lobar frontotemporal, embora seus efeitos sobre a disfunção do tecido cerebral e danos ainda devam ser esclarecidos. Um estudo investigou o padrão de neuroimagem em pacientes com DFT, portadores e não portadores de mutação *Thr272fs* do gene *PGRN*, e foi encontrada atrofia frontotemporal na substância cinzenta em todos os pacientes com DFT (mais notavelmente naqueles portadores da mutação *PGRN Thr272fs*), mas não em portadores assintomáticos.<sup>32</sup>

O objetivo desta revisão foi apresentar os genes *APOE* e *MAPT* e suas proteínas *ApoE* e *tau* como marcadores genéticos que vêm sendo estudados na demência frontotemporal com inclusões tau-positivas, os quais poderão, futuramente, auxiliar no diagnóstico diferencial.

## METODOLOGIA

Foram realizadas buscas bibliográficas em 2013, sem limitação de data de publicação, nos seguintes bancos de dados: NCBI (PubMed), SciELO, LILACS, Bireme e Medline. Foram utilizadas as seguintes palavras-chave em português: demência frontotemporal, MAPT, ApoE, genes candidatos, proteína tau, apolipoproteína E; e em inglês: *frontotemporal dementia, candidate genes, ApoE, MAPT, tau protein*.

## REVISÃO DO TEMA

Muitos genes candidatos têm sido alvo de estudos em doenças neurodegenerativas (tabela 1). Assim, para compreender melhor os mecanismos envolvidos nessas doenças, é de essencial importância o conhecimento funcional dos genes e suas proteínas.

Tabela 1. Estudos de associação de variantes genéticas no desenvolvimento de demências. Brasil, 2013.

Gene	Proteína	Demência	Associação	Referência
<i>MAPT</i>	TAU	DFT/DA	Associado	Cordeiro et al. <sup>17</sup> Liadó et al. <sup>18</sup>
<i>ApoE (ε4)</i>	Apolipoproteína E	DFT/DA	Associado	Schneider et al. <sup>24</sup>
<i>ApoE (ε4)</i>	Apolipoproteína E	DFT	Não associado	Pickering-Brown et al. <sup>25</sup>
<i>ApoE (ε2)</i>	Apolipoproteína E	DFT	Associado	Verpillat et al. <sup>26</sup>
<i>APP</i>	Precursoraβ-amilóide	DA	Associado	Tanzi et al. <sup>28</sup>
<i>PSN1</i>	Presenilina 1	DA	Associado	Sherrington et al. <sup>30</sup> Tabaton et al. <sup>31</sup>
<i>PSN2</i>	Presenilina 2	DA	Associado	Sherrington et al. <sup>30</sup> Tabaton et al. <sup>31</sup>
<i>PGRN</i>	Progranulina	DFT	Associado	Borroni et al. <sup>32</sup>

DA= doença de Alzheimer; DFT= demência frontotemporal.

### Gene MAPT e proteína tau

A proteína tau faz parte da família das proteínas associadas aos microtúbulos (*microtubule-associated proteins* – MAPT). A principal função das MAPTs é estabilizar os microtúbulos pela agregação da tubulina. O gene *MAPT*, que codifica a proteína tau associada ao microtúbulo (*MAPT* - 17q21.1), possui 16 éxons e sua transcrição é complexa, dando origem a 12 cópias de RNAm por *splicing* alternativo e seis isoformas da proteína. Embora a proteína tau seja expressa em todo o sistema nervoso central do ser humano adulto, os transcritos do *MAPT* são diferencialmente expressos no sistema nervoso, dependendo do estágio de maturação neuronal e do tipo do neurônio.<sup>33-36</sup>

No cérebro humano, a tau é uma proteína solúvel que se apresenta em seis isoformas derivadas do *splicing* alternativo de RNAm<sup>37</sup> e compostas por 352-441 resíduos de aminoácidos. O *splicing* alternativo dos éxons 2, 3 e 10 resulta na presença de seis diferentes isoformas que contêm, respectivamente, nenhuma, uma ou duas inserções no segmento aminoterminal. O *splicing* alternativo do éxon 10 produz isoformas 4R ou 3R da tau, dependendo, respectivamente, da presença ou da ausência da sequência de aminoácidos codificada por ele. Em mamíferos, apenas as isoformas pequenas da tau são encontradas no cérebro fetal; essas isoformas não apresentam nenhuma inserção 3R na sua estrutura primária. Já no cérebro adulto, todas as isoformas da tau são expressas.<sup>38</sup>

A relação entre as isoformas 3R e 4R da tau é geralmente de 1:1, visto que alterações nessa razão estão relacionadas a certos mecanismos de neurodegeneração.<sup>39</sup> Ambas isoformas ocorrem nas DFTs, mas o predomínio da isoforma 4R é característico na degeneração corticobasal (DCB), na paralisia supranuclear progressiva (PSP) e na doença argirofílica granular.<sup>40</sup>

Em células nervosas saudáveis, a proteína tau é normalmente encontrada nos axônios, ao contrário dos achados descritos nos transtornos neurodegenerativos, em que a proteína se encontra distribuída no corpo celular e nos dendritos. A proteína tau pode ser encontrada na forma solúvel ou insolúvel; esta última é identificada nos filamentos helicoidais pareados (FHP), que são o principal componente dos emaranhados neurofibrilares. Estes são resultado da proteína tau alterada, sendo constituídos por isoformas diferentes em doenças neurodegenerativas diferentes, sugerindo que o *splicing* é de fundamental importância para o processo neuropatológico.<sup>35</sup>

Os filamentos helicoidais pareados (FHP) apresentam de seis a oito grupos fosfato por molécula de proteína tau, o que, em comparação com o grau de fosforilação usual da proteína tau em cérebros saudáveis (em torno de dois grupos fosfato por molécula), permite afirmar que a proteína tau identificada nos FHP encontra-se em estado hiperfosforilado.

A proteína tau controla a dinâmica dos microtúbulos durante a maturação e o crescimento dos neuritos. Sendo a maior proteína do citoesqueleto, a hiperfosforilação da tau afeta funções biológicas e morfológicas nos neurônios. A fosforilação da tau *in vitro* se dá pela ação de mais de dez quinases dirigidas aos seus sítios de serina e/ou tirosina. Essas quinases são divididas em dois grandes grupos de proteína: proteína quinase dirigida por prolina e proteína quinase

não dirigida por prolina. Nos tecidos cerebrais, o estado de fosforilação da tau resulta da ação conjunta de várias quinases e fosfatases, muitas das quais operam coordenadamente para regular sua fosforilação.<sup>38,39</sup>

A proteína tau também promove a interação entre a actina e os neurofilamentos, o que sugere inter-relação dos microtúbulos com outros componentes do citoesqueleto. A proteína tau interage com outras organelas citoplasmáticas, permitindo a ligação entre microtúbulos e mitocôndrias. Os domínios de projeção N-terminal da proteína tau permitem uma interação com a membrana plasmática neuronal.<sup>40,41</sup> A hiperfosforilação anormal da proteína tau pode ser o resultado do aumento da atividade das tauquinases, da subsensibilização das suas fosfatases ou de ambos os mecanismos. O estado de fosforilação da proteína tau é modificado dinamicamente ao longo do desenvolvimento. A tau fetal mantém-se usualmente hiperfosforilada, sendo essa característica atenuada à medida que ocorre a maturação do sistema nervoso central, com a progressiva ativação das fosfatases.<sup>38</sup>

Em humanos com transtornos degenerativos, a proteína tau está presente na forma de filamentos anormais insolúveis e hiperfosforilados.<sup>37</sup> Doenças neurodegenerativas com inclusões de neurofilamentos e/ou agregados de proteína tau são classificadas em quatro grupos: tauopatias, alfasinucleinopatias, doença poliglutâmica e doenças com ubiquitina. O grupo das tauopatias é o mais prevalente, incluindo a DA e a DFT. Todas essas doenças têm em comum a presença de grandes quantidades de agregados de proteína tau.<sup>42-44</sup> Nas DFTs, agregados de proteína tau estão presentes em, aproximadamente, 40% dos casos.<sup>45</sup> Portanto, o acúmulo intracelular da proteína tau hiperfosforilada em neurônios ou células gliais é um importante marcador biológico das tauopatias.



Vários estudos demonstraram que a hiperfosforilação reduz a capacidade de a tau estabilizar os microtúbulos. Isso compromete a dinâmica microtubular, afetando o transporte intraneuronal, resultando em efeitos deletérios sobre diversos processos celulares. Todos os defeitos na proteína tau alteram o transporte axonal, fatores vitais e necessários para a manutenção da homeostase neuronal. A regulação da dinâmica dos microtúbulos (estabilização e desestabilização) é essencial para a preservação da morfologia e da função da célula nervosa, da qual depende a manutenção da viabilidade celular.<sup>46-48</sup> A hiperfosforilação da tau favorece a formação de agregados, bloqueando o tráfego intracelular de proteínas neurotróficas e outras proteínas funcionais, resultando em perda ou declínio no transporte axonal ou dendrítico nos neurônios.

O aumento da expressão da tau também causa mudanças na morfologia celular, retarda o crescimento e provoca alterações importantes na distribuição de organelas transportadas por proteínas motoras dependentes de microtúbulos. A hiperfosforilação da tau presente no citosol durante estágios iniciais de degeneração neurofibrilar induz mudanças conformacionais que precedem sua agregação. Existem algumas controvérsias sobre a polimerização da tau e sua toxicidade, e estudos recentes mostram que essa agregação da tau é tóxica para as células, estando sua polimerização associada à perda da atividade biológica essencial para promover a estabilidade e coesão dos microtúbulos. No entanto, a defosforilação da tau hiperfosforilada e dos filamentos helicoidais pareados faz com que a proteína recupere suas atividades biológicas normais.<sup>38,49</sup>

Os casos de DFT com parkinsonismo ligado ao cromossomo 17 (FTDP-17) são caracterizados pela presença e inclusão de filamentos compostos por proteína tau hiperfosforilada.<sup>50</sup> Até o momento, mais de 30 mutações diferentes do

gene que codifica a proteína tau foram descritas em pacientes com DFTP-17.<sup>38</sup> Contudo, é importante lembrar que a frequência de mutações do gene codificador da proteína tau nos casos de DFT esporádica é baixa, apresentando frequências muito maiores em casos com história familiar positiva (cerca de 60%).<sup>51-54</sup>

#### Gene APOE e apolipoproteína E (ApoE)

O gene *APOE* contém quatro éxons, três introns e comprimento aproximado de 3,7 Kb.<sup>55,56</sup> Possui três alelos comuns (e2, e3 e e4) e produz três isoformas protéicas que diferem somente em dois resíduos de aminoácidos nas posições 112 e 158,<sup>57</sup> sendo *APOE2* caracterizado por Cys112 e Cys158; *APOE3* por Cys112 e Arg158 e *APOE4* por Arg112 e Arg158.<sup>58</sup> Outras variantes extremamente raras do *APOE* são a *APOE1*, *APOE5* e *APOE7*.

Em populações caucasóides, a frequência de *APOE2* é de 8%; *APOE3*, de 78%; e *APOE4*, 14%.<sup>59</sup> O alelo *APOE2* tem sido associado à proteção contra o desenvolvimento da DA,<sup>49</sup> enquanto o alelo *APOE4* em homozigose representa um risco dez vezes maior que os outros genótipos na manifestação da DA.<sup>28,60</sup> Os doentes expressando o alelo *APOE4* têm uma idade mais precoce de início e capacidade reduzida para a plasticidade sináptica.<sup>61</sup> Cerca de 40-65% dos pacientes com DA têm pelo menos uma cópia do *APOE4*.<sup>62</sup>

A transcrição do gene *APOE* resulta em um RNAm de 1163 pb.<sup>63</sup> E a tradução do RNAm produz uma forma isoproteica pré-*ApoE* de 317 aminoácidos. A forma isoproteica pré-*ApoE* é translocada através da membrana do retículo endoplasmático com processamento proteolítico e glicosilação, para gerar a proteína madura de 34,2 kDa, composta de 299 aminoácidos (apolipoproteína E).<sup>64</sup>

A apolipoproteína E (ApoE) é uma glicoproteína polimórfica com dois importantes domínios funcionais, o domínio N-terminal, que contém as principais regiões de ligação ao receptor, e o domínio C-terminal com a região de ligação lipídica, já associada à ligação da A $\beta$ .<sup>65,66</sup> A ApoE tem importante papel na absorção, transporte e redistribuição de colesterol, que é necessário ao reparo e manutenção do tecido nervoso.<sup>67</sup> É sintetizada em vários órgãos, principalmente no fígado, pelas células hepáticas parenquimatosas e no encéfalo pelos astrócitos, consistindo de uma das principais lipoproteínas do sistema nervoso central.<sup>68,69</sup> A ApoE atua como principal veículo no transporte de lipídios e colesterol no fluido cerebrospinal e intervém nos processos de regeneração do tecido nervoso, na regulação imunológica e na modulação do crescimento e diferenciação celular.<sup>67</sup>

Pesquisas detectaram também aumento da expressão de ApoE no córtex frontal e temporal e no hipocampo de pacientes com DA neuropatologicamente confirmada.<sup>70-72</sup> Assim, é possível que a expressão da ApoE também esteja alterada em pacientes diagnosticados com DFT.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os quadros demenciais em geral são resultados de uma rede biológica complexa; assim, o melhor entendimento da base genética em conjunto com os fatores ambientais, tais como escolaridade, nutrição e estilo de vida é o caminho para um diagnóstico mais confiável e diferenciado entre as demências. No caso da demência frontotemporal, esses conhecimentos resultarão não só em um diagnóstico mais preciso, como também no desenvolvimento de drogas eficazes, já que a mesma ainda não possui uma cura.

## REFERÊNCIAS

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5th ed. Arlington: American Psychiatric Association; 2013.
2. Frota NAF, Nitrini R, Damasceno BP, Forlenza O, Dias-Tosta E, Da Silva AB, et al. Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer. *Dement Neuropsychol* 2011;5(Suppl 1): 5-10.
3. Neto JG, Tamelini MG, Forlenza OV. The Differential Diagnosis of Dementia. *Rev Psiquiatr Clín* 2005;32(3):119-30.
4. Knopman DS, Dekosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N, et al. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidenced based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2001;56(9):1143-53.
5. Fornari LHT, Garcia LP, Hilbig A, Fernandez. The several faces of dementia syndrome: how to diagnose clinically? *Sci Med* 2010;20(2):185-83.
6. Gorzoni ML, Pires SL. Aspectos clínicos da demência senil em instituições asilares. *Rev Psiquiatr Clín* 2006;33(1):18-23.
7. Allegri RF, Harris P, Serrano C, Delavald N. Perfis diferenciais de perda de memória entre a demência frontotemporal e a do tipo Alzheimer. *Psicol Reflex Crit* 2001;142(2):317-24.
8. Araújo CLO, Nicoli JS. A bibliographic review of the mainly dementias which take on brazilian population. *Rev Kairós* 2010;13(1):231-44.
9. Gallucci NJ, Tamelini MG, Forlenza OV. Diagnóstico diferencial das demências. *Rev Psiquiatr Clín* 2005;32(3):119-30.
10. Seelaar H. Frontotemporal dementia: clinical, genetic, and pathological heterogeneity [tese]. Rotterdam: Erasmus Universiteit Rotterdam; 2011.
11. Seelaar H, Kamphorst W, Rosso SM, Armani A, Masdjedi R, De Koning I, et al. Distinct genetic forms of frontotemporal dementia. *Neurology* 2008;71(16):1220-6.
12. Chow TW, Miller BL, Hayashi VN, Geschwind DH. Inheritance of frontotemporal dementia. *Arch Neurol* 1999;56(7):817-22.

13. Goldman JS, Farmer JM, Wood EM, Johnson JK, Boxer A, Neuhaus J, et al. Comparison of family histories in FTLN subtypes and related tauopathies. *Neurology* 2005;65(11):1817-9.
14. Rosso SM, Donker Kaat L, Baks T, Joosse M, De Koning I, Pijnenburg y, et al. Frontotemporal dementia in The Netherlands: patient characteristics and prevalence estimates from a population-based study. *Brain* 2003;126(Pt 9):2016-22.
15. Stevens M, Van Duijn CM, Kamphorst W, De Knijff P, Heutink P, Van Gool WA, et al. Familial aggregation in frontotemporal dementia. *Neurology* 1998;50(6):1541-45.
16. Rohrer JD, Guerreiro R, Vandrovicova J, Uphill J, Reiman D, Beck J, et al. The heritability and genetics of frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 2009;73(18):1451-56.
17. Cordeiro Q, Zung S, Vallada H. Genetics of dementia. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo* 2008;53(1):24-30.
18. Liadó A, Gaig C, Molinuevo JL. Genética de las enfermedades neurodegenerativas más prevalentes. *Med Clin (Barc)* 2006;126(17): 662-70.
19. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993;261(5123):921-3.
20. Roses AD. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Ann Rev Med* 1996;(47):387-400.
21. Farrer LA, Abraham CR, Volicer L, Foley EJ, KowallNW, McKee AC, et al. Allele epsilon 4 of apolipoprotein E shows a dose effect on age at onset of pick disease. *Exp Neurol* 1995;136(2):162-70.
22. Minthon L, Hesse C, Sjögren M, Englund E, Gustafson L, Blennow K. The apolipoprotein E e4 allele frequency is normal in fronto temporal dementia but correlates with age at onset of disease. *Neurosci Lett* 1997;226(1):65-7.
23. Frisoni GB, Calabresi L, Geroldi C, Bianchetti A, D'Acquarica AL, Govoni S, et al. Apolipoprotein E ε4 allele in Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1994;5(5):240-2.
24. Schneider JA, Gearing M, Robbins RS, De T'Anne W, Mirra SS. Apolipoprotein E genotype in diverse neurodegenerative disorders. *Ann Neurol* 1995;38(1):131-5.
25. Pickering-Brown SM, Roberts D, Owen F, Neary D. Apolipoprotein E4 alleles and non-Alzheimer's disease forms of dementia. *Neurodegeneration* 1994;4:95-6.
26. Verpillat P, Camuzat A, Hannequin D, Thomas-Anterion C, Puel M, Belliard S, et al. Apolipoprotein E gene in frontotemporal dementia: an association study and meta-analysis. *Eur J Hum Genet* 2002;10(7):399-405.
27. Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, et al. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science*. 1992;258(5082):668-71.
28. Tanzi RE, Vaula G, Romano DM, Mortilla M, Huang TL, Tupler RG, et al. Assessment of amyloid beta-protein precursor gene mutations in a large set of familial and sporadic Alzheimer disease cases. *Am J Hum Genet* 1992;51(2):273-82.
29. Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 1995;376(6543):775-8.
30. Sherrington R, Froelich S, Sorbi S, Campion D, Chi H, Rogaeva A, et al. Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. *Hum Mol Genet* 1996;5(7):985-8.
31. Tabaton M, Tamagno E. The molecular link between beta- and gamma-secretase activity on the amyloid beta precursor protein. *Cell Mol Life Sci* 2007;64(17):2211-8.
32. Borroni B, Alberici A, Cercignani M, Premi E, Serra L, Cerini C, et al. Granulin mutation drives brain damage and reorganization from preclinical to symptomatic FTLN. *Neurobiol Aging* 2012;33(10):2506-20.
33. NCBI. National Center for Biotechnology Information [Internet]. Bethesda: NCBI: [1988?] acesso em 05 jun 2013. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
34. Trabzuni D, Wray S, Vandrovicova J, Ramasamy A, Walker R, Smith C, et al. *ML4PT* expression and *splicing* is differentially regulated by brain region: relation to genotype and implication for tauopathies. *Hum Mol Genet* 2012;21(18):4094-4103.
35. Kikkawa M, Ishikawa T, Nakata T, Wakabayashi T, Hirokawa N. Direct visualization of the microtubule lattice seam both in vitro and in vivo. *J Cell Biol* 1994;127(6 Pt 2):1965-71.

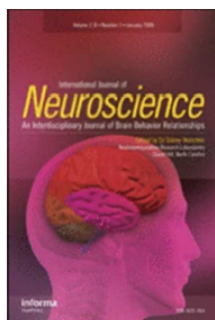
36. Goedert M. Tau protein and neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol* 2004;15(1):45-9.
37. Paula VJR, Guimarães FM, Forlenza OV. The role of TAU protein in the pathophysiology of frontotemporal dementia. *Rev Psiquiatr Clin* 6(5): 197-202.
38. Wang JZ, Liu F. Microtubule-associated tau protein in development, degeneration and protection of neurons. *Prog Neurobiol* 2008;85(2):148-75.
39. Knibb JA, Kipps CM, Hodges JR. Frontotemporal dementia review. *Curr Opin Neurol* 2006;19:565-71.
40. Brandt R, Hundelt M, Shahani N. Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models. *Biochim Biophys Acta*;1739(2-3):331-54.
41. Buée L, Bussièrre T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof Patric R. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev* 2000;33(1):95-130.
42. Robert M, Mathuranath PS. Tau and tauopathies. *Neurol India* 2007;55(1):11-6.
43. Hasegawa M. Biochemistry and molecular biology of Tauopathies. *Neuropathol* 2006;26(5):484-90.
44. Förstl H, Gratz S, Hahn U, Schwarz J, Jarniq M. Dementia with Lewy bodies and reduced dopamine transporter binding indicates significant acetylcholine deficiency. *Dtsch Med Wochenschr* 2008;133 Suppl 1:11-4.
45. Kertesz A, McMonagle P, Blair M, Davidson W, Muñoz DG. The evolution and pathology of frontotemporal dementia. *Brain*. 2005;128(9): 1996-2005.
46. Stoothoff WH, Johnson GV. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim Biophys Acta* 2005;1739(2-3):280-97.
47. Corbo CP, Alonso AC. Therapeutic targets in Alzheimer's disease and related tauopathies. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2011;98:47-83.
48. Jayapalan S, Natarajan J. The role of CDK5 and GSK3B kinases in hyperphosphorylation of microtubule associated protein tau (MAPT) in Alzheimer's disease. *Bioinformatics* 2013;9(20):1023-30.
49. Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8(9):663-72.
50. Weder ND, Aziz Rehan, Wilkins K, Tampi RR. Frontotemporal dementias: a review. *Ann Gen Psychiatry* 2007;6(15):1-10.
51. Sjögren M, Andersen C. Frontotemporal dementia: a brief review. *Mech Ageing Dev* 2006;127(2):180-7.
52. Taniguchi S, McDonagh AM, Pickering-Brown SM, Umeda Y, Iwatsubo T, Hasegawa M, et al. The neuropathology of frontotemporal lobar degeneration with respect to the cytological and biochemical characteristics of tau protein. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2004;30(1):1-18.
53. Sutherland GT, Nowak G, Halliday GM, Kril JJ. Tau isoform expression in frontotemporal dementia without tau deposition. *J Clin Neurosci* 2007;14(12):1182-5.
54. Chang PW, Tsui SK, Liew C, Lee CC, Wayne MM, Fung KP. Isolation, characterization, and chromosomal mapping of a novel cDNA clone encoding human selenium binding protein. *J Cell Biochem* 1997;64(2):217-24.
55. Paik YK, Chang DJ, Reardon CA, Davies GE, Mahley RW, Taylor JM. Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1985;82(10):3445-9.
56. Weisgraber KH, Rall SC Jr, Mahley RW. Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem* 1981;256(17):9077-83.
57. Mahley RW, Rall SC Jr. *The Metabolic and molecular basis of inherited disease*. 7th. New York: McGraw-Hill; 1995.
58. Martins RN, Clarnette R, Fisher C, Broe GA, Brooks WS, Montgomery P, et al. *ApoE* genotypes in Australia: roles in early and late onset Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Neuroreport* 1995;6(11):1513-6.
59. Laws SM, Hone E, Gandy S, Martins RN. Expanding the association between the *ApoE* gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for *ApoE* promoter polymorphisms and alterations in *ApoE* transcription. *J Neurochem* 2003;84(6):1215-36.
60. Lai MK, Tsang SWY, Garcia-Alloza M, Minger SL, Nicoll JAR, Esiri MM, et al. Selective effects of the *APOE* epsilon4 allele on presynaptic cholinergic markers in the neocortex of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2006;22(3):555-61.
61. Huang Y. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Neurology* 2006;66(1):79-85.
62. McLean JW, Elshourbagy NA, Chang DJ, Mahley RW, Taylor JM. Human apolipoprotein E RNA. cDNA cloning and nucleotide sequencing of a new variant. *J Biol Chem* 1984;259(10):6498-504.
63. Rall SC Jr, Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 198;257(8):4171-8

64. Phu MJ, Hawbecker SK, Narayanaswami V. Fluorescence resonance energy transfer analysis of apolipoprotein E C-terminal domain and amyloid beta peptide (1-42) interaction. *J Neurosci Res* 2005;80(6):877-86.
65. Tamamizu-Kato S, Cohen JK, Drake CB, Kosaraju MG, Drury J, Narayanaswami V. Interaction with amyloid beta peptide compromises the lipid binding function of apolipoprotein E. *Biochemistry* 2008;47(18):5225-34.
66. Mahley RW, Rall SC Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000;1:507-37.
67. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988;240(4852):622-30.
68. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 1984;25(12):1277-94.
69. Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, Mahley RW. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest* 1985;76(4):1501-13.
70. Yamada T, Kondo A, Takamatsu J, Tateishi J, Goto I. Apolipoprotein E mRNA in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1995;(129):56-61.
71. Yamagata K, Urakami K, Ikeda K, Ji Y, Adachi Y, Arai H, et al. High expression of apolipoprotein E mRNA in the brains with sporadic Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2001;12(2):57-62.
72. Zarow C, Victoroff J. Increased apolipoprotein E mRNA in the hippocampus in Alzheimer disease and in rats after entorhinal cortex lesioning. *Exp Neurol* 1998;149(1):79-86.

Recebido: 14/8/2013

Revisado: 07/4/2014

Aprovado: 03/7/2014



**Plasma Butyrylcholinesterase activity in Dementia with  
Lewy Bodies: a possible marker for differential diagnosis  
between Alzheimer and Lewy?**

Journal:	<i>The International Journal of Neuroscience</i>
Manuscript ID	GNES-2016-0571
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	17-Aug-2016
Complete List of Authors:	Josviak, Nalini; Universidade Federal do Parana, Genetics Batistela, Meire; Universidade Federal do Parana, Genetics Wegner, Nicoli; Universidade Federal do Parana, Genetics Sulzbach, Carla; Universidade Federal do Parana, Genetics Bono, Gleyse; Universidade Federal do Parana, Genetics Simão-Silva, Daiane; Universidade Federal do Parana, Genetics Souza, Ricardo; Curitiba Neurology Institute Piovezan, Mauro; Clinical Hospital of the University of Paraná Souza, Ricardo; Universidade Federal do Parana, Genetics Furtado-Alle, Lupe; Universidade Federal do Parana, Genetics
Keywords:	Butyrylcholinesterase, BCHE K, -116A, Dementia with Lewy Bodies, Alzheimer's disease

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Plasma Butyrylcholinesterase activity in Dementia with Lewy Bodies: a possible marker for differential diagnosis between Alzheimer and Lewy?**

Josviak ND<sup>1</sup>, Batistela MS<sup>1</sup>, Wegner NR<sup>1</sup>, Sulzbach CD<sup>1</sup>, Bono GF<sup>1</sup>, Simão-Silva DP<sup>1</sup>, Souza RKM<sup>2</sup>, Piovezan MR<sup>3</sup>, Souza RLR<sup>1</sup>, Furtado-Alle L<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

<sup>2</sup>Curitiba Neurology Institute, Curitiba, Brazil

<sup>3</sup>Clinical Hospital of the Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

Author for correspondence:

PhD. Nalini D. Josviak - Email: drinaly@gmail.com

Department of Genetics, Federal University of Paraná - UFPR, Rua Cel. Heraclitus Francisco dos Santos, 210, Jardim das Americas - Curitiba - PR, 81531-970, Brazil.

## Abstract

Butyrylcholinesterase (BChE) is an enzyme encoded by *BCHE* gene, responsible for catalyzing the hydrolysis of acetylcholine. K and -116A *BCHE* variants were associated with decrease in plasma BChE activity, and their influence has been investigated in diseases with a cholinergic deficit such as Alzheimer's disease (AD) and Dementia with Lewy Bodies (DLB). In order to check the influence of *BCHE* genetic variants on enzymatic activity, all patients and controls were genotyped for K and -116A variants. We found lower plasma BChE activity in DLB patients compared to elderly controls and to Alzheimer's disease independent of the presence of K or -116A variants. Our results suggest that the reduction of total plasma BChE activity is probably associated with a feedback mechanism and provides a future perspective of using this enzyme as a possible plasmatic marker for differential diagnosis between AD and Lewy.

**Keywords:** Butyrylcholinesterase, *BCHE* K, -116A, Dementia with Lewy Bodies, Alzheimer's disease.

## 1. Introduction

Dementia with Lewy Bodies (DLB) is a neurodegenerative disease that affects cognition, behavior and motor function. It is considered the third most common cause of dementias [1-5] characterized by cognitive fluctuations, recurrent visual hallucinations and parkinsonism [6,7]. DLB has extensive deficit in cholinergic neurotransmission, and the cholinergic activity in these patients is more severely impaired than in patients with Alzheimer's disease (AD) [8-10]. Studies show that the cholinergic deficit in Lewy also affects subcortical areas as the black substance of the brain [10-13]. Furthermore, there is a similar pathologic (e.g. amyloid deposition) and neurochemical (e.g. cholinergic deficits) aspects between AD and Lewy body diseases [14] in this way the clinical and pathological phenotypes of DLB and AD often overlap [15].

Human Butyrylcholinesterase, encoded by *BCHE* gene (3q26.1-q26.2), is the secondary acetylcholine (ACh) hydrolyzing enzyme in the central and peripheral nervous systems [8, 16-19]. BChE belongs to the family of Cholinesterases (ChE), sharing functions with another enzyme of the same family, the Acetylcholinesterase (AChE). Phylogenetic analysis of BChE and AChE expression indicates that these two enzymes have emerged from a common precursor whose function was to



1  
2  
3  
4 hydrolyze acetylcholine. Therefore, the *ACHE* and *BCHE* genes arose by gene duplication after the  
5 emergence of cholinergic systems [20-23]. Thus, *BCHE* appears to be a good example of a gene that  
6 has survived by sub functionalization, the proposal in which two genes, original and duplicate, split the  
7 functions of the original gene between them [24]. BChE is synthesized in the liver and widely  
8 distributed in different human tissues, including blood and brain. [25-27]. An adult human has ten  
9 times more BChE than AChE in tissues and highest amount appears in plasma and liver [28-29], and  
10 thus BChE is the major ACh hydrolyzing enzyme in plasma [8, 30].  
11

12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Some conditions may alter BChE activity in the plasma or in the brain, for example, pregnant women, people with liver disease, poor nutrition and cancer, all reduce activity of the enzyme [29,31]. On the other hand, BChE activity is increased in elderly brain (60–90 years) [32] and in AD patients' brain, mainly in the hippocampus and temporal cortex [8, 33-34]. Increase of BChE is also verified in plasma of obese individuals. In addition, *BCHE* variants may also influence the enzyme activity [29,34-36].

K variant (rs1803274, A539T) is the most common polymorphism found in the coding region of *BCHE* gene and has been associated with Alzheimer disease (AD), especially in combination with Apolipoprotein E4 (ApoE4), the greatest risk factor associated with sporadic Alzheimer disease [8,34,37]. This variant was first described in 1978 when its presence was associated with decrease in 30% in BChE activity in serum [35]. Afterwards, studies with AD and other diseases, as diabetes and obesity, showed that K variant alone is not associated with decreased BChE activity, being the 5' UTR -116A variant necessary for this decrease [34,36]. This variant is present in the non-coding exon 1 of *BCHE* at -116 nt (rs1126680), being -116A preferentially found in cis with the K variant [19] with described frequency for Caucasian population among 5.0–9.3% [36,38].

Despite similar pathologic and neurochemical aspects between AD and DLB diseases and knowing that the cholinergic activity in patients with DLB is more severely impaired than in patients with AD, scarce data is obtainable about *BCHE* genotypes and BChE activity in DLB. The aim of this study was to compare the plasma BChE activity between DLB and AD patients and control group, verifying if its activity is associated with the *BCHE* K and -116A variants.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. DLB samples and Controls

Samples of 18 DLB patients (mean age  $74.5 \pm 8.52$ ), 9 women and 9 men, were obtained from Specialized Centers of Dementia, with age and sex matched with 38 healthy elderly controls (mean age  $71.7 \pm 8.85$ ), 21 women and 17 men. The DLB patients were diagnosed as probable and possible according to the Third Consortium Dementia with Lewy Bodies [39] and only probable DLB were selected. We selected patients that were using only Donepezil as cholinergic inhibitor (inhibits only acetylcholinesterase), patients with a history of poor nutrition, liver disease and cancer have been excluded of this study. The control group was submitted to a clinical exam and exclusion criteria were: liver disease, poor nutrition, cancer, history and/or examination findings suggestive of psychiatric disease (depression and substance abuse, including alcohol) or neurological (brain trauma with loss of consciousness longer than 15 min, seizure, stroke, Parkinson's disease) and evidence of functional decline as shown by a structured questionnaire. All individuals gave informed consent for participation in this study that was approved by the Institutional Ethics Committee (Protocol number 1192.117.1108).

### 2.2. DA samples

Samples of 66 AD patients (mean age  $72.2 \pm 9.54$ ), 42 women and 24 men, were obtained from Specialized Centers of Dementia. The AD patients were diagnosed according to the NIA-AA (National Institute on Aging and Alzheimer's Association) criteria for probable AD [40]. We selected patients that were using only Donepezil as cholinergic inhibitor. Patients with a history of poor nutrition, liver disease and cancer have been excluded of this study.

### 2.3 DLB Genotyping

Total genomic DNA was extracted from peripheral blood samples by Salting-out method [41] and diluted to a final concentration of 20 ng/ $\mu$ L. Genotyping for K variant (rs1803274) and -116A (rs1126680) was performed with TaqMan genotyping assays (Applied Biosystems) and allele frequencies were obtained by counting the alleles from the observed genotypes [34].

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

#### 2.4 BChE Activity

The BChE activity was assessed using *Dietz* (1978) method [42] adapted for use in a microplate spectrophotometer TECAN® (Infinite 200 PRO), as follows: The DTNB (5,5'-bis(4-nitrophenyl)-2-thiobenzoylthioacetamide 0.423 mM) was dissolved in phosphate buffer at a ratio of 167g per 1000 ml. The substrate (Propionylthiocholine 100 mM) was prepared with 303 mg of iodide propionylthiocholine (MW = 303.2) in 10 mL of distilled water. 75µL of plasma diluted (1/100 in distilled water) were added to an Eppendorf tube containing 660µL of buffer DTNB. Thereafter, 245µL of the mixture was added to each well of the microplate. The microplate was placed in the spectrophotometer heated at 25 ° C for 15min, and then it was added 5µL of the substrate in each well of the microplate and only then the reading started. The first reading called A0, must be performed immediately after the placing of the reagents. A1, A2 and A3 readings are made after one, two and three minutes from the reading A0, respectively. After the four readings  $\Delta$  / minute (absorbance change per minute) must be calculated. To obtain the activity (KU / L),  $\Delta$  / minute was multiplied by the correction factor (93.6). This methodology is based on propionylthiocholine hydrolysis by BChE producing propionic acid and thiocholine, which reacts with the DTNB, producing 5-thio-2-nitrobenzoate.

#### 2.5. Statistical analysis

The chi-square test was used to compare categorical variables and calculated by Clump software [43]. Kolmogorov-Smirnov test was used to test for normality of variables distribution. The comparisons between means were performed by t-test (parametric variables) or by Mann-Whitney test (non-parametric variables). Multiple regression analysis was performed to evaluate the independent effect of the variables. A 5% level of significance was adopted for all the statistical analyses performed.

### 3. Results

We found that mean BChE activity was significantly lower in DLB patients compared to age-matched control group (Table 1). Frequencies for K and -116A were similar between DLB patients and controls (Fisher exact test for K:  $p= 0,79$ ; for -116A:  $p= 0,99$ ). The difference in activity levels was

1  
2  
3  
4  
5 observed independently of the individual's genotype, in other words, patients or controls carrying K or -  
6 116A variants showed no difference in BChE activity when compared with non carriers individuals  
7 (Table 2). Multiple regression analysis using BChE activity as dependent variable showed the DLB  
8 ( $p < 10^{-7}$ ) itself as influencing in the enzyme activity levels. Mean BChE activity was significantly lower  
9 in Lewy when compared to patients with Alzheimer disease (Table 3).

#### 14 15 16 4. Discussion:

17  
18 Participation of BChE in the acetylcholine hydrolysis has stimulated researchers to  
19 investigate its relationship with cholinergic deficit diseases as Alzheimer or DLB [29, 44-47]. Although  
20 *BCHE* genetic variants such as K and -116A had been associated with decreased enzyme activity [29,  
21 34, 36-37, 48], studies with *BCHE* variants and its activity levels have found conflicting results. Perry  
22 et. al. 2003 [10] found a highly significant association between BChE activity in the temporal cortex  
23 and cognitive decline rate in DLB cases. Researchers had found an increased frequency of  
24 homozygous to *BCHE* K variant in patients with DLB compared to controls [49]. Another study  
25 reported increased frequencies of *BCHE* K variant and *ApoE4* together in DLB patients compared to  
26 patients with dementia associated with Parkinson's Disease. Therefore, authors concluded that this  
27 genotype might be important in the onset and progression of DLB [50]. Other researches [37], like the  
28 present study, found no significant association between the K variant (with or without the *ApoE4* allele)  
29 and DLB.  
30  
31

32  
33 Although several studies show that BChE activity is influenced by *BCHE* K or -116A variants  
34 [34-36] we do not found this relationship, perhaps by the small sample.  
35  
36

37  
38 Studies about incidence of DLB are limited and variable according to each population, there  
39 are reports ranging from 10-35% of all dementias [1-5, 51]. Data collection for the present study,  
40 consisted in follow, for two years, the routine of a specialized center for the treatment of dementias in  
41 Southern Brazil, and our sample corresponds to 9.8% of all patient of dementias who started  
42 treatment during this period. The criteria used to select the samples of this study (absence of Liver  
43 diseases, poor nutrition, cancer and patients that using only Donepezil as cholinergic inhibitor)  
44 contributed to the small sample. Taking into account the small sample size, we cannot exclude the  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5 hypothesis that K variant can influence the BChE activity because we have seen a tendency for  
6 absolute values (Table 2) that could be proven statistically if studies with larger sample were made.  
7

8  
9 Multiple regression analysis results showed that DLB is the main factor that influences the  
10 BChE activity in the case-control study. A possible explanation for these results is the BChE kinetic  
11 response to concentrations of acetylcholine (ACh). It is known that BChE is less efficient in ACh  
12 hydrolysis at low concentrations but highly efficient at higher ones, a situation in which ACh becomes  
13 substrate inhibited [19]. Considering that DLB is characterized by a cholinergic neuron loss and a  
14 progressive decline in ACh levels, the peripheral higher BChE activity becomes unnecessary in this  
15 condition, remaining at lower levels by a feedback mechanism and not acting causally on cholinergic  
16 deficit. This feedback mechanism has been suggested by other study with Alzheimer's disease where  
17 patients also had a lower plasma BChE activity than controls [8].  
18  
19

20  
21 Despite the small sample size, plasma analysis was sufficient to identify a lower BChE  
22 activity in DLB compared to controls. The fact that BChE is the most abundant acetylcholine  
23 hydrolyzing enzyme in plasma [30] is important because analysis in plasma are easier, accessible and  
24 less invasive than in the cerebrospinal fluid or central nervous system.  
25  
26

27  
28 It was not possible to select patients who did not use any type of inhibitor because soon  
29 after diagnosis these patients initiated treatment with cholinergic inhibitors. We choose to select  
30 patients that were using only Donepezil which inhibits only AChE, not interfering in the acetylcholine  
31 hydrolysis by BChE.  
32  
33

34  
35 We compared mean BChE activity between patients with Lewy and patients with AD that  
36 were also using only Donepezil as cholinergic inhibitor and found that in Lewy the plasma BChE  
37 activity was significantly lower than in patients with Alzheimer. It's known that cholinergic activity in  
38 DLB patients is more severely impaired than in AD patients [6,8-10]. In Lewy the deficit goes beyond  
39 the cortical pathway, reaching the black substance [10-13] and lower BChE activity could be a  
40 reflection of this greater reduction of acetylcholine by a feedback mechanism. These results are  
41 promising because give us a question: Could plasma BChE activity be a differential marker between  
42 Alzheimer and Lewy? Some researchers like Shimada 2015 [52] have investigated the use of  
43 cholinesterases as possible differential markers between AD and DLB, by measurement of  
44 acetylcholinesterase activity in the brain. Our results agree with the fact that there is a significant  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

difference in the activity of cholinesterases between Lewy and Alzheimer. If studies with larger samples confirm the lower plasma BChE activity in DLB when compared with AD, there will be a prospect of using plasma BChE activity as a differential marker. The determination of plasma BChE activity is a test that may be included in the routine of a clinical laboratory and its cost is similar to other tests such as glucose, urea and creatinine [53].

In conclusion, there is lower mean plasma BChE activity in DLB patients than in elderly controls and AD patients, independent of K and -116A alleles, results that may suggest plasma BChE activity as a possible differential marker between DLB and AD. We suggest that these results are confirmed by studies with a larger sample and in other populations.

#### 5. Acknowledgement

Grants and scholarships were received from Coordination for Improvement of Higher Education (CAPES).

#### 6. References

1. Tastsch M F, Nitri R, Neto M R L. Dementia with Lewy Bodies: a distinct entity with specific treatment? *Rev Bras Psiquiatr.* 2002; (24): 152-6
2. McKeith I, Del Ser T, Spano P, et al. Efficacy of rivastigmine in dementia with Lewy bodies: a randomised, double-blind, placebo-controlled international study. *Lancet* 2000; (356): 2031-36.
3. Zupancic M, Mahajan A, Handa K. Dementia With Lewy Bodies: Diagnosis and Management for Primary Care Providers. *Prim Care Companion CNS Disord.* 2011; 13(5).
4. Aarsland D, Rongve A, Nore SP, et al. Frequency and case identification of dementia with Lewy bodies using the revised consensus criteria. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2008; 26(5):445–52.
5. Rahkonen T, Eloniemi-Sulkava U, Rissanen S, et al. Dementia with Lewy bodies according to the consensus criteria in a general population aged 75 years or older. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003; 74(6): 720–24.

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5 6. Walker Z, McKeith I, Rodda J, et al. Comparison of cognitive decline between dementia
- 6 with Lewy bodies and Alzheimer's disease: a cohort study. *BMJ Open* 2012; (2):380.
- 7
- 8 7. Caramelli P, Barbosa MT. How to diagnose the four most frequent causes of dementia.
- 9 *Rev Bras Psiquiatr* 2002; (24): 7-10
- 10
- 11 8. Bono GF, Simão-Silva DP, Batistela MS, Josviak ND, Dias PFR, Nascimento GA, Souza
- 12 RLR, et al. Butyrylcholinesterase: K variant, plasma activity, molecular forms and
- 13 rivastigmine treatment in Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population.
- 14 *Neurochemistry International*. 2014; (81): 57-62.
- 15
- 16 9. Shimada H, Hirano S, Shinotoh H, Aotsuka A, Sato K, Tanaka M, et al. Mapping of brain
- 17 acetylcholinesterase alterations in lewy body disease by PET. *Neurology* 2009; (73):273-
- 18 278.
- 19
- 20 10. Perry E, McKeith I, Ballard C: Butyrylcholinesterase and progression of cognitive deficits
- 21 in dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2003; (60):18521-23.
- 22
- 23 11. Wadih TJ, Navarro A, Peralta LA, Jiménez FJJ. The Neurochemistry and
- 24 neuropharmacology of diffuse Lewy body disease. *Rev. Neurol.* 2006; (42): 549-55.
- 25
- 26 12. Dickson DW, Davies P, Mayeux R, Crystal H, et al. Diffuse Lewy body disease.
- 27 Neurophatological and biochemical studies of six patients. *Acta Neurophatol* 1987; (75):8-
- 28 15.
- 29
- 30 13. Tiraboshi P, Hansen LA, Alford M, Sabbagh MN, Schoos B, Masliah E, et al. Cholinergic
- 31 dysfunction in disease whit Lewy bodies. *Neurology* 2000; (54):407-11.
- 32
- 33 14. Maetzler W, Keller S, Michelis J, Koehler N, et al. No differences of butyrylcholinesterase
- 34 protein activity and allele frequency in Lewy body diseases. *Neurobiol Dis* 2009; (35): 296-
- 35 301.
- 36
- 37 15. Savica R, Murray ME, Persson XM, Kantarci K, Parisi JE, Dickson DW, Petersen RC,
- 38 Ferman TJ, Boeve BF, Mielke MM. Plasma sphingolipid changes with autopsy-confirmed
- 39 Lewy Body or Alzheimer's pathology. *Alzheimer's Dement (Amst)*. 2016; (3):43-50.
- 40
- 41 16. Pohanka M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed. Pap.*
- 42 *Med. Fac. Univ. Palacky Olomouk Czech. Repub.* 155. 2011; 219-230.
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

17. Arpagaus M, Kott M, Vatsis KP, et al. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry* 1990; (29):124-131.
18. De Vriese C, Gregoire F, Lema-Kisoka R, et al. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. *Endocrinology* 2004; (145):4997-5005.
19. Silver A: *The Biology of Cholinesterases*. Frontiers of Biology. North-Holland, Amsterdam. 1974; (36): 1-596.
20. Chatonnet A, Lockridge O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* 1989; (260): 625-634.
21. Hall LMC, Spierer P. The Ache locus of *Drosophila melanogaster*: Structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader. *EMBO j.* 1986; (5): 2949-54.
22. Pritchard D, Brown A, Toutant J. The molecular forms of acetylcholinesterase from *Neocercaria americana* (nematoda), a hookworm parasite of the human intestine. *Eur. J. Biochem.* 1994; 317-323.
23. Toutant J, Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Prog. Neurobiol.* 1989; (32): 423-446.
24. Johnson G, Moore SW. Why has Butyrylcholinesterase been retained? Structural and functional diversification in a duplicated gene. *Neurochem. Int.* 2012; (61): 783-797.
25. Darvesh S, Grantham D, Hopkins D. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *J Comp Neurol* 1998; (393):374-390.
26. Darvesh S, Hopkins DA, Differential distribution of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the human thalamus. *J Comp Neurol* 2003; (463):25-43.
27. Wescoe WC, Hunt CH, Riker WF, et al. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. *Am. J. Physiol.* 1947; (149): 158-163.
28. Manoharan I, Boopathy R, Darvesh S, et al. A medial health report on individuals with silent Butyrylcholinesterase in Vysya community of India. *Clin. Chim. Acta* 2007; (378): 128-135.
29. Lockridge O. Review of human Butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharm. and Therap.* 2015; (148): 34-46.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

30. Lampón N, Hermida-Cadahia EF, Riveiro A, et al. Association between Butyrylcholinesterase activity and low-grade systemic inflammation. *Ann. Hepatol.* 2012; (11): 356-363.
31. Whittaker M. Plasma Cholinesterase variants and the anaesthetist. *Anesthesia.* 1980; (35): 174-197.
32. Perry EK, Perry RH, Blessed G, et al. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1978; (4): 273-277.
33. Arendt T, Bruckner M, Lange M, et al. Changes in acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development – a study of molecular forms. *Neurochem. Int.* 1992; (21): 381-396.
34. Simão-Silva DP, Bertolucci PHF, Labio RW, Payão SLM, Furtado-Alle L, Souza RLR: Association analysis between K and 116A variants of butyrylcholinesterase and Alzheimer's disease in a Brazilian population. *Chem Biol Interact* 2013; (203):358–360 .
35. Rubinstein HM, Dietz AA, Lubrano T: E1K, another quantitative variant at cholinesterase locus 1. *J Med Genet* 1978; (15):27-29.
36. Furtado-Alle L, Andrade FA, Nunes K, Mikami LR, Souza RLR, Chautard-Freire-Maia EA: Association of variants of the 116 site of the butyrylcholinesterase BCHE gene to enzyme activity and body mass index. *Chem Biol Interact* 2008; (175):115–118.
37. Vijayaraghavan S; Darreh-Shori T; Rongve A et al. Association of Butyrylcholinesterase-K allele and apolipoprotein E4 allele with Cognitive Decline in Dementia with Lewy Bodies and Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis* 2016; 50 (2): 567-76
38. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K: DbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 2001; (29): 308–311.
39. McKeith IG et al: Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology* 2005; 65(12): 1863-72.
40. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging and Alzheimer's Association workgroup. *Alzhermers Dement.* 2011; (7): 263-269.

- 1
  - 2
  - 3
  - 4
  - 5
  - 6
  - 7
  - 8
  - 9
  - 10
  - 11
  - 12
  - 13
  - 14
  - 15
  - 16
  - 17
  - 18
  - 19
  - 20
  - 21
  - 22
  - 23
  - 24
  - 25
  - 26
  - 27
  - 28
  - 29
  - 30
  - 31
  - 32
  - 33
  - 34
  - 35
  - 36
  - 37
  - 38
  - 39
  - 40
  - 41
  - 42
  - 43
  - 44
  - 45
  - 46
  - 47
  - 48
  - 49
  - 50
  - 51
  - 52
  - 53
  - 54
  - 55
  - 56
  - 57
  - 58
  - 59
  - 60
41. Lahiri, D K; Nurnberger, J L. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991; (19): 5444.
42. Dietz AA, Rubinstein HM, Lubrano T. Improved method for the differentiation of Cholinesterase variants. *Am J Genet* 1972; (24):58-64.
43. Clump Sham PC, Curtis D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann. Hum. Genet.* 1995; (59): 97-105.
44. Atack JR, Perry EK, Bonhan JR, et al. Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system. *J Neurochem* 1986 (47): 263–277.
45. Emre M, Aarsland D, Albanese A, et al. Rivastigmine for dementia associated with Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2004; (24): 2509-18
46. Poewe W, Wolters E, Emre M, et al. Long-term benefits of rivastigmine in dementia associated with Parkinson's disease: an active treatment extension study. *Mov Disord* 2006; (21):456–461.
47. Lockridge O, Duysen EG, Masson P. Butyrylcholinesterase: overview structure and function. In T. Satoh and RC Gupta (Eds). *Anticholinesterase pesticides: metabolism, Neurotoxicity and Epidemiology.* 2011; 25-41.
48. Bartels CF, Van Der Spek AFL, La Du BN: Two polymorphisms in the non- coding regions of the BCHE gene. *Nucleic Acids Res* 1990; (18): 6171
49. Singleton AB et al: Butyrylcholinesterase K: an association with dementia with Lewy bodies. *Lancet* 1998; (351):1818.
50. Lane R et al: BuChE-K and APOE epsilon4 allele frequencies in Lewy body dementias, and influence of genotype and hyperhomocysteinemia on cognitive decline. *Mov Disord* 2009; (24):392–400.
51. Granham C, Ballard C, Saad K. Variables which distinguish patients fulfilling clinical criteria for dementia with Lewy bodies from those with Alzheimer's disease. *Int Ger Psyc* 1997; 1113-24.
52. Shimada H, Hirano S, Sinotoh H, Ota T, Tanaka N, Sato K et al. Dementia with Lewy bodies can be well differentiated from Alzheimer's disease by measurement of brain

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

acetylcholinesterase activity – a 11CMP4A PET study. *Int J Geriatr Psychiatry* 2015; (30):1105-13.

53. Santaripa L, Grandone I, Contaldo F, Pasanisi F. Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: a review of the literature. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2013; (4): 31-39.

	DLB (n=18) Median ± S.D.	Controls (n= 38) Median ± S.D.	Mann-Whitney (p)
Bche Activity	0,78 ± 1,42	3,49 ± 0,77	0 x10 <sup>-5</sup>

Table 1: Medians ± standard deviations (S.D.), p value (Mann-Whitney) of total BChE activity in patients (DLB) and Controls

	Usual Allele (n=12) Median±S.D.	K Allele (n=6) Median±S.D.	Z (Mann- whitney)	p value	Usual Allele (n=15) Median±S.D	-116 Allele (n=3) Median±S.D	Z (Mann- whitney)	p value
DLB								
Bche Activity	1,64±1,52	0,04±1,17	0,58	0,56	1,50±1,47	0,04±0,01	-0,82	0,41

	Usual Allele (n=26) Median±S.D.	K Allele (n=12) Median±S.D.	Z (Mann- whitney)	p value	Usual Allele (n=32) Median±S.D	-116 Allele (n=6) Median±S.D	Z (Mann- whitney)	p value
Controls								
Bche Activity	3,56±0,77	3,34±0,74	-1,33	0,19	3,56±0,78	3,09±0,60	-1,34	0,18

Table 2: Medians  $\pm$  standard deviations (S.D.), Z (Mann-Whitney) and  $p$  value of total BChE activity between Usual Allele and K or -116 of patients (DLB) and Controls.

	DLB (n=18)	DA (n= 38)	Mann-Whitney (p)
	Median $\pm$ S.D.	Median $\pm$ S.D.	
Bche Activity	0,78 $\pm$ 1,42	5,233 $\pm$ 1,49	<b>0 x10<sup>-7</sup></b>

Table 3: Medians  $\pm$  standard deviations (S.D.), Mann-Whitney test (p value) of total BChE activity between total BChE activity in DLB and AD.

## Higher frequency of the *APOE 4* allele and lower Butyrylcholinesterase activity in women with Cognitive Impairment: possible prognosis markers for developing Alzheimer's disease

Josviak ND<sup>1</sup>, Souza RKM<sup>2</sup>, Piovezan MR<sup>3</sup>, Souza RLR<sup>1</sup>, Furtado-Alle L<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

<sup>2</sup>Curitiba Neurology Institute, Curitiba, Brazil

<sup>3</sup>Clinical Hospital of the Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

Author for correspondence:

PhD. Nalini D. Josviak - Email: drinaly@gmail.com

Department of Genetics, Federal University of Paraná - UFPR, Rua Cel. Heraclitus Francisco dos Santos, 210, Jardim das Americas - Curitiba - PR, 81531-970. Brazil.

### Abstract

Mild cognitive impairment (MCI) is an intermediate condition between normal aging and dementia and the risk of developing Alzheimer's disease (AD) is higher when compared to normal subjects of the same age. Butyrylcholinesterase (BChE) is an enzyme encoded by *BCHE* gene, responsible for catalyzing the hydrolysis of acetylcholine. K and -116A *BCHE* variants are associated with decrease in plasma BChE activity, and their influence has been investigated in diseases with a cholinergic deficit. *APOE 4* is considered the greatest risk factor associated with sporadic Alzheimer disease. The aim of this study was to compare the plasma BChE activity between MCI and control group, verifying if their activity is associated with the *BCHEK*, *BCHE -116A* and *APOE 4* variants. In order to check the influence of *BCHE* genetic variants on enzymatic activity, all patients and controls were genotyped for K, -116A and *APOE 4* variants. Only in women, we found significantly lower mean plasma BChE activity in MCI patients than in elderly controls, independent of K allele and influenced by -116A, and also a higher frequency of the *APOE 4* allele in MCI patients. These results reinforce the idea that the *APOE 4* and female gender are major significant factors for progression to AD and instigate further study for the possible use of BChE activity in women with MCI as a prognosis secondary marker for AD.

**Keywords:** Butyrylcholinesterase, *BCHE K*, -116A, *APOE 4*, Mild Cognitive Impairment.

## 1. Introduction

Mild cognitive impairment (MCI) is an intermediate condition between normal aging and dementia. In this condition, cognitive decline does not interfere with daily activities as occurs in dementias. MCI can be divided into (a) amnesic pure (MCI-a) if only memory is committed, with scores lower than expected for stated chronological age, (b) amnesic multiple domains (MCI-amd) if there are also mild deficits in other cognitive areas, (c) non-amnesic of multiple domains (MCI-namd) and (d) non-amnesic of a single domain (MCI-nasd). MCI-a and MCI-amd may progress to AD, MCI-namd and MCI-nasd may progress to frontotemporal dementia, dementia with Lewy bodies and primary progressive aphasia (Radanovick 2015, Winblad 2004, Petersen, 1999). Different publications have shown conversion rates to dementias ranging from 10-50% (Radanovick 2015, Tschanz 2006, Mitchell 2008, Bruscoli 2004, Tuokko 2003). For MCI amnesic patients the risk for conversion to AD ranges from 10-15% per year compared to normal subjects of the same age whose conversion rate for AD is 1 to 2% per year (Petersen 1999, Petersen 2001, Radanovick 2015). The main conversion predictors of AD beyond memory impairment are old age, low schooling, ApoE 4 allele, reduced hippocampal volume and changes in cerebrospinal fluid (reduction of beta -amyloid protein and increased TAU protein) (Radanovick 2015). Neuropsychiatric symptoms like depression, anxiety and sleep disorders have also been associated with increased risk of progression to dementias (Lyketsos 2002).

Some tests help in the diagnosis and are prognosis for AD, as decreased beta amyloid protein and increased tau protein in cerebrospinal fluid and reduced size of hippocampus by neuroimaging. Despite that, there is no ultimate biomarker for MCI. The use of biomarkers would be essential to identify MCI patients that exhibit increased risk of dementia conversion, these patients should be periodically reevaluated to ensure that the conversion, if any, is treated as early as possible (Radanovick 2015).

Human Butyrylcholinesterase, encoded by *BCHE* gene (3q26.1-q26.2), is the secondary acetylcholine (ACh) hydrolyzing enzyme in the central and peripheral nervous systems (Bono 2015, Pohanka 2011, Arpagaus 1990, De viese 2004, Silver 1974). BChE belongs to the family of Cholinesterases (ChE), sharing functions with another

enzyme of the same family, the Acetylcholinesterase (AChE). Phylogenetic analysis of BChE and AChE expression indicates that these two enzymes have emerged from a common precursor whose function was to hydrolyze acetylcholine. Therefore, the *ACHE* and *BCHE* genes arose by gene duplication after the emergence of cholinergic systems (Chatonnet 1989, Hall 1986, Pritchard 1994, Toutant 1989). BChE is synthesized in the liver and widely distributed in different human tissues, including blood and brain (Darvesch 2003, Darvesh 1998, Wescoe 1947). An adult human has ten times more BChE than AChE in tissues and the highest amount appears in plasma and liver (Manoharan 2007, Lockridge 2015), and thus BChE is the major ACh hydrolyzing enzyme in plasma (Bono 2015, Lampón 2012).

Some conditions may alter BChE activity in the plasma or in the brain. For example, pregnant women, people with liver disease, poor nutrition and cancer, all show reduced activity of the enzyme (Lockridge 2015, Whittaker 1980). On the other hand, BChE activity is increased in elderly brain (60–90 years) (Perry 1978) and in AD patients' brain, mainly in the hippocampus and temporal cortex (Bono 2015, Arent 1992, Simao-Silva 2008). Increased BChE is also verified in plasma of obese individuals. In addition, *BCHE* variants may also influence the enzyme activity (Lockridge 2015, Simao-Silva 2008, Rubstain 1978, Furtado-Alle 2008).

K variant (rs1803274, A539T) is the most common polymorphism found in the coding region of *BCHE* gene and has been associated with Alzheimer disease (AD), especially in combination with Apolipoprotein E4 (ApoE4), the greatest risk factor associated with sporadic Alzheimer disease (Bono 2015, Simao-Silva 2008, Vijayaraghavan 2016). This variant was first described in 1978 when its presence was associated with 30% decreased BChE activity in serum (Rubanstain 1978). Afterwards, studies with AD and other diseases, as diabetes and obesity, showed that K variant alone is not associated with decreased BChE activity, being the 5' UTR -116A variant necessary for this decrease. This variant is present in the non-coding exon 1 of *BCHE* at -116 nt (rs1126680), being -116A preferentially found in cis with the K variant [19] with described frequency for Caucasian population among 5.0–9.3% (Simão-Silva 2013, Furtado-Alle 2008).

The aim of this study was to compare the plasma BChE activity between MCI amnesic pure (MCIa)/MCI amnesic multiple domains (MCIamd) and control group, verifying if their activity is associated with the *BCHEK*, *BCHE* -116 and *APOE* variants.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. MCI samples and Controls**

138 MCI patients (mean age  $68.7 \pm 8.52$ ), 99 women and 39 men, were obtained from Specialized Centers of Dementia, with age and sex matched with 148 healthy elderly controls (mean age  $71.5 \pm 8.85$ ), 95 women and 53 men. All individuals, cases and controls underwent to a neuropsychological test screening as the Mini Mental State Examination (MMSE) and Geriatric Depression Scale (GDS). The MCI patients were diagnosed, by a neurologist, as probable and possible according to Petersen 1999 and Winblad 2004 criteria. Patients with a history of poor nutrition, liver disease, cancer and obesity have been excluded of this study. The control group was submitted to a clinical exam and exclusion criteria were: liver disease, poor nutrition, cancer, obesity, history and/or examination findings suggestive of psychiatric or neurological disease and evidence of functional decline as shown by a structured questionnaire. All individuals gave informed consent for participation in this study that was approved by the Institutional Ethics Committee (Protocol number 1192.117.1108).

### **2.2. Genotyping**

Total genomic DNA was extracted from peripheral blood samples by Salting-out method (Lahiri 1991) and diluted to a final concentration of 20 ng/ $\mu$ L. Genotyping for K variant (rs1803274), -116A (rs1126680) and APOE 4 was performed with TaqMan allelic discrimination assays (Applied Biosystems).

### **2.3. BChE Activity**

The BChE activity was assessed using *Dietz* (1978) method adapted for a microplate spectrophotometer TECAN® (Infinite 200 PRO), as follows: The DTNB (5,5'-bisditio-2-nitrobenzoic acid 0.423 mM) was dissolved in phosphate buffer (167g per 1000 ml). The substrate (Propionylthiocholine 100 mM) was prepared with 303 mg of iodide propionylthiocholine (MW = 303.2) in 10 mL of distilled water. 75  $\mu$ L of plasma diluted (1/100 in distilled water) were added to an Eppendorf tube containing 660  $\mu$ L of buffer DTNB. Thereafter,



245µL of the mixture was added to each well of the microplate. The microplate was placed in the spectrophotometer and heated at 25 ° C for 15min. After that it was added 5µL of the substrate in each well of the microplate and only then the reading started. The first reading called A0, must be performed immediately after the placing of the reagents. A1, A2 and A3 readings were made after one, two and three minutes from the reading A0, respectively. After the four readings  $\Delta / \text{minute}$  (absorbance change per minute) must be calculated. To obtain the activity (KU / L),  $\Delta / \text{minute}$  was multiplied by the correction factor (93.6). This methodology is based on propionylthiocholine hydrolysis by BChE producing propionic acid and thiocholine, which reacts with the DTNB, producing 5 -thio -2 -nitrobenzoate.

#### 2.4. Statistical analysis

Allele frequencies were obtained by counting the alleles from the observed genotypes. The chi-square test was used to compare categorical variables and calculated by Clump software (Clump 1995). Kolmogorov-Smirnov test was used to test for normality of variables distribution. The comparisons between means were performed by t-test (parametric variables) or by Mann-Whitney test (non-parametric variables). Multiple regression analysis was performed to evaluate the independent effect of the variables. A 5% level of significance was adopted for all the statistical analyses performed.

### 3. Results

Frequency of the K and -116A variant were similar between MCI patients and controls (Table 1) and it was also similar between men and women within each group. The frequency of the e4 allele was higher in MCI (Table 1). When gender was considered, the difference remains only for women with MCI, who have a higher frequency of the e4 allele (Women Controls x Women MCI:  $p= 0,002$ ; Women MCI x Men MCI:  $p= 0,04$ ).

We found that the mean plasma BChE activity was significantly lower in MCI patients compared to age-matched control group (t-test  $p$  value: 0,023). The difference in activity levels was observed independently of the K and e4 alleles. In other words, patients or controls carrying K or e4 variants showed no difference in BChE activity when compared with no carriers, but we found a lower activity in MCI patients carrying -116A allele (Table 2). When gender was

considered, the -116A allele effect onBChE activity was also verified in women from thecontrol group ( $p= 0,01$ ), which possibly explains the tendency of  $p$  value for the all control group shown in the table 2 ( $p=0,06$ ).Women had different BChE activity when compared to men within and between MCI and control groups (Table 3).

Multiple regression analysis using BChE activity as dependent variable showed the -116A ( $p= 0,02$ ) and sex ( $p= 0,02$ )influence in the enzyme activity levels.

Allele Frequencies	Controls	MCI	$p$ value
K	0,18	0,20	0,64
-116A	0,09	0,06	0,14
e4	0,08	0,14	<b>0,03</b>

Table 1: Allele Frequencies for K, -116A and e4variants,Fisher exact test ( $p$  value)for MCI and Controls.

MCI	Usual Allele*(n=79)	K Allele(n=49)	t-test	Usual Allele*	-116A Allele	t-test	Usual Allele*(n=93)	e4 Allele	t-test
	Mean±S.D.	Mean±S.D.	( $p$ value)	(n=79)	(n=17)	( $p$ value)	Mean±S.D	(n=35)	( $p$ value)
BChE Activity	3,27±1,06	3,26±1,04	0,96	3,62±0,99	2,65±0,68	<b>0,000</b>	3,25±1,04	3,32±1,08	0,75

Controls	Usual Allele*	K Allele	t-test	Usual Allele*	-116A Allele	t-test	Usual Allele*	e4 Allele	t-test
	(n=97)	(n=45)	( $p$ value)	(n=117)	(n=26)	( $p$ value)	(n=120)	(n=23)	( $p$ value)
BChE Activity	3,60±0,98	3,36±0,62	0,07	3,57±0,98	3,31±0,51	0,06	3,57±0,91	3,24±0,80	0,11

Table 2: Mean ± standard deviations (S.D.), t-test( $p$  value) of total plasma BChE activity between Usual Alleleand K, -116A or e4 of MCI and Controls.

\*Any other allele different of K, -116A and e4.

BChE activity	Women	Men	t-test
	Mean±S.D.	Mean±S.D	(p value)
Controls	3,65±0,92	3,32±0,82	<b>0,03</b>
MCI	3,34±1,04	3,09±1,08	0,23
t-test (p value)	<b>0,03</b>	0,25	-

Table 3: Mean ± standard deviations (S.D.), t-test(p value) of total plasma BChE activity in women and men within and between groups: MCI and Controls.

#### 4. Discussion:

Participation of BChE in the acetylcholine hydrolysis has stimulated researchers to investigate its role in cognition (Wescoc 1947, Atack 1986, Emre 2004, Powe 2006, Lockiridge 2011).A recent study of our research group (Bono 2015)showed a decrease in plasma BChE activity in patients with Alzheimer’s disease and now we verified that meanplasma BChE activity is also lower in MCI patients,agreeing in principle withresults found by Zhuravin 2015.However, whengender was considered we verified that only women with MCI had decreased plasma BChE activity. This result was confirmed by multiple regression analyses, suggesting that in men BChE activity has not changed with the presence of MCI.

Studies with *BCHE* genetic variants, such as K variant had been associated with decreased enzyme activity in some dementias and other conditions (Lockiridge 2015, Rubstain 1978, Vijayaraghavan 2016, Bartels 1990).In our study, however,we did not find this associationas the K variant carriershad the same meanBChE activity than no carriers.Studies of BChE activity in MCI are very scarce and studies with K variant and/or BChE activity and dementias in general are very controversial, some found association while others do not (Vijayaraghavan 2016, Singlenton 1998, Lane 2009, Perry 2003, Lane 2008, Simão-Silva 2008, Ferris 2009, Bono 2015, Per Jahasson 2013).Perhaps part of this conflict may be due to the effect of another variant that affects the BChE activity, the -116A variant of the *BCHE*gene. According to Furtado-Alle(2008)and Simão-Silva (2013) the K variant alone is not associated

with decreased BChE activity, being the 5'UTR -116A variant necessary for this decrease. Thus we consider important to analyze this variant, especially in dementias, and in our study we found that the -116A allele affects BChE activity in women, while the K allele showed no influence on activity, reinforcing the hypothesis that -116A is the variant that affects the BChE activity.

Patients with MCI can progress to various types of dementias, however some markers which have been associated with a well-defined dementia, such as Alzheimer (AD) and *APOE* e4, can aid in the prognosis of these patients. The influence of gender in the progression to AD has been reported in some studies, agreeing with our found of higher frequency of the e4 allele and lower BChE activity only in women, and thus suggesting a higher probability of these female MCI patients of progressing to AD. Previous analyses of the InDDEX study population (Investigation in Delay to Diagnosis of Alzheimer's disease with Exelon) have indicated that women with MCI may have a faster rate of progression to AD than men (Feldman 2007, Ferris 2009) and Ferris found a higher rate of progression in women who did not carry the K variant. Studies like this and like ours show that the progression of MCI to AD is strongly related to female gender. Indeed, female gender is considered to be one of the most significant of several factors that may influence progression to AD in MCI subjects (Fleisher 2005). Research into the higher susceptibility to AD in women has focused on the roles of estrogen (Yue 2005, Manly 2000), testosterone (Sherwin 2003) and other sex hormones (Webber 2005).

Hormonal differences between men and women are common in all ages but with aging these differences may become even higher mainly due to menopause, a time of great physiological and hormonal changes. This condition may contribute for the difference in BChE activity between men and women observed in the control group, and the presence of disease accentuates the effect on BChE activity in women, probably also due to different hormonal factors between men and women in the aging.

A possible explanation for the low BChE activity in MCI is the BChE kinetic response to concentrations of acetylcholine (ACh). It is known that BChE is less efficient in ACh hydrolysis at low concentrations but highly efficient at higher ones, a situation in which ACh becomes substrate inhibited (Silver 1974). Considering that MCI is characterized by a cholinergic deficit and a progressive decline in ACh levels, the peripheral higher BChE activity

becomes unnecessary in this condition, remaining at lower levels by a feedback mechanism and not acting causally on cholinergic deficit. This feedback mechanism has been suggested by other study with Alzheimer's disease where patients also had a lower plasma BChE activity than controls (Bono 2015). It seems that women with MCI are more prone to develop into AD, which may reflect on the significantly decreased BChE activity, probably in response to cholinergic deficit explained by the feedback mechanism.

In our study we found a higher frequency of the e4 allele in women with MCI. This result suggests that the higher risk of MCI women in developing into AD may be attributed to the presence of the e4 allele, which is considered the greatest risk factor associated with sporadic Alzheimer disease (Simao-Silva 2008, Vijayaghavan 2016) and early Alzheimer's (de Beaumont 2016). Although we found no association with the -116A variant, the results show a tendency to the significance that can be tested by a study with a larger sample since it influenced the BChE activity in Women.

In conclusion, there is lower mean plasma BChE activity in women with MCI than in elderly controls influenced by -116A and independent of the K allele. In addition, a higher frequency of APOE e4 in women with MCI was found. These results reinforce the idea that the female gender and APOE 4 are major significant factors for progression to AD and instigates further study for possible use of BChE activity in women with MCI as a prognosis secondary marker for AD.

## 5. Acknowledgement

Grants and scholarships were received from Coordination for Improvement of Higher Education (CAPES).

## 6. References

1. Radanovick M, Stella F, Forlenza OV. Mild Cognitive Impairment. Rev Med 2015; 94 (3): 163-8.

2. Winblad B, Palmer K, Kivipelto M, Jelic V, Fratiglioni L, Wahlund L, et al. Mild cognitive impairment-beyond controversies, towards a consensus: report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. *J Intern Med.* 2004;256(3):240-6.
3. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol.* 1999;56(3):3038.
4. Tschanz JT, Welsh-Bohmer KA, Lyketsos CG, Corcoran C, Green RC, Hayden K, et al. Conversion to dementia from mild cognitive disorder: the Cache County Study. *Neurology.* 2006;67(2):229-34.
5. Mitchell A, Shiri-Feshki M. Temporal trends in the long term risk of progression of mild cognitive impairment: a pooled analysis. *J NeurolNeurosurg Psychiatry.* 2008;79(12):138691.
6. Bruscoli M, Lovestone S. Is MCI really just early dementia? A systematic review of conversion studies. *IntPsychogeriatr.* 2004;16(2):129-40.
7. Tuokko H, Frerichs R, Graham J, Rockwood K, Kristjansson B, Fisk J, et al. Five-year follow-up of cognitive impairment with no dementia. *Arch Neurol.* 2003;60(4):577-82.
8. Petersen RC, Doody R, Kurz A, Mohs RC, Morris JC, Rabins PV, et al. Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch Neurol.* 2001;58(12):1985-92.
9. Lyketsos CG, Lopez O, Jones B, Fitzpatrick AL, Breitner J, Dekosky S. Prevalence of neuropsychiatric symptoms in dementia and mild cognitive impairment: results from the cardiovascular health study. *JAMA.* 2002;288(12):1475-83.
10. Rabelo FR. Mild Cognitive Impairment: evaluation, associated factors and intervention possibilities. *RevKairósGerontologia, São Paulo* 2009; 12 (2): 65-79.
11. Lopez O, Jagust WJ, Dekosky S, Becker JT, Fitzpatrick A, Dulberg C, et al. Prevalence and classification of mild cognitive impairment in the Cardiovascular Health Study Cognition Study: part 1. *Arch Neurol.* 2003;60(10):1385-9.
12. Petersen RC, Roberts RO, Knopman DS, Geda YE, Cha RH, Pankratz VS, et al. Prevalence of mild cognitive impairment is higher in men The Mayo Clinic Study of Aging. *Neurology.* 2010;75(10):889-97.
13. Bono GF, Simão-Silva DP, Batistela MS, Josviak ND, Dias PFR, Nascimento GA, Souza RLR, et al. Butyrylcholinesterase: K variant, plasma activity, molecular forms and

- rivastigmine treatment in Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population. *Neurochemistry International*. 2014; (81): 57-62.
14. Pohanka M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. PalackyOlomouk Czech. Repub.* 155. 2011; 219-230.
  15. Arpagaus M, Kott M, Vatsis KP, et al. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry* 1990; (29):124-131.
  16. De Vriese C, Gregoire F, Lema-Kisoka R, et al. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. *Endocrinology* 2004; (145):4997-5005.
  17. Silver A: *The Biology of Cholinesterases*. *Frontiers of Biology*. North-Holland, Amsterdam. 1974; (36): 1-596.
  18. Chatonnet A, Lockridge O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* 1989; (260): 625-634.
  19. Hall LMC, Spierer P. The Ache locus of *Drosophila melanogaster*: Structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader. *EMBO j.* 1986; (5): 2949-54.
  20. Pritchard D, Brown A, Toutant J. The molecular forms of acetylcholinesterase from *Neuoramericanus* (nematoda), a hookworm parasite of the human intestine. *Eur. J. Biochem.* 1994; 317-323.
  21. Toutant J, Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Prog. Neurobiol.* 1989; (32): 423-446.
  22. Johnson G, Moore SW. Why has Butyrylcholinesterase been retained? Structural and functional diversification in a duplicated gene. *Neurochem. Int.* 2012; (61): 783-797.
  23. Darvesh S, Hopkins DA, Differential distribution of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the human thalamus. *J Comp Neurol* 2003; (463):25-43.
  24. Darvesh S, Grantham D, Hopkins D. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *J Comp Neurol* 1998; (393):374-390.
  25. Wescoe WC, Hunt CH, Riker WF, et al. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. *Am. J. Physiol.* 1947; (149): 158-163.

26. Manoharan I, Boopathy R, Darvesh S, et al. A medial health report on individuals with silent Butyrylcholinesterase in Vysya community of India. *Clin. Chim. Acta* 2007; (378): 128-135.
27. Lampón N, Hermida-Cadahia EF, Riveiro A, et al. Association between Butyrylcholinesterase activity and low-grade systemic inflammation. *Ann. Hepatol.* 2012; (11): 356-363.
28. Whittaker M. Plasma Cholinesterase variants and the anaesthetist. *Anesthesia.* 1980; (35): 174-197.
29. Perry EK, Perry RH, Blessed G, et al. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1978; (4): 273-277.
30. Arendt T, Bruckner M, Lange M, et al. Changes in acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development – a study of molecular forms. *Neurochem. Int.* 1992; (21): 381-396.
31. Simão-Silva DP, Bertolucci PHF, Labio RW, Payão SLM, Furtado-Alle L, Souza RLR: Association analysis between K and 116A variants of butyrylcholinesterase and Alzheimer's disease in a Brazilian population. *ChemBiolInteract* 2013; (203):358–360 .
32. Rubinstein HM, Dietz AA, Lubrano T: E1K, another quantitative variant at cholinesterase locus 1. *J Med Genet* 1978; (15):27-29.
33. Furtado-Alle L, Andrade FA, Nunes K, Mikami LR, Souza RLR, Chautard-Freire-Maia EA: Association of variants of the 116 site of the butyrylcholinesterase BCHE gene to enzyme activity and body mass index. *ChemBiol Interact* 2008; (175):115–118.
34. Vijayaraghavan S; Darreh-Shori T; Rongve A et al. Association of Butyrylcholinesterase-K allele and apolipoprotein E4 allele with Cognitive Decline in Dementia with Lewy Bodies and Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis* 2016; 50 (2): 567-76
35. Lahiri, D K; Nurnberger, J L. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991; (19): 5444.
36. Dietz AA, Rubinstein HM, Lubrano T. Improved method for the differentiation of Cholinesterase variants. *Am J Genet* 1972; (24):58-64.



37. Clump Sham PC, Curtis D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann. Hum. Genet.* 1995; (59): 97-105.
38. Atack JR, Perry EK, Bonhan JR, et al. Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system. *J Neurochem* 1986 (47): 263–277.
39. Emre M, Aarsland D, Albanese A, et al. Rivastigmine for dementia associated with Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2004; (24): 2509-18
40. Poewe W, Wolters E, Emre M, et al. Long-term benefits of rivastigmine in dementia associated with Parkinson's disease: an active treatment extension study. *MovDisord* 2006; (21):456–461.
41. Lockridge O, Duysen EG, Masson P. Butyrylcholinesterase: overview structure and function. In T. Satoh and RC Gupta (Eds). *Anticholinesterase pesticides: metabolism, Neurotoxicity and Epidemiology.* 2011; 25-41.
42. Zhuravin IA, Nalivaeva NN, Kozlova DI, Kochkina EG, Fedorova YB, GavriloVA SI. The activity of blood serum cholinesterases and neprilysin as potential biomarkers of mild-cognitive impairment and Alzheimer's disease. *ZhNevrolPsikhiatrIm S SKorsakova.* 2015;115(12):110-7.
43. Bartels CF, Van Der Spek AFL, La Du BN: Two polymorphisms in the non-coding regions of the BCHE gene. *Nucleic Acids Res* 1990; (18): 6171
44. Singleton AB et al: Butyrylcholinesterase K: an association with dementia with Lewy bodies. *Lancet* 1998; (351):1818.
45. Lane R et al: BuChE-K and APOE epsilon4 allele frequencies in Lewy body dementias, and influence of genotype and hyperhomocysteinemia on cognitive decline. *MovDisord* 2009; (24):392–400.
46. Lane R, Feldman HH, Meyer J, He Y, Ferris SH, Nordberg A, et al. Synergistic effect of apolipoprotein E ε4 and butyrylcholinesterase K-variant on progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Pharmacogenet Genomics.* 2008; 18:289–298.
47. Perry E, McKeith I, Ballard C: Butyrylcholinesterase and progression of cognitive deficits in dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2003; (60):18521-23.

48. Ferris S, Nordberg A, Soininen H, Darreh-Shori T, Lane R. Progression from Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's disease: effects of gender, butyrylcholinesterase genotype and rivastigmine treatment. *Pharmacogenet Genomics* 2009; 19(8): 635–646.
49. Per Johansson, Erik A, Jan-Ove J, Kiklas M et al. Cerebrospinal Fluid (CSF) 25-hydroxyvitamin D concentration and CSF Acetylcholinesterase Activity are reduced in patients with Alzheimer's disease. *Plos One* 2013; 8(11): 1-9.
50. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K: DbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 2001; (29): 308–311.
51. Feldman HH, Ferris S, Winblad B, Sfikas N, Mancione L, He Y, et al. Effect of rivastigmine on delay to diagnosis of Alzheimer's disease from mild cognitive impairment: the InDDEx study. *Lancet Neurol.* 2007; 6:501–512.
52. Fleisher A, Grundman M, Jack CR Jr, Petersen RC, Taylor C, Kim HT, et al. Sex, apolipoprotein E epsilon 4 status, and hippocampal volume in mild cognitive impairment. *Arch Neurol.* 2005; 62:953–957.
53. Yue X, Lu M, Lancaster T, Cao P, Honda S, Staufenbiel M, et al. Brain estrogen deficiency accelerates Abeta plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. *ProcNatlAcadSci USA.* 2005; 102:19198–19203.
54. Manly JJ, Merchant CA, Jacobs DM, Small SA, Bell K, Ferin M, et al. Endogenous estrogen levels and Alzheimer's disease among postmenopausal women. *Neurology.* 2000; 54:833–837.
55. Sherwin BB. Steroid hormones and cognitive functioning in aging men: a mini-review. *J MolNeurosci.* 2003; 20:385–393.
56. Webber KM, Casadesus G, Marlatt MW, Perry G, Hamlin CR, Atwood CS, et al. Estrogen bows to a new master: the role of gonadotropins in Alzheimer pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1052:201–209.
57. Chen KL, Sun YM, Zhou Y, Zhao QH, Ding D, Guo QH. Associations between APOE polymorphisms and seven diseases with cognitive impairment including Alzheimer's disease, frontotemporal dementia, and dementia with Lewy bodies in southeast China. *Psychiatr Genet.* 2016;26(3):124-31.
58. De Beaumont L, Pelleieux S, Lamarre-Thérroux L, Dea D, Poirier J; and the Alzheimer's Disease Cooperative Study. Butyrylcholinesterase K and Apolipoprotein E-ε4 Reduce

the Age of Onset of Alzheimer's Disease, Accelerate Cognitive Decline, and Modulate Donepezil Response in Mild Cognitively Impaired Subjects. *J Alzheimer's Dis.* 2016; 18.

## 6. REFERÊNCIAS

Aarsland D, Rongve A, Nore SP, et al. Frequency and case identification of dementia with Lewy bodies using the revised consensus criteria. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2008; 26(5):445–52.

Abreu ID, Forlenza OV, Barros HL. Demência de Alzheimer: correlação entre memória e autonomia. *Rev psiquiatr clín*. 2005; (32):131-136.

Ackerman S. *Discovering the brain*. Washington: National Academy Press, 1992.

Ala TA, Hughes LF, Kyrouac GA, Ghobrial MW, Elble RJ. Pentagon copying is more impaired in dementia with Lewy bodies than in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; (70):483-488.

Araújo CLO, Nicoli JS. A bibliographic review of the mainly dementias which take on brazilian population. *Revista Kairós Gerontologia* 2010; (13):231-244.

Arendt T, Bruckner M, Lange M, Bigl V. Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development- A study of molecular forms. *J. Neurochem*. 1992; (21):381–396.

Bartels CF, Jensen FS, Lockridge O, Van Der Spek AFL, Rubinstein HM, Lubrano T, La Du BN. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *Am. J. Hum. Genet*. 1992; (50):1086-10103.

Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. *Fisiologia*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

Bono GF, Simão-Silva DP, Batistela MS, Josviak ND, Dias PFR, Nascimento GA, Souza RLR, et al. Butyrylcholinesterase: K variant, plasma activity, molecular forms and rivastigmine treatment in Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population. *Neurochemistry International*. 2014; (81): 57-62.

Boyles JK, Pitas RE, Wilson E et al. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J. Clin. Invest.* 1985; (76):1501–1513.

Bu G, Maksymovitch EA, Geuze H et al. Subcellular localization and endocytic function of low density lipoprotein receptor-related protein in human glioblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 1994; (269):29874–29882.

Caramelli P, Barbosa MT. Como diagnosticar as quatro causas mais frequentes de demência? *Rev. Bras. Psiquiatr* 2002; (24):7-10.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993; (261):921–923.

Damasceno BP. Comprometimento cognitivo leve e doença de Alzheimer incipiente. *Demências* 2004; p. 201-210.

Darvesh S, Grantham D, Hopkins D. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *J Comp Neurol* 1998; (393):374–390

Darvesh S, Hopkins DA, Differential distribution of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the human thalamus. *J Comp Neurol* 2003; (463):25-43.

De Vriese C, Gregoire F, Lema-Kisoka R, Waelbroeck M et al. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. *Endocrinology* 2004; (145):4997-5005.

Engelhard E, LAKS J. *Demência Vascular*. 1.ed. São Paulo: Editora de Projetos Médicos, 2009.

Fornari LHT, Garcia LP, Hilbig A, Fernandez LL The several faces of dementia syndrome: How to diagnose clinically? *Scientia Medica* 2010; (20):185-193.

Furtado-Alle L, Andrade FA, Nunes K, Mikami LR, Souza RLR, Chautard-Freire-Maia EA: Association of variants of the 116 site of the butyrylcholinesterase BCHE gene to enzyme activity and body mass index. *Chem Biol Interact* 2008; (175):115–118.

Gauthier S et al. Mild cognitive impairment. *Lancet* 2006; (15):1262-1269.

Greig NH, Utsuki T, Ingram DK, Wang Y, Pepeu G, Scali C, Yu Q-S, Mamczarz J, Holloway HW, Giordano T et al. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer amyloid peptide in rodent. *PNAS* 2005; (102):17213–17218.

Harding AJ, Broe GA, Halliday GM. Visual hallucinations in Lewy body disease relate to Lewy bodies in the temporal lobe. *Brain* 2002; (125):391-403.

Horimoto Y, Matsumoto M, Nakazawa H et al. Cognitive conditions of pathologically confirmed dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with dementia. *J Neurol Sci* 2003; (216):105-108.

Huang Y. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Neurology* 2006; (66):79–85.

Johnson G, Moore SW. Why has Butyrylcholinesterase been retained? Structural and functional diversification in a duplicated gene. *Neurochem. Int.* 2012; (61): 783-797

Josviak ND, Batistela MS, Simão-Silva DP et al. Review of main genes and proteins associated with tau-positive frontotemporal dementia. *Rev Bras Geriatr Gerontol* 2015; (18):201-211.

Lahiri DK, Farlow MR, Sambamurti K, Greig N, Glacobini E, Schneider L. A critical analysis of new molecular targets and strategies for drug developments in Alzheimer's disease. *Drug Targets* 2003; (4):97–112.

Lampón N, Hermida-Cadahia EF, Riveiro A, et al. Association between Butyrylcholinesterase activity and low-grade systemic inflammation. *Ann. Hepatol.* 2012; (11): 356-363.

Li B, Stribley JA, Ticu A et al. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *Journal of Neurochemistry* 2000; (75):1320-1331.

Lockridge O. Review of human Butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharm. and Therap.* 2015; (148): 34-46.

Lopez O, Jagust WJ, Dekosky S, Becker JT, Fitzpatrick A, Dulberg C, et al. Prevalence and classification of mild cognitive impairment in the Cardiovascular Health Study Cognition Study: part 1. *Arch Neurol.* 2003;60(10):1385-9.

Machado JC et. al. Avaliação do declínio cognitivo e sua relação com as características socioeconômicas dos idosos em Viçosa-MG. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 2007; (10):592-605.

Mahley RW, Huang Y. Apolipoprotein (apo) E4 and Alzheimer's disease: unique conformational and biophysical properties of apoE4 can modulate neuropathology. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 2006; (185):8–14.

Mahley RW, Innerarity TL, Rall SCJR et al. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid Res* 1984; (25):1277–1294.

Mahley RW, RALL SC. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Rev. Gen. Hum. Genet.* 2000; (01):507–37.

Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; (240):622–630.

Manoharan I, Boopathy R, Darvesh S, et al. A medial health report on individuals with silent Butyrylcholinesterase in Vysya community of India. Clin. Chim. Acta 2007; (378): 128-135.

Manoharan I, Wieseler S, Layer PG, Lockridge O, Boopathy R. Naturally occurring mutation Leu307Pro of human butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. Pharmacogenet. Genom. 2006; (16):461-468.

Manual de Diagnostico e Estatística dos Transtornos Mentais, DSM V. 5 Edição. Associação Americana de Psiquiatria, 2013.

Martins RN, Clarnette R, Fisher C et al. ApoE genotypes in Australia: roles in early and late onset Alzheimer's disease and Down's syndrome. Neuroreport 1995; (6):1513-1516.

McKeith I, Del Ser T, Spano P, et al. Efficacy of rivastigmine in dementia with Lewy bodies: a randomised, double-blind, placebo-controlled international study. Lancet 2000; (356): 2031-36.

Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G. Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. Cell Tissue Res. 1992; (269):375–382.

Moore KL. Anatomia Orientada para a Clínica, 6ªED, GUANABARA KOOGAN, 2011.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Neto JG, Tamelini MG, Forlenza OV. The Differential Diagnosis of Dementia. Rev. Psiq. Clín. 2005; (32):119-130.

Nunes K. Haplótipos do gene BCHE da Butirilcolinesterase humana e aspectos evolutivos. Curitiba, 2007. Tese. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.



Perry E, Perry R, Blessed G, Tomlinson B. Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1978; (4):273-277.

Perry E, McKeith I, Ballard C: Butyrylcholinesterase and progression of cognitive deficits in dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2003; (60):18521-23.

Petersen RC, Doody R, Kurz A, Mohs RC, Morris JC, Rabins PV, et al. Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch Neurol.* 2001;58(12):1985-92.

Petersen RC, Roberts RO, Knopman DS, Geda YE, Cha RH, Pankratz VS, et al. Prevalence of mild cognitive impairment is higher in men The Mayo Clinic Study of Aging. *Neurology.* 2010;75(10):889-97.

Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol.* 1999;56(3):3038.

Rabelo DF. Declínio cognitivo leve em idosos: fatores associados, avaliação e intervenção. *Revista Mineira de Ciências da Saúde Patos de Minas* 2009; (1):56-68.

Radanovick M, Stella F, Forlenza OV. Mild Cognitive Impairment. *Rev Med* 2015; 94 (3): 163-8.

Rahkonen T, Eloniemi-Sulkava U, Rissanen S, et al. Dementia with Lewy bodies according to the consensus criteria in a general population aged 75 years or older. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003; 74(6): 720–24.

Ramos LR et al. Two-year follow-up study of elderly residents in S. Paulo, Brazil: methodology and preliminary results. *Rev. Saúde Pública* 1998; (32):397-407.

Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 1993; (11):575–580.

Roses AD. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Med.* 1996; (47):387–400.

Rubinstein HM, Dietz AA, Lubrano T: E1K, another quantitative variant at cholinesterase locus 1. *J Med Genet* 1978; (15):27-29.

Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K: DbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 2001; (29): 308–311.

Shimada H, Hirano S, Shinotoh H, Aotsuka A, Sato K, Tanaka M, et al. Mapping of brain acetylcholinesterase alterations in lewy body disease by PET. *Neurology* 2009; (73):273-278.

Siest G, Pillot T, Régis-Bailly A, Leininger-Müller B et al. Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin. Chem.* 1995; (41):1068-1086.

Silver A. *The Biology of Cholinesterases*, Elsevier Amsterdam. 1974.

Simão-Silva DP, Bertolucci PHF, Labio RW, Payão SLM, Furtado-Alle L, Souza RLR: Association analysis between K and 116A variants of butyrylcholinesterase and Alzheimer's disease in a Brazilian population. *Chem Biol Interact* 2013; (203):358–360 .

Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2001; (2):294–302.

Souza RLR, Mikami LR, Maegawa ROB, Chautard-freire-Maia EA. Four new mutations in the BCHE gene of butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. *Mol. Genet. Metab.* 2005; (84):349-353.

Steriade M, Jones EG, McCormick DA. Thalamus: organization and function. Elsevier Amsterdam, 1997.

Tastsch M F, Nitrini R, Neto M R L. Dementia with Lewy Bodies: a distinct entity with specific treatment? Rev Bras Psiquiatr. 2002; (24): 152-6

Teixeira-Jr AL, Cardoso F. Neuropsiquiatria dos núcleos da base: uma revisão. J Bras Psiquiatr 2004; (53):153-158.

Toutant J, Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. Prog. Neurobiol. 1989; (32): 423-446.

Walker Z, McKeith I, Rodda J, et al. Comparison of cognitive decline between dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease: a cohort study. BMJ Open 2012; (2):380.

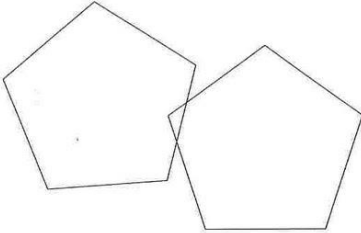
Wescoe WC, Hunt CH, Riker WF, et al. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. Am. J. Physiol. 1947; (149): 158-163.

Xu PT, Gilbert JR, Qiu HL et al. Regionally specific neuronal expression of human APOE gene in transgenic mice. Neurosci. Lett 1998; (246):65-68.

Zupancic M, Mahajan A, Handa K. Dementia With Lewy Bodies: Diagnosis and Management for Primary Care Providers. Prim Care Companion CNS Disord. 2011; 13(5).

## 6. APÊNDICES

### Apêndice 1 – Mini-Exame do Estado Mental (MEEM)

<b>MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL</b>	
(Folstein, Folstein & McHugh, 1.975)	
Paciente:	_____
Data da Avaliação: ____/____/____	Avaliador: _____
<b>ORIENTAÇÃO</b>	
• 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) .....	( )
<b>MEMÓRIA IMEDIATA</b>	
• 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.	
<b>ATENÇÃO E CÁLCULO</b>	
• (100 - 7) sucessivos, 5 vezes sucessivamente (1 ponto para cada cálculo correto) .....	
(alternativamente, soletrar MUNDO de trás para frente)	
<b>EVOCAÇÃO</b>	
• Pergunte pelas 3 palavras ditas anteriormente (1 ponto por palavra) .....	
<b>LINGUAGEM</b>	
• 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) .....	( )
<b>ESCORE: ( ___/30)</b>	
	

## Apêndice 2

**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
<b>Total: _____/30</b>	

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.