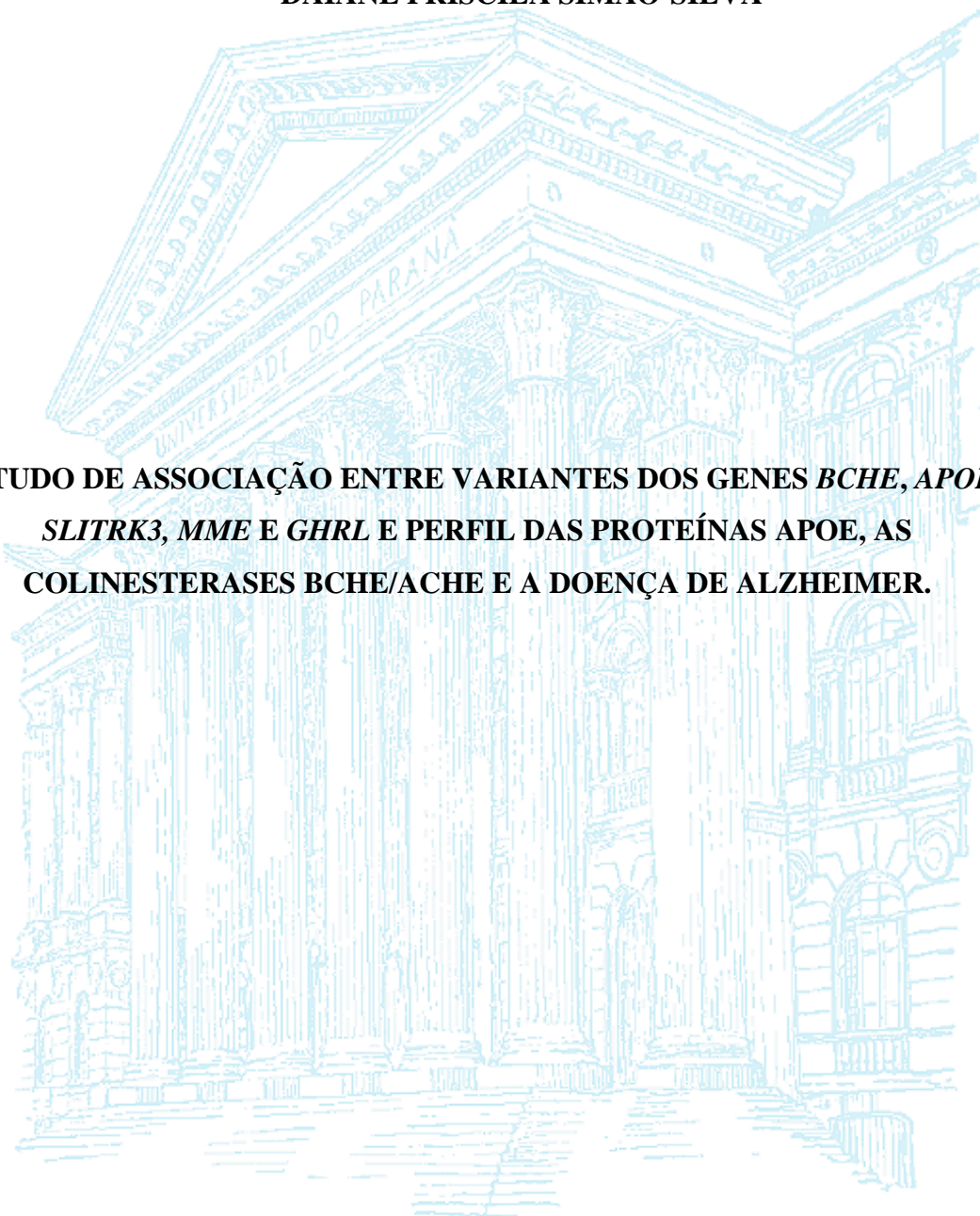


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DAIANE PRISCILA SIMÃO-SILVA

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIANTES DOS GENES *BCHE*, *APOE*,
SLITRK3, *MME* E *GHRL* E PERFIL DAS PROTEÍNAS *APOE*, AS
COLINESTERASES *BCHE/ACHE* E A DOENÇA DE ALZHEIMER.**



**CURITIBA
2014**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIANTES DOS GENES *BCHE*, *APOE*,
SLITRK3, *MME* E *GHRL* E PERFIL DAS PROTEÍNAS APOE, AS
COLINESTERASES BCHE/ACHE E A DOENÇA DE ALZHEIMER.**

Tese de Doutorado apresentada por
Daiane Priscila Simão-Silva ao curso de
Pós-Graduação em Genética da
Universidade Federal do Paraná como
requisito parcial para obtenção do título
de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo L. R. de
Souza.

CURITIBA
2014

*E ainda que eu conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé,
de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.*

1 Coríntios 13, 2.

À todos que eu amo, e em especial aos idosos que contribuíram com este trabalho!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por permitir uma vida tão “intensa” e repleta de pessoas que me auxiliaram nesta caminhada;

Aos meus pais, Antonio e Beatriz, que dedicam suas vidas para nossa realização (minha e de minhas irmãs), foram e sempre serão exemplos, minha inspiração para prosseguir confiante.

À meu esposo Jefferson, por existir em minha vida, estar sempre a meu lado, por todo amor, dedicação e cuidado;

As minhas irmãs, Likelli, Lidiane e Caroline, que mesmo distante sempre estiveram tão próximas me auxiliando e dando forças. Ao Juliano e meu sobrinho Eric que ainda irá nascer, mas já enche a casa de alegria.

Aos amigos polimórficos, pelo auxílio prático, mas principalmente pela alegria de compartilhar da presença sempre amiga de todos.

Ao grupo de pesquisa das demências, em especial a Patricia, Gleyse, Meire, Nalini, por toda dedicação, superação, parceria e força, foram tantas aventuras. Sem vocês este trabalho não seria possível. Agradeço também a Micheli, Anaiti, Saritha e André.

Ao Instituto Sagrado Coração de Jesus, em especial a Amélia e Ir. Marisa;

Aos meus familiares, afilhados, compadres e amigos;

Aos amigos da genética, professores e funcionários do departamento;

Ao Departamento de Neurologia do Hospital de Clínicas da UFPR, em especial ao Dr. Mauro Piovezan, pela amizade, interesse e parceria na realização da pesquisa.

Ao Instituto Neurológico de Curitiba, em especial o Dr. Ricardo Krause Martinez, que sem medir esforços participou e contribuiu com este trabalho.

Ao Instituto Alzheimer Brasil e ao grupo da terceira idade do departamento de Educação física da UFPR;

A banca, Dra. Angélica, Dr. Átila, Dr. Helio e Dra. Lupe,

Ao meu orientador, Dr. Ricardo, por ter aceitado o desafio de começar uma nova linha e por me orientar.

Ao Dr. Taher Darreh-Shori pela orientação no Karolinska Institutet, assim como todos do Department of Neurobiology, Care Sciences and Society, pela acolhida e convivência.

À CAPES pelas bolsas de doutorado e doutorado-sanduiche.

RESUMO

Na doença de Alzheimer (DA) os padrões colinérgicos são alterados, ocorrendo redução da acetilcolinesterase (AChE) e um aumento da butirilcolinesterase (BChE) nas regiões encefálicas. A *K* (539T) é a variante mais comum do gene *BCHE* e vários estudos demonstraram associação entre essa variante e a DA. A associação é controversa, enquanto alguns trabalhos sugerem um efeito protetor da *K*, outros associam como fator de risco para a DA. Ou ainda, como um fator de risco dependente da sinergia entre *BCHE-K* e *APOE4*. Para melhor compreender a dinâmica colinérgica na DA é importante avaliar as variantes genéticas, proteicas e enzimáticas atuantes no organismo como um todo, pois, muitos trabalhos têm considerado apenas os níveis encefálicos e não o plasmático para essas variantes. Considerando essa discussão, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o perfil protéico, em plasma, para BChE, AChE e ApoE em 112 pacientes com DA e 118 controles idosos e a associação com as variantes genóticas: *K*, -116A e 1914G do gene *BCHE*, a variante L72M do gene *GHRL*, variante *APOEε4* do gene *APOE*, dois SNPs para o gene *SLITRK3* (rs3828419 e rs17449213) e dois polimorfismos do gene *MME* (rs1086740 e rs2016846). Estes genes, *SLITRK3* e *MME*, estão à jusante do gene *BCHE*. Os níveis de ApoE, AChE e BChE protéica e enzimáticas foram mensurados por ELISA sanduíche, no Instituto Karolinska (Estocolmo – SE), com otimização de um novo protocolo para mensuração do perfil proteico para BChE, e adaptação para avaliação em plasma para ApoE e AChE. Os genótipos foram obtidos com uso do kit de genotipagem por TaqMan® (Applied Biosystems). Ocorreu um decréscimo da atividade da BChE em pacientes com doença de Alzheimer, no entanto, essa redução parece ser devido ao curso da patologia. A variante *K*, por si só, não foi suficiente para diminuir a atividade da BChE, mas em conjunto com a variante 1914G do gene *BCHE*. Estas variantes, 1914G e *K*, estão em desequilíbrio de ligação e, eventualmente, este fato contribui para controvérsia e não compreensão do papel desta variante (*K*) na DA. Dos genes a jusante da *BCHE*, as variantes analisadas para *SLITRK3* não foram associadas com a DA. Contudo, ambas as variantes do gene *MME* foram associadas às alterações no padrão enzimático e proteico da BChE. O rs1086740 foi associado à diminuição da atividade da BChE, inclusive conferindo decréscimo na atividade da BChE-K, porém sem associação direta com a DA. O SNP rs2016846, em homozigose para o genótipo usual (TT), foi associado ao aumento da atividade da BChE e esteve associado à DA nos estágios moderado e grave (CDR2 e CDR3), sendo a variante rs2016846, no presente trabalho, um fator protetivo contra DA. A variante *APOE4*, como esperado, foi associada à presença da DA

e, representou diminuição da concentração da proteína ApoE. O aumento da concentração da ApoE foi correlacionado com aumento do déficit cognitivo. Nossos resultados foram condizentes com um processo sinérgico entre ApoE e BChE, com atuação da atividade da BChE sobre a concentração da ApoE, principalmente na presença da variante *-116A* do gene *BCHE*. A atividade da AChE está aumentada em DA, e mais ainda na presença da *-116A* do gene *BCHE*. Assim sendo, consideramos que o padrão colinérgico, ao nível plasmático, é modulado por uma gama de variáveis, e que variantes como a *BCHE-K* dependem de uma série de interações, genéticas e ambientais, e não devem ser avaliados isoladamente como fator de proteção ou risco para a doença de Alzheimer. Este trabalho demonstra ainda, que o padrão de atividade da AChE e BChE periférico é o oposto ao padrão encefálico, apontando a necessidade de avaliar a direção desta regulação e o papel da variante *-116A*, do gene *BCHE*, neste processo, visando também otimizar o uso dos inibidores colinérgicos na DA. Destacamos também o potencial das variantes do gene *MME* na modulação da atividade da BChE e ação protetora da variante rs2016846 do gene *MME* contra DA.

Palavras-chave: *MME*, rs2016846; variante *K*, perfil colinérgico plasmático, Apolipoproteína E.

ABSTRACT

In Alzheimer's disease (AD) cholinergic patterns are changed, because of a reduction in Acetylcholinesterase (AChE) and an increase in butyrylcholinesterase (BChE) activity in brain regions. The *K* (539T) is the most common variant of the *BCHE* gene and several studies reported an association between this variant and AD. The association is controversial, while some suggest a protective effect, others suggest *K* as risk factor for AD. Or yet, as risk factor dependent of synergy between *BCHE-K* and *APOE4*. To better understand the cholinergic dynamic in AD, is important to evaluate the genetic, proteic and enzyme variants working in the body as a whole, as many studies have considered only the brain levels and no plasmatic to evaluate these variants. Considering this discussion, this work aimed to evaluate the protein profile in plasma for BChE, AChE and ApoE in 112 AD patients and 118 elderly controls and the association with the genotypic variants: *K*, *-116A* and *-1914* of *BCHE* gene, the *L72M* variant of *GHRL*, *APOE ϵ 4* of *APOE* gene, two SNPs for *SLITRK3* gene (rs3828419 and rs17449213) and two polymorphisms for *MME* (rs1086740 and rs2016846). These genes, *SLITRK3* and *MME*, are downstream of the *BCHE* gene. ApoE, AChE and BChE levels in plasma were measured by sandwich ELISA in the Karolinska Institute, Department of Neurobiology (Stockholm, SE) with optimization of a new protocol for BChE protein profile measurement, and protocol adaptation for ApoE and AChE in plasma evaluation. The genotyping was performed with the kit TaqMan® genotyping assays (Applied Biosystems). A decrease in the BChE activity was observed in patients, however this reduction seems to be due to progress of the AD pathology. The variant *K*, alone, was not sufficient to account for a decrease in BChE activity, unless together with the *1914G* variant *BCHE* gene. These variants, *1914G* and *K*, are in linkage disequilibrium and, eventually, this fact contributes to controversy about the role of this variant (*K*) in AD. Of the genes downstream of *BCHE* evaluated, *SLITRK3* variants were not association with AD. However, both *MME* gene variants were associated with alterations in the BChE enzymatic and protein standard. The rs1086740 was associated with decreased in BChE activity, even conferring decrease in BChE-*K* activity, but not straight associated with AD. The SNP rs2016846, in the homozygote genotype for the usual form (TT), was associated with increased in BChE activity and was associated with AD in the moderate and severe stages (CDR2 and CDR3). This variant, rs2016846, in the present work, conferred protection against AD. The ApoE4 variant, as expected, was associated with the presence of AD and partnered for lowering of the ApoE protein concentration. The higher concentrations of ApoE were correlated with

increased cognitive deficit. Our results were consistent with a synergistic process between ApoE and BChE, with ApoE concentration modulated by the BChE activity, especially in the presence of the *-116A* variant of *BCHE* gene. The AChE activity is increased in AD, and even more in the presence of *-116A* of *BCHE* gene. Therefore, we consider that the cholinergic profile, in plasma level, is modulated by a set of variables, and variants such as *BCHE-K*, are dependent on a series of genetic and environmental interactions, and should not be evaluated singly as a protective factor or increased risk of Alzheimer's disease. This work also demonstrates that the peripheral pattern of AChE and BChE activity is the opposite of the brain pattern. This finding indicates the requirement to evaluate the direction of this regulation and the role of variant *-116A* of *BCHE* gene in this process, aiming also optimize the use of cholinergic inhibitors in AD. We also emphasize the potential of the *MME* gene variants in modulating the activity of BChE and protective action of the gene variant rs2016846 *MME* against AD.

Keywords: *MME*, rs2016846, *K* variant, cholinergic plasma profile, apolipoprotein E.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Demência	4
2.1.1 Diagnóstico de demência.....	4
2.2. Doença de Alzheimer	6
2.2.1 Diagnóstico	8
2.2.2 Prevalência.....	11
2.2.3 Etiologia	12
2.2.4 Tratamento	13
2.2.4.1 Inibidores Colinesterásicos	13
2.2.4.2 Medicamento de via Glutamatérgica.....	15
2.3 Genética e Doença de Alzheimer	15
2.3.1 <i>APOE</i>	17
2.3.1.1 O gene <i>APOE</i>	17
2.3.1.2 Apolipoproteína E - ApoE.....	19
2.3.1.3 Isoformas da ApoE	20
2.3.2 BUTIRILCOLINESTERASE	23
2.3.2.1 GENE <i>BCHE</i>	23
2.3.2.2 Polimorfismo do gene <i>BCHE</i>	24
2.3.2.3 A Variante <i>K</i> e risco para Doença de Alzheimer.....	25
2.3.2.4 Proteína BChE	29
2.3.2.5 Funções da BChE	31
2.3.3 <i>SLITRK3</i>	32
2.3.3.1 Slitrk e a Formação de Neuritos.....	34
2.3.4 Neprilísina	36
2.3.4.1 O gene <i>MME</i>	36
2.3.4.2 Neprilísina	36
2.3.4.3 Neprilísina e Alzheimer	37
2.3.5 Grelina.....	41
2.3.5.1 O gene <i>GHRL</i>	41
2.3.5.2 A Grelina	41
3. OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo Geral	43
3.2 Objetivos específicos	43
4. JUSTIFICATIVA	45
CAPÍTULO I	47
Analysis of L72M GHRL variant and Alzheimer's disease in a Brazilian Population	47
ABSTRACT	47
INTRODUCTION	48
METHODS	48
RESULTS	49
DISCUSSION	50
CONCLUSION	51
REFERENCES	51
CAPÍTULO II	55
Association analysis between K and -116A variants of butyrylcholinesterase and Alzheimer's Disease in a Brazilian population.	55

ABSTRACT	55
INTRODUCTION	56
MATERIALS AND METHODS	57
RESULTS.....	58
DISCUSSION	59
REFERENCES	61
CAPÍTULO III	64
A Variante K da BCHE está associada à Doença de Alzheimer? Uma Avaliação ao nível Plasmático..	64
INTRODUÇÃO	64
MATERIAIS E MÉTODOS	66
RESULTADOS	70
DISCUSSÃO	80
REFERÊNCIAS	88
5. DISCUSSÃO GERAL	94
6. CONCLUSÕES	96
7. REFERÊNCIAS	97
APÊNDICE 1	124
Sandwich AChE ELISA - Protocol by Taher	127
Sandwich BChE ELISA Protocol.....	129

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida elevou-se também a prevalência de doenças crônico-degenerativas, como as demências. Demência refere-se a uma síndrome caracterizada pela deterioração progressiva encefálica com comprometimento cognitivo, funcional e comportamental. A estimativa global é que, dos 35,6 milhões de casos de demência em 2010, passem a 65,7 milhões até 2030. Além disso, quase dois terços dos idosos afetados tendem a ser de países de renda média e baixa (ADIC, 2011).

A doença de Alzheimer é uma afecção neurodegenerativa irreversível, de aparecimento insidioso, caracterizada clinicamente por um progressivo declínio da memória e outras funções cognitivas. Anatomicamente, se caracteriza pelo acúmulo extracelular da proteína beta amilóide ($A\beta$) na forma de placas (placa senil) e acúmulo da proteína tau hiperfosforilada, formando emaranhados neurofibrilares (NFT) (Braak e Braak, 1991).

A dinâmica das demências, em geral, ainda é pouco compreendida, o que torna difícil o diagnóstico diferencial, assim como o tratamento das mesmas. Ainda em fase de padronização, os marcadores biológicos em líquido (títulos do peptídeo beta-amilóide - $A\beta_{42}$ e da proteína Tau) estão sendo utilizados como diagnóstico diferencial para fins de pesquisa (Frota *et al.*, 2011).

Assim como aumentam os casos de demência, também cresce o número de pesquisas em busca de genes associados a elas, em DA já ultrapassam mil publicações a respeito (Hardy e Willians, 2010). A variante *K* (A539T) do gene da Butirilcolinesterase (*BCHE*) é um dos candidatos à DA, com ampla discussão sobre a presença ou ausência de associação com a doença.

A Butirilcolinesterase (BChE) é codificada pelo gene *BCHE* (3q26.1-q26.2) sendo uma proteína que, além de hidrolisar as colinas (acetilcolina e butirilcolina), atua na citogênese, morfogênese e tumorigênese, regulação da proliferação celular, o início da diferenciação neuronal durante o desenvolvimento, e também como desintoxicante de determinados produtos químicos e no metabolismo de lipoproteínas (VLD) (Giacobini, 2003).

A variante *K*, uma variante não usual da BChE, localizada no exon 4 (A539T; rs1803274), é associada com menor atividade da enzima (Rubinstein *et al.*, 1978). Porém, Furtado *et al.*, (2008) demonstraram que a variante *K* sozinha não reduz a atividade da BChE, sendo a variante *-116A* associada à essa diminuição. A variante transcrita, mas não codificante, *-116A*, e a variante *1914G* estão em desequilíbrio de ligação com a variante *K* e provavelmente afetam a transcrição e tradução do gene *BCHE*.

As análises da variante *K* em pacientes com DA esporádica tem sido controversas, alguns autores sugerem acréscimo de risco de DA para portadores da variante (Crawford *et al.*, 1998; Raygani *et al.*, 2004), enquanto outros sugerem um efeito protetor (Laws *et al.*, 1999; Bizzaro *et al.*, 2010) ou não encontram nenhuma associação (Singleton *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 1999), outros associam ainda ambos os efeitos (Bertram *et al.*, 2007; Podoly *et al.*, 2009). Alguns pesquisadores sugerem a associação de risco para DA e a variante *K* da *BCHE*, em sinergia com a variante *APOEε4* do gene *APOE* (Lehmann *et al.*, 1997; Grubber *et al.*, 1999, Darreh-Shori *et al.*, 2012). No entanto, nenhum dos trabalhos, até agora, levou em consideração as variantes *-116A*, *1914G* da *BCHE* e a variante *K*.

Alguns trabalhos sugerem que a divergência na associação da *BCHE* e DA pode ser resultante de um efeito carona com algum outro gene próximo ao gene *BCHE*. O gene *SLITRK3* está no cromossomo 3 (q26.2), próximo do gene *BCHE*, assim como o gene *MME* (3q21-27), codificante da proteína neprilina, que exerce um importante papel na degradação de Aβ (Iwata *et al.*, 2001; Farris *et al.*, 2003). A proteína *SLIT and NTRK-like family member 3* (*Slitrk3*) faz parte de uma família de proteínas neurais transmembrânicas que controlam o crescimento de neuritos (Aruga e Mikoshiba, 2003). O mecanismo de ação da *Slitrk3* ainda não é bem elucidado, mas é conhecida sua ação na supressão da formação de neuritos, processo o qual é desregulado na DA. Até o momento não foram realizadas investigação de associação entre o gene *SLITRK3* e DA. E para o gene *MME* e DA os estudos de associação são contraditórios.

Outro gene que apresenta um padrão de expressão modificado na DA é o da grelina (*GHLR*; 3p25-p26). A grelina é um hormônio multifuncional com redução observada em algumas regiões do cérebro como o hipocampo e o lobo temporal, ambas associadas ao sistema cognitivo e da memória (Gahete *et al.*, 2011). Não foram encontrados, até o presente, outros estudos de associação entre variantes da grelina e a DA na população euro-descendente.

Na doença de Alzheimer, existe uma perda generalizada dos neurônios colinérgicos e redução do neurotransmissor acetilcolina (ACh) (Davis *et al.*, 1997), resultando em uma disfunção colinérgica, característica da DA (Coyle *et al.*, 1983). Essas alterações são concomitantes a uma mudança significativa nos níveis de atividade das colinesterases, com redução na atividade da acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e aumento da atividade da butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) na via colinérgica (Perry *et al.*, 1978). A compreensão da dinâmica das colinesterases aos níveis líquido e neuronal são muito exploradas, porém,

poucos estudos avaliam este processo ao nível plasmático, o que é muito importante para compreensão da Doença de Alzheimer como um todo.

Desta forma, o presente trabalho avaliou, por meio de um estudo caso-controle, a associação de variantes do gene *BCHE* (*K*, *-116A* e *1914G*), assim como polimorfismos nos genes próximos a *BCHE*, *SLITRK3* (rs3828419 e rs17449213) e *MME* (rs13086740 e 2016846) e a Doença de Alzheimer. Avaliou-se ainda os polimorfismos do gene *APOE* (*APOEε2*, *APOEε3* e *APOEε4*) e *GHRL* (*L72M*) e a DA. Além da análise de associação foram mensurados, no Centro de pesquisa com Alzheimer do Instituto Karolinka - Estocolmo, os perfis protéicos da ApoE, BChE e AChE em pacientes e controles idosos, visando identificar o papel das colinesterases, em nível plasmático, na dinâmica da DA, e variantes genéticas envolvidas na patogênia da doença.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Demência

Demência é uma síndrome caracterizada pelo comprometimento funcional, com intensidade suficiente para interferir no desempenho social ou profissional do indivíduo, e cognitivo, atingindo este ao menos dois dos seguintes cinco domínios: memória, função executiva, linguagem, habilidade visual-espacial e alteração de personalidade (McKhann *et al.*, 2011). As demências podem afetar pessoas de qualquer idade, mas são prevalentes na forma senil. Segundo a Alzheimer's Society (2007), apresentam alguma forma de demência uma a cada cinco pessoas com mais de 80 e uma em cada vinte pessoas acima de 65 anos.

2.1.1 Diagnóstico de demência

Baseado nos critérios da *National Institute on Aging* (NIA) e *Alzheimer's Association* (AA) 2011 a Academia Brasileira de Neurologia adotou os critérios para diagnóstico de demência (Frota *et al.*, 2011) que na íntegra são:

1. Demência é diagnosticada quando há sintomas cognitivos ou comportamentais (neuropsiquiátricos) que:

- 1.1. Interferem com a habilidade no trabalho ou em atividades usuais;
- 1.2. Representam declínio em relação a níveis prévios de funcionamento e desempenho;
- 1.3. Não são explicáveis por *delirium* (estado confusional agudo) ou doença psiquiátrica maior;

2. O comprometimento cognitivo é detectado e diagnosticado mediante combinação de:

2.1. Anamnese com paciente e informante que tenha conhecimento da história; e

2.2. Avaliação cognitiva objetiva, mediante exame breve do estado mental ou avaliação neuropsicológica. A avaliação neuropsicológica deve ser realizada quando a anamnese e o exame cognitivo breve realizado pelo médico não forem suficientes para permitir diagnóstico confiável.

3. Os comprometimentos cognitivos ou comportamentais afetam no mínimo dois dos seguintes domínios:

3.1. Memória, caracterizado por comprometimento da capacidade para adquirir ou evocar informações recentes, com sintomas que incluem: repetição das mesmas perguntas ou assuntos, esquecimento de eventos, compromissos ou do lugar onde guardou seus pertences;

3.2. Funções executivas, caracterizado por comprometimento do raciocínio, da realização de tarefas complexas e do julgamento, com sintomas tais como: compreensão pobre de situações de risco, redução da capacidade para cuidar das finanças, de tomar decisões e de planejar atividades complexas ou sequenciais;

3.3. Habilidades visuais-espaciais, com sintomas que incluem: incapacidade de reconhecer faces ou objetos comuns, encontrar objetos no campo visual, dificuldade para manusear utensílios, para vestir-se, não explicáveis por deficiência visual ou motora;

3.4. Linguagem (expressão, compreensão, leitura e escrita), com sintomas que incluem: dificuldade para encontrar e/ou compreender palavras, erros ao falar e escrever, com trocas de palavras ou fonemas, não explicáveis por déficit sensorial ou motor;

3.5. Personalidade ou comportamento, com sintomas que incluem alterações do humor (labilidade, flutuações incharacterísticas), agitação, apatia, desinteresse, isolamento social, perda de empatia, desinibição, comportamentos obsessivos, compulsivos ou socialmente inaceitáveis.

De forma geral, o diagnóstico da síndrome demencial esta pautado no funcionamento cognitivo e no desempenho em atividades de vida diária. A avaliação cognitiva geralmente é realizada com testes de rastreio, como o Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) (Folstein *et al.*, 1975) somado a testes que avaliam diferentes componentes do funcionamento cognitivo como os de memória (evocação tardia de listas de palavras ou de figuras, por exemplo), os de fluência verbal (número de animais em um minuto) e o desenho do relógio (Petersen *et al.*, 2001). Escalas como PFEFFER (Pfeffer *et al.*, 1992) e o Índice de Katz (Katz *et al.*, 1970) auxiliam na avaliação das atividades de vida diária (AVD- Lawton e Brody, 1969).

A fim de classificar o grau da demência, é utilizado o teste Clinical Dementia Rating (CDR) um instrumento desenvolvido por Hughes et al, (1982) e adaptado por Morris (1991). Esse teste é uma escala numérica utilizada para quantificar a gravidade dos sintomas de demência. A Escala de Depressão Geriátrica de Yesavage, versão reduzida (GDS-15), é utilizada como instrumento de rastreio de depressão em idosos para diagnóstico diferencial entre demência e depressão, ou outros transtornos neuropsiquiátricos.

Todos os testes citados são utilizados como ferramentas que, somadas a uma avaliação clínica cuidadosa, incluindo anamnese detalhada, exames físico e neurológico, associado a determinações bioquímicas e de neuroimagem, podem possibilitar maior acurácia no diagnóstico diferencial das demências. Esses critérios têm sido confiáveis para o diagnóstico, em classe provável, com uma sensibilidade de 81% e especificidade de 70%, segundo estudos clínicos anatomopatológicos (Knopman *et al.*, 2001).

As avaliações bioquímicas na investigação etiológica e diferencial para síndrome demencial são o hemograma, o nível sérico de vitamina B12, função tireóidea, hepática e renal e reações sorológicas para sífilis (Knopman *et al.*, 2001). A partir destas avaliações, é possível a identificação de diversas causas potencialmente reversíveis de demência, assim como a detecção de eventuais doenças associadas (Caramelli e Barbosa, 2002).

Das neuroimagens, a tomografia ou, preferencialmente, a ressonância magnética do crânio deve ser realizada para excluir outras possibilidades diagnósticas ou co-morbidades, principalmente a doença vascular cerebral (McKhann *et al.*, 2011). As novas análises de imagem PET-amilóide (amyloid positron emission tomography) ou neuroimagem estrutural e funcional aumentam o grau de confiabilidade do diagnóstico clínico da demência, porém, são de difícil acesso e alto custo e tem sido utilizados apenas para fim de pesquisa (Frota *et al.*, 2011).

Todos estes critérios diagnósticos para demência ficam ao nível de demência provável, pois, a confirmação se dá apenas com análises pós-morte com características anatomopatológicas encefálicas, específicas para cada tipo de demência. Para chegar ao nível provável, o paciente já apresenta um quadro demencial estabelecido. Porém, muitos pacientes são avaliados em um nível de comprometimento cognitivo leve (CCL), que pode ou não evoluir para um estágio demencial. Pacientes com CCL têm um risco aumentado para o desenvolvimento de demência e tem sido relatado que, por ano, de 10% a 15% dos pacientes CCL evoluem para o quadro demencial. (Petersen, 2004).

2.2. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (AD; MIM 605526) é a demência neurodegenerativa mais comum em idosos, afetando globalmente mais de 35,6 milhões de pessoas (Who, 2012 Report). A DA é caracterizada clinicamente pelo insidioso e progressivo declínio da memória e das funções cognitivas (McKhann *et al.*, 1984).

Patologicamente, a demência configura-se pela formação de placas amilóides extracelulares e nas paredes dos vasos sanguíneos (angiopatia amilóide cerebral), acúmulo de emaranhados neurofibrilares intracelulares (Figura 1) e nas extensões neuronais próximas às placas (neuritos distróficos) e distúrbios da neurotransmissão com perda neuronal e atrofia cerebral (Wiltfang *et al.*, 2001; Boche e Nicoll, 2010).

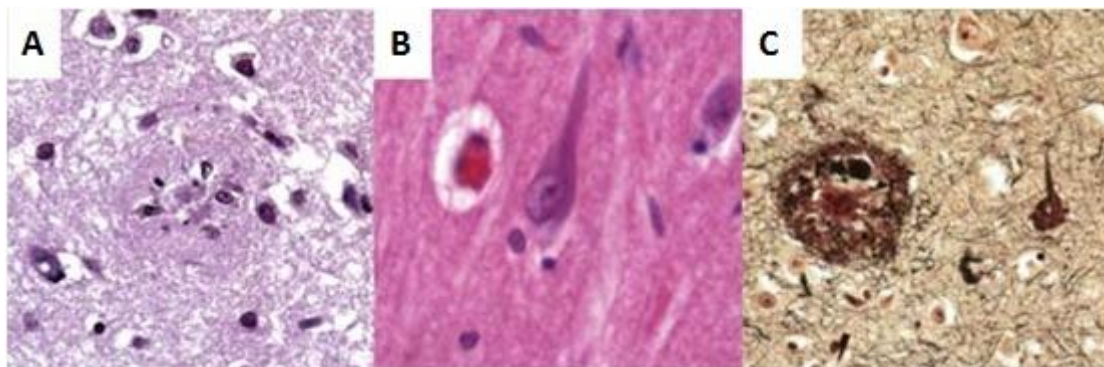


Figura 1. Fotomicrografias das principais lesões patológicas observadas na doença de Alzheimer. (A) Placas amilóides evidentes por coloração HeE (hematoxilina e eosina) de rotina no córtex frontal; (B) emaranhado neurofibrilar em neurônio piramidal do hipocampo corada em HeE de rotina e (C) coloração de prata para ambas, placa e emaranhado (FONTE: Serrano-Pozo *et al.*, 2011).

As alterações neuronais ocorrem, preferencialmente, nas camadas piramidais do córtex cerebral afetando principalmente as estruturas límbicas e córtices associativos. O lobo temporal inferior, superior e médio-frontal são gravemente afetados, enquanto que as regiões corticais primárias do lobo frontal inferior e os giros órbito-frontal são preservadas. O declínio neural é acentuado na região do hipocampo, amígdala e córtex entorrinal (Braak e Braak, 1991; Halliday *et al.*, 2003). O padrão degenerativo neurofibrilar nas regiões encefálicas se dá com lesões iniciais no córtex entorrinal/perirrinal, em seguida nos subcampos hipocámpais e posteriormente no córtex de associação, e finalmente no neocórtex primário (Serrano-Pozo *et al.*, 2011).

Funcionalmente, os déficits cognitivos na DA estão associados com a degeneração progressiva do sistema límbico (Arnold *et al.* 1991.; Klucken *et al.* 2003), das regiões neocorticais (Terry *et al.* 1991) e do prosencéfalo basal (Teipel *et al.* 2007). Por meio de estudos clinicopatológicos, demonstrou-se que a quantidade e a distribuição dos emaranhados neurofibrilares, diferentemente das placas β -amilóides, estão correlacionadas com a gravidade e o declínio na demência (Giannakopoulos *et al.* 2003; Ingelsson *et al.* 2004).

Os pacientes com DA, inicialmente, apresentam um proeminente comprometimento da memória episódica. Essa perda é explicada pelo isolamento das estruturas mediais do lobo temporal, em relação ao isocórtex de associação e aos núcleos subcorticais como consequência da degeneração neurofibrilar contínua. Conforme a degeneração progride nas áreas de associação isocorticais aparecem os sintomas de comprometimento progressivo de domínios cognitivos adicionais (Tabela 1), incluindo disfunção executiva por alterações no

córtex pré-frontal, as apraxias (córtex parietal), déficits de localização e viso-espaciais (córtex occipitoparietal), déficits perceptivo-visuais (córtex occipitotemporal) e memória semântica (córtex temporal anterior), chegando à instauração completa da síndrome demencial (Revisão de Serrano-Pozo *et al.*, 2011). O tempo e a gravidade para cada um dos sintomas acima citados são amplamente diversos de paciente para paciente.

Tabela 1. Principais funções cognitivas afetadas em pacientes com a Doença de Alzheimer (FONTE: Ioshimoto, 2010).

Aspectos clínicos debilitados	Características
Memória	O déficit de memória é uma das primeiras características apresentadas pelo paciente com DA.
Múltiplas funções cognitivas	Disfalias, afasias, agnosias, apraxias e dificuldades na aprendizagem e julgamento.
Funções executivas associadas ao lobo frontal	Perda do pensamento abstrato, planejamento, diminuição da fluência verbal.
Personalidade	Perda do controle emocional.
Percepção visual	O paciente se sente disperso e desorientado em sua própria casa e/ou apresenta dificuldade em reconhecer os rostos dos familiares
Sintomas psiquiátricos associados	Paranóide, depressão, ansiedade, alucinações e agressividade.

2.2.1 Diagnóstico

Os critérios para diagnóstico clínico utilizados também são baseados nos critérios da *Alzheimer's Association* (AA) e *National Institute on Aging* (NIA) de (2011) (Frota *et al.*, 2011). Contudo, os critérios são aplicáveis para o diagnóstico após a instauração do quadro clínico. Estudos neuropatológicos têm verificado que alterações patológicas encontradas na DA podem estar presentes em indivíduos assintomáticos (Price *et al.*, 2009). Neste sentido, o emprego de biomarcadores contribui na identificação de DA em fases iniciais e também aumenta a especificidade do diagnóstico em pacientes com a demência instaurada (Forlenza *et al.*, 2010; Jack *et al.*, 2011; Reitz *et al.*, 2011).

Os biomarcadores disponíveis para a DA visam à detecção do peptídeo β -amiloide ($A\beta$ -42), da proteína TAU e TAU hiperfosforilada (Fosfo - TAU) que apresentam correlação

com a patologia da DA (Forlenza *et al.*, 2010). Os níveis de A β 1-42 e de TAU total (Fosfo-TAU) do líquido cefalorraquidiano (LCR) são marcadores validados que podem auxiliar o diagnóstico preciso da doença de Alzheimer numa fase inicial da doença. Os pacientes DA ou com comprometimento cognitivo leve apresentam menores níveis de A β 1-42 e níveis mais elevados de T-TAU do que aqueles indivíduos cognitivamente normais (Ewers *et al.*, 2007). E os níveis de T-TAU no LCR aumentam com a progressão da DA (Andreasen *et al.*, 2001).

Outro biomarcador para DA é a ressonância magnética funcional (fMRI) que permite a visualização da atividade neuronal conforme as regiões específicas ativadas no cérebro. O método mais comum é fMRI nível-dependente de oxigênio no sangue (blood oxygen level-dependent - BOLD), que mede alterações no fluxo sanguíneo com base nas mudanças na desoxihemoglobina. Sinais BOLD facilitam a caracterização de anormalidades funcionais em regiões específicas do cérebro. Pacientes com DA tem atividade cerebral reduzida na região parietal e hipocampo, em comparação com controles (Rombouts *et al.*, 2000; Reitz *et al.*, 2011). Porém, existe a limitação da variabilidade intra-individual que limita o uso de tais sinais no diagnóstico diferencial de demência.

A tomografia por emissão de prótons (PET) também tem sido avaliada como biomarcador, com uso principalmente do traço 2-[^{18}F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose (^{18}F -FDG), que fornece uma medida do metabolismo da glicose cerebral. Em estágios iniciais da DA, o PET- ^{18}F -FDG- revela um padrão característico de hipometabolismo na região do cíngulo posterior e regiões parietotemporais que se espalha para os córtices pré-frontais (Small *et al.*, 2008) conforme pode ser visto na figura 2. O PET- ^{18}F -FDG tem uma alta sensibilidade (94%), mas baixa especificidade (73-78%) para o diagnóstico de demência (Silverman *et al.*, 2004).

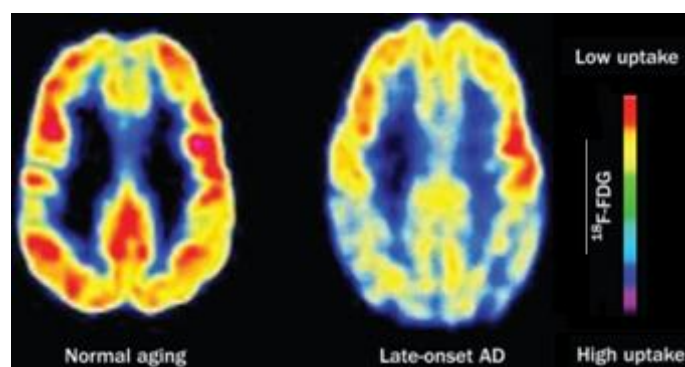


Figura 2. Alterações reveladas por PET no cérebro com DA. Os padrões de PET ^{18}F -FDG característicos de atividade metabólica em indivíduos cognitivamente normais e pacientes com DA de início tardio (Fonte: Reitz *et al.*, 2011).

A aplicação de biomarcadores como critérios diagnósticos para DA está em processo de validação. Para os casos de comprometimento cognitivo leve (CCL) os biomarcadores são úteis para fins de pesquisa, pois não existe tratamento preventivo para DA (Jack *et al.*, 2011).

Os critérios diagnósticos no Brasil seguem os critérios mundiais (Mckhann *et al.*, 2011), conforme o consenso realizado pelo Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia (Frota *et al.*, 2011) que, na íntegra são:

1. Demência da doença de Alzheimer provável

Preenche critérios para demência e tem adicionalmente as seguintes características:

1.1. Início insidioso (meses ou anos).

1.2. História clara ou observação de piora cognitiva.

1.3. Déficits cognitivos iniciais e mais proeminentes em uma das seguintes categorias:

- Apresentação amnésica (deve haver outro domínio afetado).

- Apresentação não-amnésica (deve haver outro domínio afetado).

- Linguagem (lembranças de palavras).

- Visual-espacial (cognição espacial, agnosia para objetos ou faces, simultaneoagnosia, e alexia).

- Funções executivas (alteração do raciocínio, julgamento e solução de problemas).

1.4. Tomografia ou, preferencialmente, ressonância magnética do crânio deve ser realizada para excluir outras possibilidades diagnósticas ou co-morbidades, principalmente a doença vascular cerebral.

1.5. O diagnóstico de demência da DA provável não deve ser aplicado quando houver:

- Evidência de doença cerebrovascular importante definida por história de AVC temporalmente relacionada ao início ou piora do comprometimento cognitivo; ou presença de infartos múltiplos ou extensos; ou lesões acentuadas na substância branca evidenciadas por exames de neuroimagem; ou

- Características centrais de demência com corpos de Lewy (alucinações visuais, parkinsonismo e flutuação cognitiva); ou

- Características proeminentes da variante comportamental da demência frontotemporal (hiperoralidade, hipersexualidade, perseveração); ou

- Características proeminentes de afasia progressiva primária manifestando-se como a variante semântica (também chamada demência semântica, com discurso fluente, anomia e dificuldades de memória semântica) ou como a variante não-fluente, com agramatismo importante; ou

- Evidência de outra doença concomitante e ativa, neurológica ou não-neurológica, ou de uso de medicação que pode ter efeito substancial sobre a cognição.

Os seguintes itens, quando presentes, aumentam o grau de confiabilidade do diagnóstico clínico da demência da DA provável:

- Evidência de declínio cognitivo progressivo, constatado em avaliações sucessivas;
- Comprovação da presença de mutação genética causadora de DA (genes da APP e presenilinas 1 e 2);
- Positividade de biomarcadores que reflitam o processo patogênico da DA (marcadores moleculares através de PET ou líquido; ou neuroimagem estrutural e funcional).

2. Demência da doença de Alzheimer possível

O diagnóstico de demência da DA possível deve ser feito quando o paciente preenche os critérios diagnósticos clínicos para demência da DA, porém apresenta alguma das circunstâncias abaixo:

2.1. Curso atípico: início abrupto e/ou padrão evolutivo distinto daquele observado usualmente, isto é lentamente progressivo.

2.2. Apresentação mista: tem evidência de outras etiologias conforme detalhado no item 4 dos critérios de demência da DA provável (doença cerebrovascular concomitante; características de demência com corpos de Lewy; outra doença neurológica ou uma co-morbidade não-neurológica ou uso de medicação as quais possam ter efeito substancial sobre a cognição).

2.3. Detalhes de história insuficientes sobre instalação e evolução da doença.

3. Demência da doença de Alzheimer definida

Preenche critérios clínicos e cognitivos para demência da DA e exame neuropatológico demonstra a presença de patologia da DA segundo os critérios do NIA e do Reagan Institute Working Group (Hyman *et al.*, 1997) com um número substancial de emaranhados neurofibrilares neocorticais (NFTS) na autópsia conforme padronizado por Braak *et al.*, (1993) e um número substancial de placas amilóides neuríticas quantificada pelo escore CERAD (Mirra, 1997).

2.2.2 Prevalência

A Doença de Alzheimer corresponde a aproximadamente 62% de todas as demências, sendo mais prevalente nas mulheres (67%) do que nos homens (55%) (Figura 3) (Alzheimer's society, 2007). O maior fator de risco para a demência é a idade e, conforme estimativas é previsto um acentuado envelhecimento demográfico para regiões como China, Índia e América Latina (Alzheimer's Disease International, 2008).

Segundo Nitrini *et al.* (2009), na América Latina, a prevalência total das demências é equivalente às encontradas nos países desenvolvidos (7,1%), no entanto, ocorre em indivíduos relativamente mais jovens (65-69 anos). O pesquisador salienta ainda que a taxa de analfabetismo entre os idosos na América Latina é de 9,3%, sendo a prevalência de demência em analfabetos duas vezes maior do que nos alfabetizados.

2.2.3 Etiologia

A principal hipótese para a patogênese da DA é a hipótese da cascata β -amiloide (Hardy, 2006, Xu *et al.*, 2014) com evidências de que os agregados fibrilares do peptídeo β -amiloide são neurotóxicos (Pike *et al.*, 1993; Grace *et al.*, 2002), assim como as formas oligoméricas de $A\beta$, incluindo pequenas estruturas globulares (2,7-6,0 nm de diâmetro) chamados de derivados- $A\beta$ ligantes difusíveis ($A\beta$ -derived diffusible ligands ou ADDLs) (Kayed *et al.*, 2003; Lacor *et al.*, 2007; De Felice *et al.*, 2009). Apesar destas evidências o mecanismo causador das lesões aos neurônios, através da $A\beta$, ainda não está claramente estabelecido (De Felice *et al.*, 2004).

Os emaranhados neurofibrilares são formados por estruturas como filamentos helicoidais pareados (FHP) contendo a proteína tau hiperfosforilada anormal, o que resulta em perda da função tau de promover a montagem e estabilização dos microtúbulos, como também em um ganho de função tóxica em que a tau patológica (FHP - TAU) sequestra as formas normais da tau, MAP1A/MAP1B e MAP2, causando inibição e rompimento dos microtúbulos. Este ganho tóxico de função da proteína TAU parece ser apenas devido à sua hiperfosforilação anormal. Lenta e progressivamente, os neurônios afetados sofrem uma degeneração retrógrada pela instabilidade do sistema microtubular e prejuízo no transporte axoplasmático (Cleveland e Hoffmann, 1991; Revisão Iqbal *et al.*, 2005). Apesar de não patognomônica, a tauopatia contribui com o processo neurodegenerativo na DA.

Tem sido plausível de questionamento na literatura se, as placas amiloides são causa ou consequência na Doença de Alzheimer, assim como a proteína hiperfosforilada TAU nos emaranhados neurofibrilares. Para alguns pesquisadores como Serrano-Pozo *et al.* (2011) as lesões neuropatológicas clássicas, incluindo as placas senis e emaranhados neurofibrilares, provavelmente representam a "ponta do iceberg" das alterações patológicas que causam o declínio cognitivo associado à DA.

Outros possíveis agentes fisiopatológicos na doença de Alzheimer são as colinesterases com importante papel devido à ação de hidrólise da acetilcolina. Estas enzimas são encontradas nas sinapses, mediando quimicamente a transmissão de impulsos nervosos através de fibras pré-ganglionares parassimpáticas e pós-ganglionares simpáticas na via colinérgica das regiões encefálicas comprometidas na DA (Knapp et al., 1994 e Narahashi *et al.*, 2004). A perda extensiva de células neurais no neocórtex, amígdala e hipocampo levam ao déficit colinérgico na doença de Alzheimer (Hohmann e Coyle, 1988), o que conduziu à proposição da hipótese colinérgica. A hipótese colinérgica associa os sintomas cognitivos, comportamentais e funcionais presentes na DA com a perda dos neurônios colinérgicos causando deficiência na neurotransmissão (Cummings e Back, 1998). O sistema colinérgico se estende do prosencéfalo projetado difusamente até o córtex cerebral. (Lanctôt *et al.*, 2003).

2.2.4 Tratamento

Atualmente, cinco drogas são aprovadas pela FDA para o tratamento da AD, sendo quatro inibidores de colinesterase (ChEIs) e a Memantina, um antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (revisão Casey et al., 2010).

2.2.4.1 Inibidores Colinesterásicos

Os inibidores das colinesterases constituem a primeira linha de tratamento para a doença de Alzheimer e foram os primeiros medicamentos aprovados pela FDA (US Food and Drug Administration) para o tratamento de déficits cognitivos na doença de Alzheimer (Farlow *et al.*, 1992; Rogers e Friedhoff, 1996). A estratégia terapêutica dos ChEIs visa melhorar as condições clínicas do paciente com doença de Alzheimer através da restauração da neurotransmissão colinérgica, pelo atraso na degradação da acetilcolina liberada nas fendas sinápticas (Birks *et al.*, 2000; Birks, 2006).

Os inibidores da colinesterase são o donepezil, galantamina e rivastigmina. Estas substâncias diferem principalmente em relação ao tipo de ligação com as colinesterases (AChE e BChE).

A Rivastigmina é um carbamato que inibe reversivelmente a AChE e a BChE, sendo a droga indicada para demência leve a moderadamente severa. O mecanismo de inibição é

pseudo-irreversível com formação de um produto de clivagem fenólica, com atividade farmacológica mínima e rápida excreção. Ocorre a formação de um complexo carbamilado com as enzimas colinérgicas, que impede a hidrólise da acetilcolina por inibição competitiva e duradoura (Lanctôt *et al.*, 2003; Gauthier *et al.*, 2007).

O donepezil foi a segunda droga com ação anticolinesterásica, aprovada pelo FDA em 1996 e pela ANVISA em 2000 e pertence à classe das piperidinas. Este inibidor tem alta afinidade pela AChE e é um inibidor de ligação não covalente com propriedades competitivas e não-competitivas. Esta droga possui uma meia-vida muito longa, de até 72h (Gomes e Koszuoski, 2005).

A galantamina é um tipo de alcalóide fenantrênico com efeito de inibição competitiva. É a droga mais recente no grupo das IChEs, aprovada pela ANVISA em 2001, e também atua como modulador nicotínico (Lanctôt *et al.*, 2003). O efeito de inibição colinérgica é reversível sobre a AChE e possui maior tolerabilidade em DA leve e moderada (Farlow *et al.*, 2008).

Os três inibidores da colinesterase tem sido classificados como eficazes para AD leve ou moderada e o máximo que estas drogas podem alcançar é a modificação das manifestações clínicas na doença de Alzheimer de forma paliativa, ou seja, com eficácia momentânea e incompleta (Qaseem *et al.*, 2008). Após a eliminação da droga e seus metabólitos os efeitos inibidores são reduzidos diminuindo, desta forma, os riscos de interações medicamentosas (Forlenza, 2005). Porém, a ligação dos ChEIs por desativar as colinesterases reduzindo a degradação enzimática normal da molécula de acetilcolina (acetil-CoA e colina) no sistema nervoso, também aumenta a atividade da acetilcolina no sangue periférico gerando efeitos colaterais. Estes efeitos são geralmente náuseas, problemas gastrointestinais, depressão e diarreia. Os efeitos colaterais menos comuns são fraqueza muscular, síncope e perda de peso significativa.

Em uma meta-análise, Lanctôt *et al.*, (2003), apontam que 5-8% dos pacientes com DA em uso de inibidores colinérgicos apresentam reações adversas ao medicamento. Os pacientes que respondem positivamente à terapia são em torno de 15,7%. O número de não respondedores ao medicamento é grande (Lanctôt *et al.*, 2003; Raschetti *et al.*, 2005) e o efeito terapêutico é geralmente de curta duração (Pepeu e Giovannini, 2009; Persson *et al.*, 2009). Segundo Cerbai *et al.* (2007), não há relação simples e direta entre o grau de inibição das colinesterases e o aumento dos níveis de acetilcolina. As diferenças particulares em resposta aos inibidores podem decorrer da interferência da idade na sensibilidade para os ChEIs (Cerbai *et al.*, 2007), da afinidade preferencial para diferentes formas moleculares dos inibidores (Ogane *et al.*, 1992; Zhao e Tang, 2002), entre outros fatores a serem explorados.

2.2.4.2 Medicamento de via Glutamatérgica

A droga com atuação em transmissão neuronal glutamatérgica é a Memantina, um antagonista não competitivo do receptor N-metil-D-aspartato utilizada em pacientes na fase moderada ou grave da DA (Winblad e Poritis, 1999). Como os níveis patologicamente elevados do glutamato podem conduzir à formação de neuritos distróficos, esta droga possui mecanismo de ação que visa impedir os efeitos dos níveis elevados de glutamato sináptico (Danysz *et al.*, 2000). A Memantina é bem tolerada nos casos de demência com corpos de Lewy e doença de Parkinson (Aarsland *et al.*, 2009).

Um estudo de revisão (Araújo e Pondé, 2006) aponta para uma leve melhora da capacidade funcional, das atividades da vida diária e dos distúrbios comportamentais em pacientes tratados com Memantina, sem melhora significativa na cognição.

2.3 Genética e Doença de Alzheimer

O fator de risco mais forte para as demências é a genética e, segundo alguns autores, cerca de 60% a 80% do risco de um indivíduo vir a desenvolver DA é dependente de seu perfil genômico (Gatz *et al.*, 2006; Bertram *et al.*, 2010). No entanto, apenas 2% dos casos de DA são causadas por mutações específicas (Tanzi e Bertram 2005), na maioria dos casos, a DA é de origem multifatorial com diferentes níveis de gravidade e geneticamente heterogênea (Gatz *et al.*, 2010).

Em geral, são reconhecidos dois subgrupos na Doença de Alzheimer, a mais frequente, em que os primeiros sintomas clínicos se tornam aparentes a partir dos 65 anos, de início tardio (late-onset AD – LOAD), conhecida também como DA esporádica (Revisão Bettens *et al.*, 2010). O outro subtipo, que corresponde a menos de 5% dos casos de DA tem início por volta dos 65 anos, ou antes, e é chamada de DA de início precoce (early-onset AD -EOAD), sendo esta, em cerca de 13% dos casos, de herança autossômica dominante (Campion *et al.*, 1999). A DA familiar pode ser explicada em 71% dos casos por mutações no gene da proteína precursora β -amilóide (APP), com mais de 28 mutações associadas a DA, e/ou através dos mais de 100 polimorfismos associados aos genes das Presenilina (PSEN1 e PSEN2) (Tabaton *et al.*, 2007; Bagyinszky *et al.*, 2014).

A proteína precursora β -amilóide (APP) é uma proteína transmembrana tipo I com três principais isoformas de 695 (mais comum), 751 e 770 aminoácidos codificadas pelo gene

APP (21q21.2). A APP é exposta na membrana plasmática ao longo dos dendritos após processamento intracelular e algumas são internalizadas em endossomos de reciclagem (Koo *et al.*, 1990). É cogitada a possibilidade da APP ser submetida ao processamento proteolítico na via secretora, na membrana plasmática, e/ou na via endocítica, e defeitos nestas vias podem estar associados a com alterações no metabolismo gerador da A β 42 (Revisão Suzuki *et al.*, 2006).

A APP é clivada por α -secretases (ADAM10 e ADAM17 (Novak, 2004)), β -secretases (BACE1 e BACE2 (Huovila *et al.*, 2005)) e γ -secretases (um complexo de presenilinas PSEN1 e PSEN2, APH, nicatrina e PEN2 (Takasugi *et al.*, 2003)). Proteínas β -amilóide resultam da clivagem da APP pela β e γ -secretases, formando as placas senis na DA (Figura 3). No cérebro saudável, são depositadas principalmente A β 40 e A β 42, que diferem de acordo com a região C-terminal da proteína (Iwatsubo *et al.*, 1994). Na DA a A β 42 é a espécie predominantemente depositada, capaz de agregar mais facilmente do que A β 40 (Dominguez *et al.*, 2005). Os agregados estão associados à perda de sinapses, prejuízo das funções neuronais e perda de neurônios. Neuritos distróficos e inchaço axonal também são observados nas regiões de formação das placas senis (Shoji *et al.*, 1990).

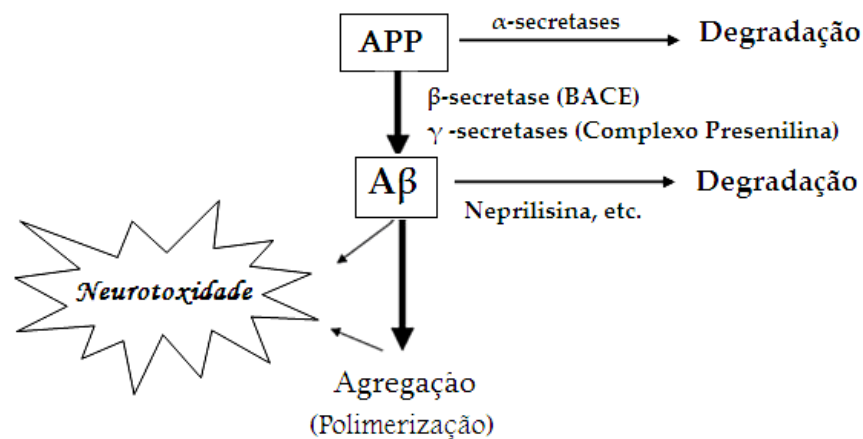


Figura 3. Hipótese da cascata amiloide e formação das placas senis em DA. Esta hipótese propõe uma série de eventos patogênicos que conduzem à doença de Alzheimer (AD). A acumulação da β -amilóide cerebral é o principal fator e é resultante de um desequilíbrio entre produção de A β , acumulação e formação das fibrilas A β (Fonte: Hamaguchi *et al.*, 2006).

Com base no papel neurotóxico da A β , a imunização anti-A β vem sendo amplamente investigada para o tratamento da DA (Schenk *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 2000; Kotilinek *et al.*, 2002; Lemere *et al.*, 2003; Serrano-Pozo *et al.*, 2010). A inibição das β e γ -secretases

também é alvo das pesquisas para tratamento da DA (ex. Citron, (2004) investiga o inibidor da BACE1 e Weggen *et al.*, (2001) para γ -secretase).

Mutações nos genes das presenilinas (*PSEN1* e *PSEN 2*), constituinte das γ -secretases, são geralmente de substituição de um único nucleotídeo. Pequenas deleções ou inserções também já foram encontradas. As mutações ocorrem ao longo da proteína, frequentemente em alguns grupos dentro dos domínios transmembrânicos ou nos laços hidrofílicos em torno desses domínios (Cruts e Broeckhoven, 1998). Estas mutações podem prejudicar o processo de clivagem da APP, resultando em um aumento da A β 42 ou na diminuição da A β 40 (Revisão Bettens *et al.*, 2010).

Segundo Hardy e Willians (2010), de 1993 a 2009 mais de mil estudos de associação genética com a doença de Alzheimer foram publicados. Dos quase 700 genes candidatos investigados durante os últimos 30 anos, poucos mostram efeitos significativos de risco para DA quando são combinados (Bertram e Tanzi, 2008). Na DA esporádica foi irrefutavelmente reconhecida como um fator de risco o alelo *APOE4* do gene da apolipoproteína E (*APOE*), (Coon *et al.*, 2007). Estudos de associação genômica ampla (Genome-wide association study - GWAs) incluíram os alelos dos genes *CLU*, *PICALM*, *SORL1*, *BIN1*, *CR1* (Belbin *et al.* 2010; Biffi *et al.*, 2010; Jun *et al.*, 2010; Seshadri *et al.*, 2010), e mais recentemente, o *TREM2* e *CD33* (Guerreiro *et al.*, 2013; Bradshaw *et al.*, 2013).

2.3.1 APOE

Os polimorfismos no gene *APOE* (19q13.2) foram uma das primeiras alterações moleculares associadas com ocorrência da DA (Weisgraber *et al.*, 1981). Muitas pesquisas tem verificado a associação do alelo ϵ 4 da *APOE* com DA familiar (Strittmatter *et al.*, 1993) e esporádica (Poirier *et al.*, 1993).

2.3.1.1 O gene APOE

O gene *APOE* contém quatro exons e três introns, comprimento aproximado de 3,7 kb (Das *et al.*, 1985; Paik *et al.*, 1985). O gene *APOE* possui três alelos comuns (ϵ 2, ϵ 3 e ϵ 4) e produz três isoformas proteicas que diferem somente em dois resíduos de aminoácido nas posições 112 e 158 (Weisgraber *et al.*, 1981), sendo apoE2 (Cys112, Cys158), apoE3

(Cys112, Arg158) e apoE4 (Arg112 Arg158) (Mahley e Ralf Jr., 1995) (Figura 4a). Outras variantes extremamente raras da *APOE* são a *APOE* ϵ 1, *APOE* ϵ 5 e *APOE* ϵ 7.

O *APOE* ϵ 3 é o alelo com maior frequência (70-80%) em comparação com 15-20% para *APOE*4 (Mahley *et al.*, 2006). Na população caucasiana a distribuição de *APOE* ϵ 2 é de 8%, *APOE* ϵ 3 de 78% e *APOE*4, 14% (Martins *et al.*, 1995). O alelo *APOE* ϵ 2 é o menos frequente e tem sido associado com proteção contra o desenvolvimento da DA (revisão Laws *et al.*, 2003; Bu, 2009).

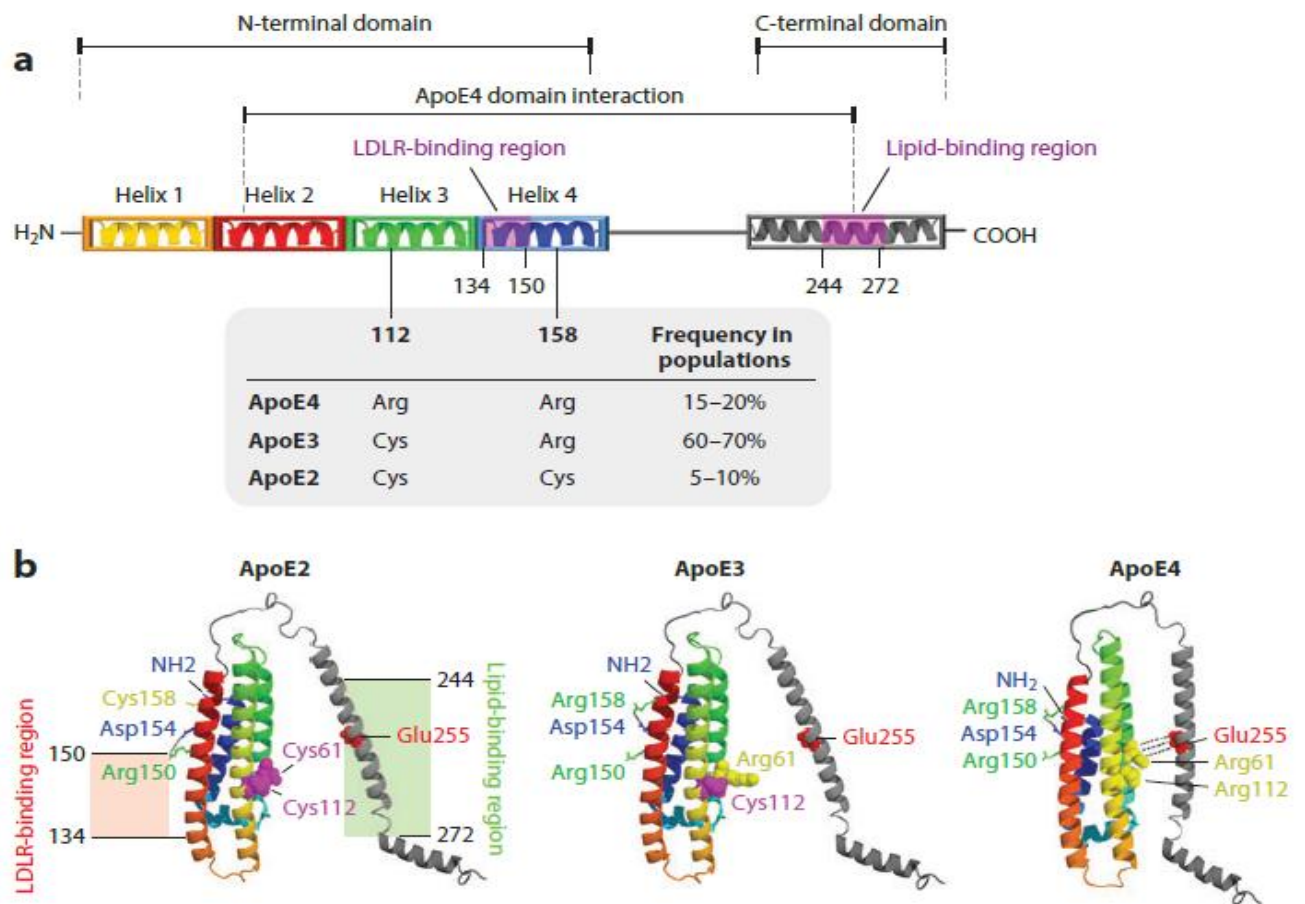


Figura 4. Gene humano da apolipoproteína E humana. **a.** Diagrama linear da estrutura lipoprotéica com domínio N-terminal que contém as duas posições polimórficas, 112 e 158, que distinguem as três isoformas comuns APOE. **(b)** Modelo da estrutura tridimensional. Abreviaturas: APOE, apolipoproteína E; LDLR, receptor de lipoproteína de baixa densidade. (FONTE: Yu *et al.*, 2014)

O alelo *APOE4* em homozigose representa um risco 10 vezes maior que os outros genótipos, na manifestação da doença de Alzheimer (Corder *et al.*, 1993; Roses, 1996). Os doentes expressando o alelo *APOE4* tem uma idade mais precoce de início e capacidade reduzida para a plasticidade sináptica (Lai *et al.*, 2006). Cerca de 40-65% dos pacientes DA tem pelo menos uma cópia do *APOE4* (Huang, 2006).

No Brasil, um estudo realizado no estado de São Paulo, identificou que o risco dos indivíduos com ao menos um alelo *APOE4* serem diagnosticados com DA foi 2,63 vezes maior do que para aqueles sem este alelo (Almeida e Shimokomaki, 1997). Cação *et al.*, (2007) também verificaram, em populações brasileiras, uma associação do alelo $\epsilon 4$ com a DA tanto familiar quanto esporádica. Porém, apesar desta associação, a *APOE4* não é necessária nem suficiente para o desenvolvimento da doença, pois, a DA é uma doença multifatorial, onde outros fatores de risco genéticos também atuam de forma significativa na origem da doença, além dos fatores ambientais.

A transcrição do gene *APOE* resulta em um mRNA de 1163 pb (McLean *et al.*, 1984). A tradução do mRNA produz uma forma isoprotéica pré-ApoE de 317 aminoácidos. A forma isoprotéica 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 por 299 aminoácidos (Rall *et al.*, 1982).

Polimorfismos na região promotora da *APOE* podem contribuir de forma individual ao risco de desenvolver a DA. O polimorfismo mais investigado é na posição -491, uma transversão *A/T*, cujo genótipo -491 *A/A* tem uma forte associação com a DA (Bullido *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 1998) enquanto o genótipo -491 *T/T* apresentou um efeito protetor (Casadei *et al.*, 1999; Laws *et al.*, 1999). Wang *et al.*, (2000) argüem que o genótipo 491AA possivelmente representa um fator de risco para DA independente do alelo *APOE* $\epsilon 4$, pois não encontraram interação entre ambos no aumento de risco para a doença.

2.3.1.2 Apolipoproteína E - ApoE

A Apolipoproteína E 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 $A\beta$ (Phu *et al.*, 2005; Tamamizu-Kato *et al.*, 2008). A ApoE tem importante papel na absorção, transporte e

redistribuição de colesterol, que é necessário ao reparo e manutenção do tecido nervoso (Mahley e Rall., 2000).

A ApoE é sintetizada em vários órgãos, principalmente no fígado, pelas células hepáticas parenquimatosas e no encéfalo pelos astrócitos, sendo uma das principais lipoproteínas do sistema nervoso central (Mahley, 1988; Mahley *et al.*, 1984; Boyle *et al.*, 1985). 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 (Siest *et al.*, 1995; Mahley e Rall Jr., 2000).

Os neurônios possuem receptores para endocitose da ApoE e defeitos na ApoE ou em seus receptores podem provocar o acúmulo de lipoproteínas (Xu *et al.*, 1998). As funções de mediação, captação e redistribuição de colesterol dentro do SNC, realizados por intermédio da ApoE, são importante para plasticidade cerebral (Moestrup *et al.*, 1992.; Rebeck *et al.*, 1993; Bu *et al.*, 1994).

Nos tecidos periféricos, a ApoE interage com lipoproteínas de baixa densidade LDL e LRP, permitindo a remoção de partículas a elas ligadas, no fígado. No SNC, a LDL e LRP associados à ApoE também são necessários, e atuam na homeostase da plasticidade neural (Moestrup *et al.*, 1992.; Rebeck *et al.*, 1993; Bu *et al.*, 1994) e no crescimento dos neuritos.

Poirier *et al.* (1991) verificaram que, em resposta a lesões no córtex entorrinal, uma das primeiras regiões do cérebro a ser afetada pela DA, ocorre o aumento da expressão de mRNA da ApoE nos astrócitos. Portanto, é possível que a ApoE desempenhe um importante papel na reparação de neurônios danificados através da mediação de reciclagem dos componentes da membrana celular. Pesquisadores detectaram também aumento da expressão de mRNA ApoE no córtex frontal e temporal (Yamada *et al.*, 1995; Yamagata *et al.*, 2001) e no hipocampo (Żarów e Victoroff 1998) de pacientes com DA neuropatologicamente confirmada.

2.3.1.3 Isoformas da ApoE

Estruturalmente, ApoE4 difere da ApoE3 ou ApoE2 pela forma preferencial de "estado glóbulo fundido" ("molten globule state"- estrutura secundária globular e estrutura terciária sem rigidez) em que a densidade diminui a partir do centro do glóbulo para a periferia, o que reduz a estabilidade (*in vitro*) da ApoE4 em relação às outras isoformas

(Hatters *et al.*, 2006; Riddell *et al.*, 2008). Outra característica distinta da ApoE4 é a interação entre Arg-61 na porção N-terminal e Glu-255 no domínio carbóxi-terminal (Figura 4b). Esta interação resulta na ligação preferencial de ApoE4 a partículas lipoprotéicas de menor densidade e aumento da remoção da ApoE4 para a periferia (Raffai *et al.*, 2001).

Nathan *et al.*, (1994) verificaram que na presença de lipoproteínas de densidade muito baixa (beta-VLDL) e ApoE3 ocorreu um maior crescimento dos neuritos, enquanto que quando associadas a ApoE4 houve diminuição do crescimento. A inibição da extensão de neuritos por ApoE4 parece estar relacionada com alterações no citoesqueleto por meio de um efeito sobre a estabilidade dos microtúbulos (Nathan *et al.*, 1995). Estes efeitos podem ser mediados pela proteína TAU. *In vitro*, a lipoproteína ApoE3, mas não ApoE4, liga-se a TAU protegendo-a da hiperfosforilação, processo que inibe a habilidade da proteína TAU de estabilizar os microtúbulos (Strittmatter *et al.*, 1994; Lovestone *et al.*, 1996).

Estudos imunohistoquímicos constataram a presença da isoforma ApoE4 em placas amilóides e degenerações neurofibrilares. A ApoE4 parece ter uma maior afinidade pela A β do que as outras isoformas da ApoE, assim como um efeito acentuado na estimulação desta proteína a formação das fibrilas amilóides (Wisniewski e Frangione, 1992; Strittmatter *et al.*, 1993).

A ApoE4 tem sido considerada como fator de risco para várias doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson (Pankratz *et al.*, 2006), esclerose múltipla (Fazekas *et al.*, 2001), demência com corpos de Lewy, demência mista e demência alcoólica (Bang *et al.*, 2003; Hulse *et al.*, 2005), porém, a base molecular dos mecanismos que lhe tornam um fator de risco permanece obscura (Riddell *et al.*, 2008).

Muitas são as correlações do papel da ApoE na DA, conforme pode ser observado na Tabela 2. Uma das hipóteses para a patogênese é relativa à função de manutenção e reparo que as apolipoproteínas tem no SNC (Figura 5). Vários agentes estressores e prejudiciais podem causar lesões neuronais necessitando do reparo e remodelagem neuronal. Em resposta ao estresse ou lesão do SNC, os neurônios podem sintetizar ApoE. A ApoE3 e ApoE2 conferem proteção e apoio na reparação neuronal. Porém a ApoE4, em função de sua instabilidade, pode ser prejudicada na capacidade para suportar tais processos, resultando em alterações neurodegenerativas. A ApoE4 pode ainda sofrer proteólise neurônio-específica, resultando em fragmentos bioativos tóxicos que, no citosol, alteraram o citoesqueleto e perturbam o balanço energético mitocondrial, provocando a morte celular (Mahley *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2010).

Os trabalhos de Ramaswamy *et al.*, (2005) e Riddell *et al.*, (2008) verificaram ainda uma degradação preferencial de ApoE4 em relação à ApoE3 nos astrócitos, sugerindo que esta degradação poderia estar levando a uma redução do transporte do colesterol para os neurônios, afetando, assim, o reparo e manutenção com perda de plasticidade.

Com base nestas evidências, vários pesquisadores têm sugerido um potencial terapêutico na conversão da ApoE4 em uma estrutura mais próxima da ApoE3 através de modificações no domínio de ligação Arg-61 (Ye *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2011).

Tabela 2. Relação dos efeitos da ApoE3 e ApoE4 na doença de Alzheimer (Fonte: Mahley *et al.* 2006, modificado).

Efeitos	Referências
<i>Efeito protetor da ApoE3</i>	
Estimula o crescimento de neuritos	Nathan <i>et al.</i> (1994); Sun <i>et al.</i> (1998).
Protege da neurodegeneração	Buttini <i>et al.</i> (1999); Buttini <i>et al.</i> (2002).
Protege contra o declínio cognitivo	Raber <i>et al.</i> (2000).
Protege a <i>tau</i> da fosforilação	Strittmatter <i>et al.</i> (1994); Lovestone <i>et al.</i> (1996).
Efeito antioxidante	Lovestone <i>et al.</i> (1996); Lauderback <i>et al.</i> (2002).
Estimula o efluxo de colesterol	Gong <i>et al.</i> (2002); Fagan <i>et al.</i> (1999).
Estimula a liberação de A β	LaDu <i>et al.</i> (1994); Holtzman <i>et al.</i> (2000).
Estimula a plasticidade sináptica	Trommer <i>et al.</i> 2004
<i>Efeito prejudicial da ApoE4</i>	
Inibe o crescimento dos neuritos	Nathan <i>et al.</i> (1994); Bellosta <i>et al.</i> (1995).
Interrompe o citoesqueleto neuronal	Nathan <i>et al.</i> (1994); Holtzman <i>et al.</i> (1995)
Estimula a fosforilação da <i>tau</i>	Tesseur <i>et al.</i> (2000); Huang <i>et al.</i> (2001).
Causa neurodegeneração	Buttini <i>et al.</i> (1999); Buttini <i>et al.</i> (2000). Buttini <i>et al.</i> (2002).
Causa declínio cognitivo	Raber <i>et al.</i> (2000) Raber <i>et al.</i> (2002).
Fragments ApoE4 causam neurodegeneração	Huang <i>et al.</i> (2001); Tolar (1997)
Potencializa a A β na indução de dispersão lisossomal e apoptose	Ji <i>et al.</i> (2002)
Diminui o receptor de androgênio	Raber <i>et al.</i> (2002).
Aumenta a deposição A β	Holtzman <i>et al.</i> (2000); Bales <i>et al.</i> (1999).

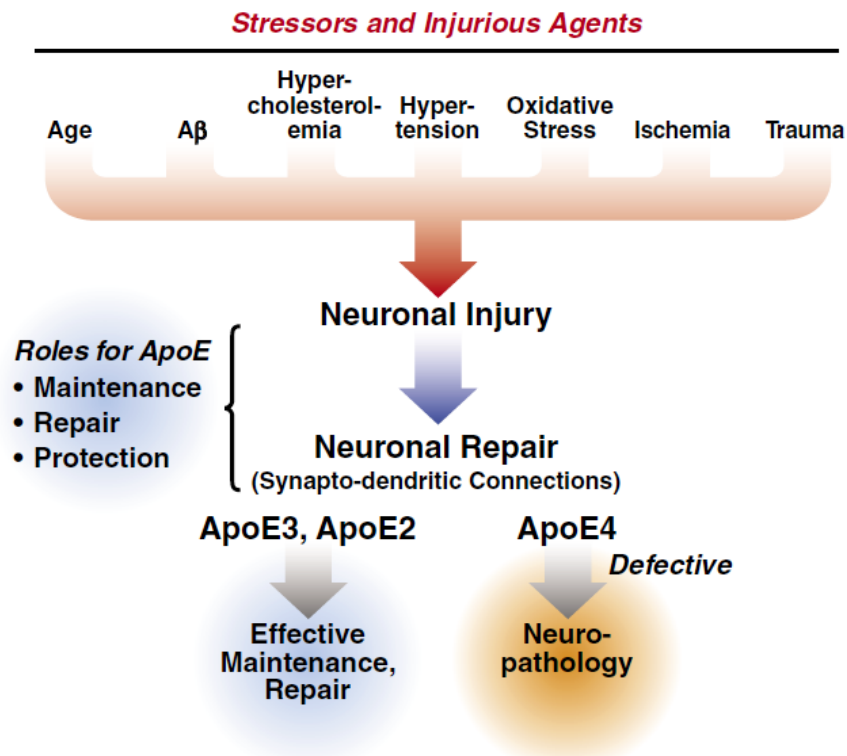


Figura 5. Hipótese para o papel da ApoE4 na origem da doença de Alzheimer. (Fonte: www.gladstone.ucsf.edu).

2.3.2 BUTIRILCOLINESTERASE

A Butirilcolinesterase (BChE), pelo fato de estar associada com os emaranhados neurofibrilares e placas amilóides, características da doença de Alzheimer, é sugerida como um potencial modulador da DA (Gómez-Ramos e Morán, 1997; Podoly *et al.*, 2009).

2.3.2.1 GENE *BCHE*

O gene *BCHE* (3q26.1-q26.2) é formado por quatro exons, com 2.444 pb e três introns, com 62.115 pb. A proteína madura com 574 aminoácidos corresponde à tradução de 1.722 pb (NCBI, NT_005612). O exon 1 (149 pb) contém sequências não traduzidas e dois potenciais sítios de início de tradução nos códons -69 e -47. Um terceiro possível sítio de início de tradução é no códon -28 do exon 2 (1.525 pb) que contém 83% da sequência codificadora da proteína madura, incluindo a extremidade N-terminal, a serina do sítio ativo.

O exon 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 (Figura 6) (Arpagaus *et al.*, 1990).

O gene *BCHE* humano não apresenta uma sequência consenso TATA *box*, mas possui vários sítios de ligação para fatores de transcrição que podem promover a expressão do gene. Foram encontrados sítios de ligação para o fator de transcrição AP1 e múltiplos sítios para Oct-1, PEA-3 e topoisomerasas (Jbilo *et al.* 1994).



Figura 6. O gene *BCHE*. As regiões preenchidas correspondem à sequência codificante da proteína madura.

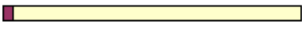
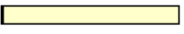
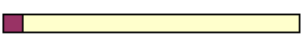
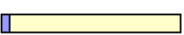
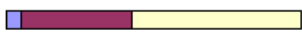
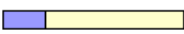
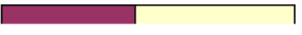
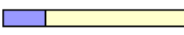

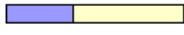


2.3.2.2 Polimorfismo do gene *BCHE*

Mais de 65 variantes já foram descritas para o gene *BCHE* (Souza *et al.*, 2005). A primeira a ser registrada foi em decorrência da observação de que alguns pacientes apresentavam paralisia muscular e apnéia prolongada após aplicação da succinilcolina, um relaxante muscular pré-operatório hidrolisável pela BChE, nos quais os pesquisadores identificaram a ocorrência de uma enzima “atípica” (Kalow e Genest, 1957). Esta variante denominada de “A”, deve-se a uma mutação de ponto no nucleotídeo 209 (exon 2) levando a uma substituição do ácido aspártico 70 (*GAT*) por glicina (*CGT*) (McGuire *et al.*, 1989). A substituição gera uma modificação no sítio aniônico da enzima, tendo afinidade reduzida por ésteres de colina positivamente carregados. A frequência do alelo “atípico”, *D70G*, foi estimada em cerca de 2% em populações caucasóides (Whittaker, 1986) e 1,80% em doadores de sangue euro-brasileiros da população de Curitiba (Mikami *et al.*, 2008).

O polimorfismo nt *1914G* encontra-se 189 bases depois do códon de parada no exon 4 e não codifica para a BChE (Bartels *et al.*, 1990). Esta mutação está em desequilíbrio de ligação com a variante *-116A* e com a mutação *A539T*, exibindo configuração em *cis* (Bartels

et al., 1990). As frequências genotípicas e alélicas desta mutação em diferentes populações, podem ser observadas na Tabela 3.

Tabela 3. Frequências genotípicas e alélicas da variante 1914G da *BCHE* (Fonte: Alves, 2009)

Características da Amostra			Detalhes dos Genótipos				Frequência Alélica	
População ¹	Grupo	n ²	GG	GA	AA	HW	G	A
Guarani (GRC)	Ameríndio	57	0,000	0,035	0,965	>0,750	0,0175	0,9825
								
Kaingang (KRC)	Ameríndio	58	0,000	0,069	0,931	>0,750	0,0345	0,9655
								
Europa (EUR)	Euro-americano	24	0,042	0,375	0,583	1,000	0,2290	0,7710
								
China (CHN)	Asio-americano	24	0,000	0,458	0,542	0,150	0,2290	0,7710
								
Afro-brasileiros (AFBII)	Afro-brasileiro	218	0,170	0,427	0,404	>0,100	0,3830	0,6170
								
África (AFR)	Afro-americano	22	0,364	0,591	0,045	0,150	0,6590	0,3410
								

2.3.2.3 A Variante K e risco para Doença de Alzheimer

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 *et al.*, 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 *et al.*, 1978), pois a mutação dista do centro catalítico da enzima. Altamirano *et al.* (2000) verificaram que a variante *K* não apresentou diferença em relação à afinidade e taxa de catálise de substratos, taxa de secreção da célula e formação sérica de tetrâmero, sugerindo que a diminuição no número de moléculas circulantes pode ser causada por mutações na região regulatória ou promotora do gene *BCHE*.

A redução da BChE em sua forma variante *K* poderia, potencialmente, aumentar a transmissão colinérgica, em comparação com a BChE não variante. Tem sido questionado se BChE-K funciona como um fator de risco ou fator de proteção para DA. Os resultados de

análises de polimorfismo da variante *K* em pacientes com DA esporádica tem sido controversos (Tabela 4). Algumas pesquisas relataram um aumento na frequência do alelo 539A em pacientes com a doença de Alzheimer, sugerindo acréscimo de risco de portadores da variante (Crawford *et al.*, 1998; Laws *et al.*, 1999; Panegyres *et al.*, 1999; Tilley *et al.*, 1999; Raygani *et al.*, 2004), enquanto outros sugerem um efeito protetor ou não encontram nenhuma associação (Singleton *et al.*, 1998; Ki *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; Bizzaro *et al.*, 2010) e alguns sugerem, ainda, ambos os efeitos (Bertram *et al.*, 2007; Podoly *et al.*, 2008; Podoly *et al.*, 2009).

Segundo Podoly *et al.* (2008), a variante *K* apresenta evidências de instabilidade molecular e interações intermoleculares prejudicadas, causando redução na capacidade de suprimir a beta oligomerização da A β , função observada em portadores de BChE selvagem. Os autores sugerem que a associação entre BChE-K e origem da DA é uma progressão estrutural, onde a enzima tem estabilidade e da organização quaternária comprometidas e, conseqüentemente, a atividade hidrolítica suprimida, o que é interessante para o aumento da transmissão colinérgica, porém representa risco em relação as interações aberrantes com A β (Figura 7).

Tabela 4. Associação da variante *K* da *BCHE* e $\epsilon 4$ da *APOE* em pacientes com a doença de Alzheimer (AD) e controles em diversos estudos.

Referência {n. AD/controle}	BCHE -K (+)						BCHE-K (+) associação com AD
	Total %		APOE $\epsilon 4$ (-) %		APOE $\epsilon 4$ (+) %		
	AD	Controle	AD	Controle	AD	Controle	
Lehmann <i>et al.</i> {74/104}	31	16	23	21	35	6	Aumenta o risco em portadores de APOE $\epsilon 4$
Hiltunen <i>et al.</i> {37/34}	Nr	Nr	Nr	Nr	14	41	Diminui o risco portadores de APOE $\epsilon 4$ <75 anos.
Crawford <i>et al.</i> {329/201}	32	26	37	24	29	32	Aumenta o risco em não portadores de APOE $\epsilon 4$
Kehoe <i>et al.</i> {181/71}	38	37	30	35	44	40	Não associado
Singleton <i>et al.</i> {119/83}	31	38	29	35	32	53	Não associado
Russ <i>et al.</i> {203/122}	22	20	Nr	Nr	19	17	Não associado
Brindle <i>et al.</i> {138/165}	20	19	30	20	19	17	Não associado
Hekbeque <i>et al.</i> {79/175}	33	37	42	37	26	38	Diminui o risco em portadores de APOE $\epsilon 4$ >75
Wiebusch <i>et al.</i> {135/70}	41	24	30	27	48	16	Aumenta o risco em portadores de APOE $\epsilon 4$
Panegyres <i>et al.</i> {38/30}	46	28	21	25	25	3	Aumenta o risco em portadores de APOE $\epsilon 4$
Yamamoto <i>et al.</i> {203/288}	17	14	Nr	Nr	15	12	Não associado
Grubber <i>et al.</i> {245/241}	35	41	38	39	33	46	Diminui o risco em portadores de APOE $\epsilon 4$
Laws <i>et al.</i> {237/347}	24	35	23	36	32	32	Diminui o risco em não portadores de APOE $\epsilon 4$
Alvarez-Arcaya <i>et al.</i> {249/250}	17	23	14	25	20	14	Diminui o risco em não portadores de APOE $\epsilon 4$ (somente em mulheres).

Fonte: Alvarez-Arcaya *et al.*, 2000 traduzida; (+) uma ou mais cópias; (-) nenhuma cópia; {n. AD/Controle} número total de pacientes AD e controles estudados; nr, não relatado.

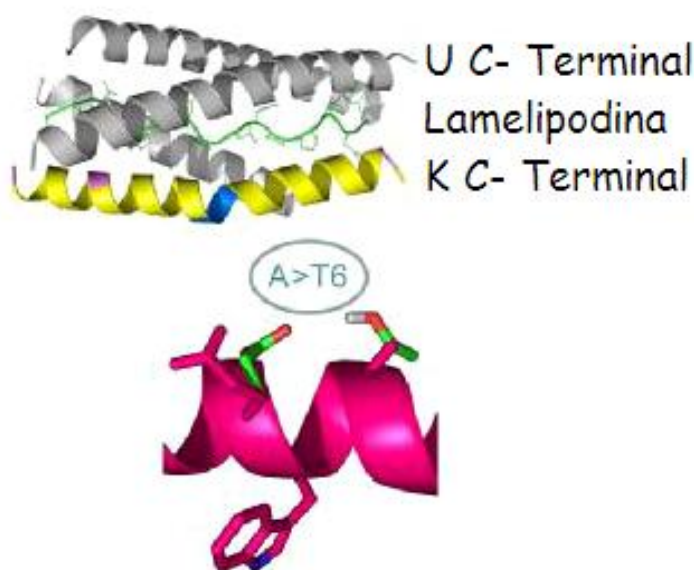


Figura 7. Os efeitos estruturais de substituição de alanina/treonina na posição 539 da BChE. Modelagem molecular dos peptídeos do domínio C-terminal helicoidal da BChE tipo selvagem (cinza), a variante da BChE-K (amarelo), e a interação do peptídeo rico em prolina, derivado da Lamelipodina. A mutação A para T, característico da variante K, é esquematicamente desenhada (abaixo) com uma torção induzida. (Fonte: Berson e Soreq, 2010).

A hipótese de Podoly *et al.*, (2010) é que a substituição de alanina (A) por treonina (T) é um processo amiloidogênico, com base nas propriedades da alanina como um dos mais fortes formadores de hélice, enquanto treonina é um dos mais fortes formadores de folhas- β . Como a variante K da BChE é uma mutação A \rightarrow T na posição C-terminal, estaria sendo desestabilizada e sua capacidade de atenuar a formação de fibrilas prejudicada. Os autores testaram a hipótese através de um peptídeo sintético derivado do C-terminal da BChE, BSP-U, usual e BSP-K mutante *in vitro*. BSP-U esteve associado com atraso do início da formação de fibras A β assim como diminuição na taxa de formação de fibrilas. Já BSP-K teve a capacidade de atenuar a formação da fibrila suprimida (Podoly *et al.*, 2010). Em contrapartida, Ballard *et al.* (2005) examinaram a relação entre a variante K, deposição amilóide (A β 42) e TAU hiperfosforilada, no córtex temporal com DA, e não encontraram nenhuma diferença no grau de deposição A β entre portadores de variante K e não portadores.

Muitos pesquisadores propõe que exista uma interação complexa entre ApoE e BChE. Darreh-Shori *et al.*, (2009) demonstraram que os níveis de BChE estavam inversamente relacionados com os níveis da proteína ApoE no líquido cefalorraquidiano. Análises *in vitro* sugerem que distintas isoformas da proteína ApoE afetam a atividade da BChE e sua

estabilidade de diferentes maneiras, de modo que a BChE-K estaria relacionada com DA principalmente na presença do alelo *APOE*ε4 (Lehmann *et al.*, 1997; Grubber *et al.*, 1999; McIlroy *et al.*, 2000; Wiebusch *et al.*, 1999; Grebmedhin *et al.*, 2001).

Amostras da população espanhola (Mateo *et al.*, 2008; Combarros *et al.*, 2007; Deniz al-Naranjo *et al.*, 2007), italiana (Bizarro *et al.*, 2010) e coreana (Kim *et al.*, 2001), por exemplo, não confirmaram um efeito sinérgico entre o alelo *APOE*ε4 e a variante *K* da *BChE* em pacientes com DA. Darreh-Shori *et al.* (2012) associaram a atividade da BChE e concentração da APOE em líquido, de pacientes com DA, com os genótipos para variante *K* e *APOE*ε4 e encontraram uma modulação fenotípica ApoE4-dependente da proteína BChE em sua forma variante (*K*). Estes autores propuseram um sinergismo recíproco entre ApoE e BChE como fator de risco para DA.

Segundo McIlroy *et al.* (1999) as frequências da variante *K* diferem entre os grupos étnicos. No Brasil, as frequências estimadas desse alelo foram de 17,1% em miscigenados oriundos de europeus e africanos (Souza *et al.*, 1998) e 17,8% em euro-brasileiros (Souza, 2001), porém estudos de associação entre a variante *K* e DA ainda não foram realizados no Brasil.

Alguns autores sugerem ainda a possibilidade de um efeito dose-dependente do alelo *K*. Ghebremedhin *et al.* (2001) sugerem que os pacientes com DA heterozigotos para a mutação *K* possuem características intermediárias de risco em relação aos homozigotos sobre o desenvolvimento da DA. Os autores verificaram que os casos de DA com neuropatologia grave tiveram maior frequência do alelo *K* do que os casos de neuropatologia leve a moderada.

BCHE-K foi associada também com maior variância do índice de massa corporal (IMC). Souza *et al.* (2005) verificaram maior variação do IMC em indivíduos heterozigotos para a *BCHE-K* em relação aos controles. Os autores sugeriram que a maior variação do IMC poderia ser resultado de uma interação entre o alelo *K* e o alelo usual, pois a diferença na variação não foi detectada nos indivíduos homozigotos para o alelo *K* ou em usuais.

Porém, um estudo posterior demonstrou que a maior variação do IMC encontrada por Souza *et al.* (2005) correlacionada a *BCHE-K* ocorria neste genótipo apenas na presença da mutação *-116A* (Furtado *et al.*, 2008). Esta mutação ocorre no exon 1 em uma região transcrita, mas não traduzida (SNP: G/A; rs1126680), sendo *-116A* encontrada em *cis* com a variante *K* em mais de 90% dos casos (Bartels *et al.*, 1990).

Furtado *et al.* (2008) verificaram que a presença da variante *K* sem a variação *-116A*, não resulta em baixa atividade da BChE. Desta forma, a diminuição da atividade da BChE, anteriormente relacionada à mutação *K (539T)* pode ser dependente da variação *-116A*.

Apesar da mutação *-116A* não ocorrer na região codificadora do peptídeo maduro, ela faz parte da região transcrita, podendo, de alguma forma, afetar a transcrição e tradução do gene *BCHE*. Furtado *et al.*, (2008) sugerem que a mutação *-116A* pode interferir na ligação de elementos regulatórios, como potenciadores, durante o processo de transcrição. No caso da tradução é possível que as proteínas regulatórias possam interagir com a sequência 5'UTR específica, que inclui a posição *-116*. Outra hipótese seria de que o sítio *-116* esteja em desequilíbrio de ligação com outro sítio variante na região promotora ou reguladora do gene *BCHE*, que seja responsável pela baixa atividade da BChE (Furtado *et al.*, 2008).

2.3.2.4 Proteína BChE

A BChE é uma colinesterase (ChEs) amplamente distribuída em diferentes tecidos humanos. É expressa em neurônios e seus dendritos proximais na amígdala, hipocampo e tálamo (Darvesh *et al.*, 2003). Nos vertebrados as colinesterases são a butirilcolinesterase (EC 3.1.1.8) e a acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7). Estas enzimas compartilham 54,45% de identidade nucleotídica (Nunes, 2007). Ambas apresentam inúmeras funções fisiológicas, dependendo da sua localização e tempo de expressão (Soreq e Seidman, 2001). A BChE difere da AChE pela especificidade do substrato e sensibilidade à inibição por organofosfatos, sendo a BChE mais sensível a esse tipo de inseticida que a AChE (Sturm, 2000). Além disso, a AChE é inibida por altas concentrações do substrato acetilcolina, e a BChE tem sua atividade aumentada nessas condições (Alles e Hawes, 1940).

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 *et al.*, 2003). Cerca de 10-15% das células ChE-positivas na amígdala e hipocampo são reguladas pela BChE independentemente da AChE (Darvesh *et al.*, 1998). Na Doença de Alzheimer ocorre redução da AChE em até 85% em regiões específicas do cérebro, enquanto os níveis de BChE, principalmente a forma C1, aumentam de acordo com a progressão da doença (Perry *et al.*, 1978; Arendt *et al.*, 1992; Greig *et al.*, 2005).

A BChE aparece sob cinco formas moleculares principais no organismo humano: monômero (C1), dímero (C3) e tetrâmero (C4), sendo também encontrado o monômero ligado à albumina sérica (C2) e o tetrâmero ligado a uma substância ainda desconhecida (C5). O complexo C5 é formado pela interação dos genes *BCHE* e locus *CHE2* (2q33-35) (Harris *et al.*, 1962).

Aproximadamente 98% da BChE humana no soro é um tetrâmero de quatro subunidades idênticas, cuja massa molecular é de 340.000 Da (Lockridge e Masson, 2000). A molécula é um glóbulo solúvel protegido da proteólise por um revestimento de açúcares pesados a partir de nove cadeias de carboidrato N-ligados. A BChE plasmática é sintetizada no fígado e secretada no sangue, onde tem uma meia-vida ($t = 1/2$) de 11-14 dias (Ostergaard *et al.*, 1988; Lockridge e Masson, 2000). O tempo de permanência das colinesterases no sangue mostra uma correlação positiva com o estado de glicosilação e configuração quaternária tetramérica (Saxena *et al.*, 1998; Chitlaru *et al.*, 2001). As cadeias de carboidratos parecem não interagir com moléculas do substrato, pois estariam distantes da entrada do sítio esterásico (Millard e Broomfield, 1992) localizado no interior da molécula e ligado ao exterior por um túnel, cuja tríade catalítica seria formada por serina na posição 198, ácido glutâmico em 325 e histidina em 438 (Shafferman *et al.*, 1992).

Na forma C4, os quatro monômeros da BChE são mantidos por interações aromáticas de sete resíduos aromáticos altamente conservados, o domínio tetramerizado é denominado de triptofano anfifílico (WAT) (Altamirano e Lockridge, 1999; Blong *et al.*, 1997). O domínio WAT interage com domínios de ligação ricos em prolina, através da âncora na membrana rica em prolina nos neurônios do cérebro (Perrier *et al.*, 2002) ou na junção neuromuscular, com colinesterase associada ao colágeno Q (Bon *et al.*, 2003). No soro, a tetramerização da BChE é apoiada por um análogo 17-mer, peptídio rico em prolina (PRAD) possivelmente derivado da lamelipodina (Li *et al.*, 2008) (Figura 8).

O centro ativo da BChE é constituído por um sítio esterásico e um sítio aniônico. O sítio aniônico se liga com o grupo amônio quaternário (cAa positiva) da colina (Sussman *et al.*, 1991). O sítio aniônico da BChE está envolvido no mecanismo de ativação de substratos. Dois locais de ligação de substrato, Asp70 no sítio aniônico periférico e Trp82 no sítio ativo, são conectados por uma alça ômega (Ω). A ativação do substrato da BChE envolve a participação de diferentes domínios na entrada do sítio ativo da enzima, incluindo o sítio aniônico periférico (Asp70 e Tyr332), o sub-sítio de ligação do sítio ativo (Trp82 e Ala328), o resíduo estabilizador Glu197 e o resíduo Asn83 da alça Ω (Masson *et al.*, 2001).

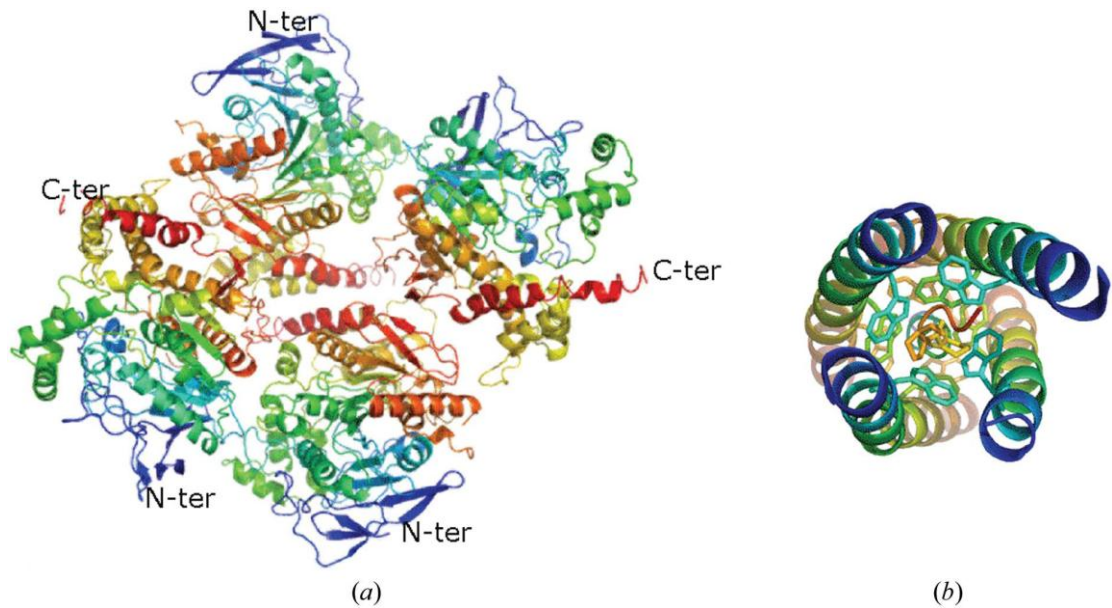


Figura 8. Tetrâmeros cristalográficos da BChE recombinante (a) monômeros não mediados pelo domínio de tetramerização (b) e mediado por meio de peptídeos rico em prolina (PRAD), com as prolinas do PRAD interagindo com o triptofanos do domínio tetramerizado. As quatro hélices do domínio de tetramerização paralelas formam um super-hélice (Fonte: Ngamelue *et al.*, 2007).

2.3.2.5 Funções da BChE

A BChE é uma enzima multifuncional. É conhecido que a butircolinesterase 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 *et al.*, 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 *et al.*, 2000).

No cérebro humano, a BChE é expressa em um número elevado de áreas neuronais de funções cognitivas (Darvesh *et al.*, 1998; Darvesh e Hopkins, 2003), o que indica que a BChE pode ter um papel importante nas funções dos circuitos tálamo-corticais e, portanto, na cognição (Steriade *et al.*, 1997; Manoharan *et al.*, 2007).

Pelo fato da alta eficiência na hidrólise de acetilcolina em concentrações relativamente altas, Layer *et al.* (1992) sugerem que a BChE poderia contribuir fisiologicamente na hidrólise deste neurotransmissor sob circunstâncias especiais, tais como durante a diferenciação celular e o desenvolvimento embrionário. Experimentos com camundongos

nulizogotos para AChE demonstraram que a BChE pode substituir a AChE exercendo uma função constitutiva de hidrólise da acetilcolina no cérebro normal (Mesulam *et al.*, 2002).

A BChE é correlacionada ainda com o crescimento celular, diferenciação e mobilidade dos axônios e com a regulação da expressão da AChE. Foi observada, em neuroblastos do tubo neural, crista neural, células da retina e outros tipos celulares, uma correlação positiva entre a alta proporção proliferativa e a expressão da BChE (Layer *et al.*, 1992). *In vitro*, a BChE purificada apresentou uma ação mitogênica em diferentes tipos de células neurais, provocada pela sua atividade esterolítica (Layer, 1996).

Várias classes de compostos naturais potencialmente prejudiciais ao organismo humano, são desativados no plasma pela BChE. Entre estes compostos estão os ésteres, carbamatos e glicoalcalóides, como os encontrados em plantas solanáceas como a batata, tomate e berinjela (McGehee *et al.*, 2000). Compostos sintéticos como os organofosforados também são hidrolisados pela BChE (Silver, 1974; Taylor e Radic, 1994). A BChE está envolvida no metabolismo de várias drogas, incluindo a desativação da succinilcolina e a conversão de pró-fármacos, tais como bambuterol em drogas ativas (Tunek *et al.*, 1988), incluindo desintoxicação de cocaína (Kalow e Grant, 2001).

Vários autores têm indicado algum envolvimento desta enzima com o metabolismo de lípidos. A atividade da BChE está aumentada em distúrbios como obesidade (Cucuianu *et al.*, 1968, Benyamim *et al.*, 2011), hiperlipoproteinemia (Cucuianu *et al.*, 1975), diabete melito (Antopol *et al.*, 1937), e é positivamente correlacionada com os níveis de triglicerídeos (Magarian e Dietz, 1987; Lima *et al.*, 2013). A presença da BChE com LDL (lipoproteína de densidade baixa) foi relatada pelos autores Lawrence e Melnick (1961), Kutty *et al.* (1977), Ryhänen *et al.* (1982) e HDL (lipoproteína de alta densidade) por Ryhänen *et al.* (1982). Correlações positivas entre os níveis de colesterol e a atividade da BChE (Cucuianu *et al.*, 1968), bem como entre níveis da apolipoproteína B e da atividade da BChE (Alcântara *et al.*, 1995) já foram mostradas.

2.3.3 *SLITRK3*

O gene *SLITRK3* (MIM 609679) está localizado no cromossomo 3q26.2 a jusante do gene *BCHE*. Possui um total de 9.962 pb que traduzem a proteína madura de 999 aminoácidos. O gene possui 2 exons sendo apenas um codificante (Figura 9) (NCBI, NT_005612).

SLITRK3 faz parte da família Slitrk (*SLITRK1* à *SLITRK6*), na qual os genes são expressos no desenvolvimento neural e em tecidos maduros neurais. Desta forma, os genes da família Slitrk são amplamente expressos no cérebro, principalmente na região cortical com padrões de expressão diferindo conforme a região. Existe uma sintenia cromossômica da família Slitrk entre humanos e camundongos (Aruga *et al.*, 2003). Em camundongos, *SLITRK3* é amplamente expresso no tálamo e na camada piramidal das células do hipocampo, e juntamente com a *SLITRK4* tem forte expressão na região CA3 do hipocampo (Aruga e Mikoshiba, 2003). Em humanos, Aruga *et al.*, (2003) verificaram ampla expressão do *SLITRK3* no córtex cerebral adulto e fetal, assim como em tumores cerebrais astrocíticos.

A família Slitrk foi identificada como uma família de proteínas neurais transmembrana que controlam o crescimento de neuritos (Aruga e Mikoshiba, 2003). A proteína Slitrk3 (Figura 10) compartilha as características estruturais da família Slitrk, com dois domínios de repetição rica em leucina (LRR) localizados no domínio N-terminal transmembrana, e ladeada por uma região rica em cisteína. Cada domínio LRR é constituído por cerca de 230 resíduos de aminoácidos (Aruga e Mikoshiba, 2003) O domínio LRR das proteínas da família Slitrk são semelhantes aos da família de SLIT, que controlam a orientação e ramificação axonal (Brose e Tessier-Lavigne, 2000; Aruga e Mikoshiba, 2003). Outra característica estrutural é a região C-terminal com resíduos de tirosina que são flanqueadas por sequências consenso como potencial sítio de fosforilação, semelhante ao domínio C-terminal do receptor Trk da neurotrofina (Patapoutian e Reichardt, 2001).



Figura 9. Figura esquemática do gene *SLITRK3* (Fonte: Aruga *et al.*, 2003).



Figura 10. Estrutura da proteína Slitrk3 humana. Caixas abertas são domínio LRR, ambos compostos por 3 à 4 repetições em tandem do motivo LXXXLXLXXN; caixas hachuradas, regiões ricas em cisteína. Caixa fechada, um domínio transmembrana; caixa cinza, região do peptídeo sinal; Caixa Y, resíduos de tirosina (potenciais sítios de fosforilação, Cooper *et al.*, 1984) conservado entre o receptor de neurotrofina e proteínas Slitrk.

2.3.3.1 Slitrk e a Formação de Neuritos

Os neuritos são unidades morfológicas (axônios e dendritos) fundamentais dos neurônios, e o crescimento axonal e a extensão de árvores dendríticas são processos morfológicos essenciais no desenvolvimento neuronal. A regulação do crescimento dos neuritos é um processo importante também na plasticidade, bem como na regeneração neuronal em ferimentos ou em condições neuropatológicas (Revisto por Tang, 2001; Brennwald e Rossi., 2007).

A fase inicial de crescimento dos neuritos inclui a expansão da membrana em cones de crescimento, o que exige formação de nova membrana. Este processo é realizado pela incorporação de vesículas exocíticas derivadas da rede trans-Golgi (TGN), para a membrana plasmática (Tang, 2001). O início do crescimento dos neuritos exige orientações específicas para intensificar a exocitose orientada para uma determinada região da membrana plasmática que virá a ser a ponta de um neurito crescente. Esta orientação ocorre através de fatores de crescimento, como o NGF (fator de crescimento do nervo) (Greene e Tischler, 1976; Tang, 2001), em que a transdução de sinal é proveniente da ligação do NGF ao receptor tirosina quinase TrkA, culminando na ativação sustentada da via MAP quinase (Kaplan e Miller 2000). Esta via é responsável, em muitas células, pela regulação dos fenômenos de neuritogênese e sobrevivência celular (Kaplan e Miller, 2000).

Aruga e Mikoshiba (2003) verificaram que as proteínas Slitrk, assim como a TrkA, atuaram como moduladores do crescimento de neuritos em culturas de células neuronais. A região citoplasmática das Slitrks, na porção C-terminal, contém resíduos de tirosina rodeadas por sequências de aminoácidos homólogas à família de receptores de neurotrofina Trk, que exercem um importante papel na fase inicial da neuritogênese (Aruga e Mikoshiba, 2003). Os domínios LRR das proteínas da família Slitrk mostram ainda uma homologia com regiões LRR encontradas em proteínas da família Slit, que também participam de processos de neuritogênese e na regulação de vários outros processos biológicos (Zhou *et al.*, 2000).

Os sítios potenciais de fosforilação na região C-terminal da Slitrk possui Leu-Glu-Val, uma região preferencial de vinculação ao domínio SH2 da fosfolipase C (PLC) γ 1 (Songyang *et al.*, 1993). Por meio dos resíduos de tirosina, a proteína TrkA ativa a PLC- γ 1 mediando uma cascata de sinalização (Stephens *et al.*, 1994). Constatada tal homologia, possivelmente a sinalização mediada pela Slitrk também ocorra através da dimerização do receptor e sua transfosforilação nos resíduos de tirosina (domínio intracelular) a partir do qual desencadeia

uma cascata de sinalização, incluindo a ativação de vias intracelulares responsáveis por um efeito protetor nos neurônios.

A função de cada um dos membros da família Slitrk durante o desenvolvimento do sistema nervoso e no tecido maduro ainda permanece desconhecida. Foi verificado que a superexpressão de Slitrk1 em neurônios corticais induz o crescimento de neuritos unipolares e o aumento de ramificações dendríticas (Aruga e Mikoshiba, 2003; Abelson *et al.*, 2005). Em contrapartida, Slitrk3 reprime fortemente a formação de neuritos em células-transfectadas, o que sugere que Slitrk3 atue como um fator trófico de supressão neuritogênica (Aruga *et al.*, 2003).

Na doença de Alzheimer, ocorre uma queda na produção de fatores tróficos (Osion *et al.*, 1994; Cowburn *et al.*, 1996; Knusel e Gao, 1996; Mattson e Furukawa, 1996). As mudanças estruturais da DA incluem uma alteração generalizada dos processos neuronais, da arquitetura dendrítica, além de placas senis e emaranhados neurofibrilares (Tabaton *et al.*, 2004; Moolman *et al.*, 2004). Os processos neuronais anormais, os neuritos distróficos (DNs), são encontrados em torno das placas amilóides e estão estreitamente associados com os emaranhados neurofibrilares em pacientes com DA. Os DNs são incorporados na borda da placa amilóide, bem como nos astrócitos reativos e microglia (Dickson *et al.*, 1988; Fukumoto *et al.*, 1996; Nicoll *et al.*, 2006, Pérez-Gracia *et al.*, 2008). Serrano-Pozo *et al.* (2010) acreditam que as curvaturas anormais de neuritos, na doença de Alzheimer, podem romper a integração sináptica cortical e, assim, contribuir com a disfunção cognitiva.

Existe o questionamento se a alteração neurítica generalizada é secundária à deposição de amilóide, ou se os neuritos distróficos, resultantes do brotamento dendrítico, contribuiriam com o surgimento da demência por causa de seu crescimento anormal e estreita associação com emaranhados neurofibrilares e placas neuríticas. Smith *et al.* (2009) verificaram que em cobaias as alterações dendríticas são prodrômicas a DA, ou seja, antecedem o estágio sintomático de demência. Pesquisadores como Tabaton *et al.* (2004) sugerem que neuritos distróficos antecedem a deposição amilóide. Os autores propõem que a difusão de DNs e a formação de emaranhados neurofibrilares na DA e Panencefalite esclerosante subaguda (SSPE) são a expressão de uma alteração generalizada do citoesqueleto neuronal (Tourtellotte e Van Hoesen, 1991; Tabaton *et al.*, 2004).

2.3.4 Neprilisina

2.3.4.1 O gene *MME*

O gene *MME* (Membrane Metallo-endopeptidase - 3q21-27) é de cópia única (80 kb), tem 24 exons e codifica a proteína madura, a neprilisina, com 742 aminoácidos (NCBI, MIM:120520). Os exons 1 e 2 codificam a região 5' não traduzida. O exon 3 (170pb) codifica o códon de início de tradução, os domínios citoplasmáticos e hidrofóbico. Vinte pequenos exons (do 4 ao 23) codificam a maior parte extracelular da enzima. O exon 24 codifica 32 aminoácidos da porção C-terminal e a região 3' não traduzida. Três tipos de cDNAs para CALLA (*Common acute lymphoblastic leukemia-associated*)/NEP (*Neutral endopeptidase*) foram identificados contendo sequências diferentes da 5' UTR, resultantes de recomposição alternativa dos exons 1, 2a ou 2b (D'Adamio *et al.*, 1989). Na região 5' há vários sítios de início de transcrição e de processamento alternativo que podem estar relacionados com a especificidade da expressão da Neprilisina, tanto na origem dos tecidos como no estágio de desenvolvimento (Haouas *et al.*, 1995).

2.3.4.2 Neprilisina

A neprilisina (EC3.4.24.11), conhecida como endopeptidase neutra (NEP) é uma metaloprotease integral de membrana tipo II com um sítio catalítico do lado extracitoplasmático, que emerge na superfície da célula através da via secretora. Possui uma região transmembrana próxima à porção N-terminal, contém zinco no seu centro ativo, característico das metaloproteases (Figura 11) (Malfroy *et al.*, 1988).

A neprilisina (85-93 kDa) é expressa em uma vasta gama de tipos celulares. É uma glicoproteína particularmente abundante nos rins, onde está presente na borda em escova dos túbulos proximais e no epitélio glomerular. A NEP metaboliza peptídeos bioativos e está envolvida em um grande número de processos biológicos em mamíferos, incluindo modulação dos níveis de neurotransmissores (Bland *et al.*, 2008).

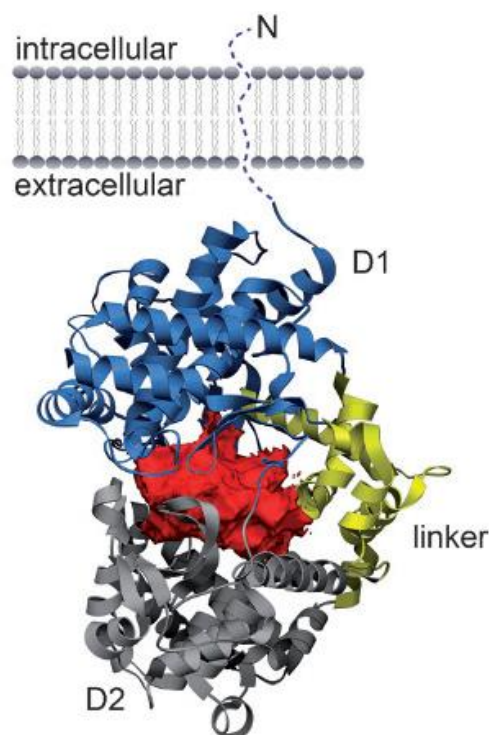


Figura 11. Estrutura da Neprilissina. Em vermelho, a cripta catalítica A β -degradante. Em azul, domínio catalítico (D1). Cinza, domínios menores (D2) e amarelo, os três fragmentos de ligação inter-domínio (linker) (Fonte: Malito *et al.*, 2008).

Há uma variedade de substratos hidrolisados pela neprilissina, como ocitocina, encefalinas, neurotensina, bombesina (Roques *et al.*, 1993), e o peptídeo vasodilatador natriurético atrial (ANP) (Kenny e Stephenson, 1988). No pulmão, é capaz de limitar inflamações neurogênicas iniciadas por taquiquininas (Shipp *et al.*, 1991). A NEP exerce função de endopeptidase na hidrólise de oligopeptídeos, processando e metabolizando hormônios imunorregulatórios e neuropeptídeos. A neprilissina localizada em células neurais atua na inativação e liberação das encefalinas, e outros neuropeptídeos, como a substância P nas vias sinápticas (Matsas *et al.*, 1983).

2.3.4.3 Neprilissina e Alzheimer

A NEP tem um importante papel na degradação de A β (Iwata *et al.*, 2001; Farris *et al.*, 2003), peptídeo cuja deposição forma as placas senis. *In vivo*, foi demonstrado que a neprilissina degrada a A β -42 e a inibição seletiva da NEP levou ao bloqueio da degradação de A β no hipocampo de camundongos (Iwata *et al.*, 2000). Segundo Mohajeri *et al.* (2002), a

NEP pode impedir ou atrasar o aparecimento da doença de Alzheimer, embora possa ser ineficaz após seu início.

Apesar das evidências de degradação da beta amiloide pela NEP, a caracterização estrutural desta interação ainda não foi determinada, mas a estrutura criptidase A β -degradante já foi reconhecida (Figura 11). Esta estrutura está localizada no espaço extracelular, com topologia é favorável para a degradação de peptídeos extracitoplasmáticos como A β . Além disso, a neprilisina é exclusivamente expressa em neurônios, e não em células gliais e após a síntese da soma, ela é transportada para terminais axonais pré-sinápticos, de uma forma semelhante à maneira como APP é transportado. Os terminais pré-sinápticos e nas proximidades no meio intracelular tendem a ser os locais de degradação da A β pela neprilisina (Figura 12) (Revisão Malito *et al.*, 2008).

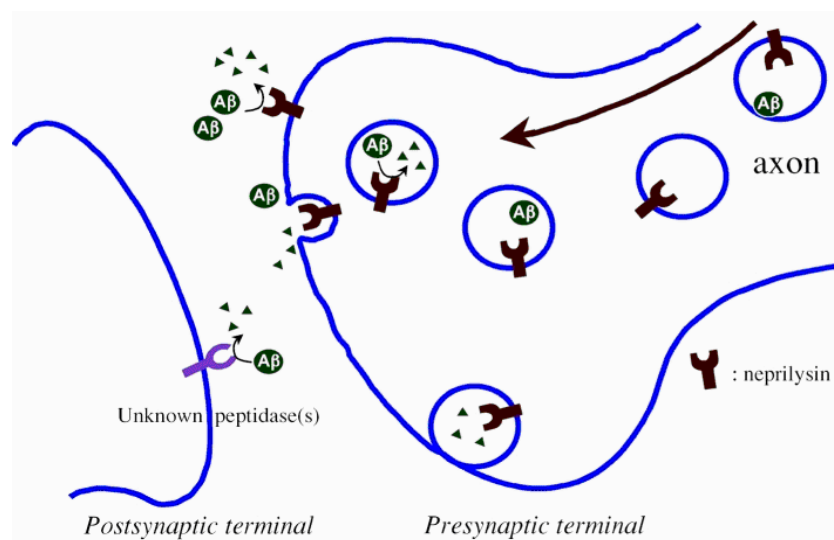


Figura 12. Localização celular da Neprilisina no neurônio. Neprilisina é exclusivamente expressa em neurônios, e não em células gliais. Fonte: Saïdo e Nakahara, 2000.

Os níveis de NEP em regiões vulneráveis para o desenvolvimento de placa senil, como o hipocampo e o giro médio temporal, são particularmente baixos em pacientes com DA esporádica em comparação com os controles de idade comparável (Yasojima *et al.*, 2001). Maruyama *et al.* (2005) verificaram que, no líquido cefalorraquidiano de pacientes DA prodrômicos, ocorreu a diminuição da atividade NEP. Hamaguchi *et al.* (2006) sugerem o declínio da atividade da NEP, relativo à idade e em regiões específicas do cérebro, seja um fator de suscetibilidade para promoção da patogênese da DA esporádica.

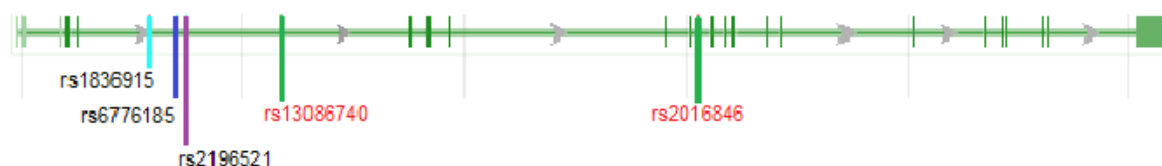
Muitos pesquisadores têm encontrado associação entre o gene *MME* e a DA (Poduslo *et al.*, 1999; Clarimon *et al.*, 2003; Sakai *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2010). Polimorfismos já avaliados podem ser observados na tabela 5, sendo que nove dos trinta SNPs (em 56 avaliações) foram associados como fator de risco para DA, sem nenhum polimorfismo associado como fator de proteção. No intron 3 já foram avaliados oito diferentes polimorfismos, e três deles apresentaram associação de risco para a DA (Figura 13). Um polimorfismo no intron 3 (rs13086740) e outro no intron 10 (rs2016846), que ainda não foram avaliados para DA e que fazem parte do presente trabalho, estão indicados na figura 13.

Tabela 5. Estudos de associação entre o gene *MME* e a Doença de Alzheimer, com a indicação dos polimorfismos não associados (NA) ou associados como fator de risco para a DA. População caucasiana (C) ou Asiática (A).

SNP	Associação	Região gênica	População	Referência
rs1836914	NA	5'	C	Miners et al., 2012
rs7623854	NA	5'	C	Wood et al., 2007
rs10513467	NA	5'	C	Wood et al., 2007
rs4432598	NA	5'	C	Wood et al., 2007
rs35994024	NA	5'	C	Lilius et al., 2003
	NA		A	Oda et al., 2002
rs3773907	NA	5'	A	Sakai et al., 2004
rs989692	NA	5'UTR	C	Miners et al., 2012
	NA		C	Wood et al., 2007
	NA		C	Giedraitis et al., 2009
	fator de risco		C	Helisalmi et al., 2004
	fator de risco		C	Vepsäläinen et al., 2008
rs5853711	NA	5'UTR	C	Lilius et al., 2003
	NA		A	Oda et al., 2002
	Fator de risco		A	Sakai et al., 2004
rs9827586	NA	intron 1	C	Miners et al., 2012
rs13077421	NA	intron3	C	Wood et al., 2007
rs1836915	fator de risco	intron3	C	Wood et al., 2007
rs6776185	fator de risco	intron3	C	Wood et al., 2007
	NA		C	Giedraitis et al., 2009
rs2196521	fator de risco	intron3	C	Wood et al., 2007
	NA		C	Helisalmi et al., 2004
rs9834487	NA	intron3	C	Wood et al., 2007
rs1025192	NA	intron3	C	Wood et al., 2007
	NA		C	Helisalmi et al., 2004
	NA		C	Reiman et al., 2007
	NA		C	Li et al., 2008
rs34745881	NA	intron3	A	Oda et al., 2002

rs9853221	NA	intron3	C	Wood et al., 2007
rs1816558	NA	intron8	C	Wood et al., 2007
	NA		C	Helisalmi et al., 2004
	NA		C	Giedraitis et al., 2009
rs3773885	NA	intron10	C	Wood et al., 2007
	NA		C	Helisalmi et al., 2004
rs6801319	fator de risco	intron14	C	Wood et al., 2007
rs6797911	fator de risco	intron 14	C	Miners et al., 2012
rs11925306	NA	intron16	C	Wood et al., 2007
rs9881879	NA	intron16	C	Wood et al., 2007
	NA		C	Giedraitis et al., 2009
rs61760379	NA	intron 16	C	Miners et al., 2012
rs3736187	NA	intron18	C	Miners et al., 2012
	fator de risco		C	Helisalmi et al., 2004
	fator de risco		C	Vepsäläinen et al., 2008
	NA		C	Wood et al., 2007
rs3773882	NA	intron17	C	Helisalmi et al., 2004
rs10622201	NA	intron22	A	Oda et al., 2002
rs701109	NA	3'UTR	C	Miners et al., 2012
	fator de risco idade dependente		C	Clarimon et al., 2003
	NA		C	Li et al., 2008
	NA		C	Wood et al., 2007
	NA		A	Fu et al., 2009
rs1385477	NA	3'	C	Wood et al., 2007
rs13081581	NA	3'	C	Wood et al., 2007
	NA		C	Reiman et al., 2007
	NA		C	Li et al., 2008

Figura 13. SNPs (rs1836915, rs6776185, rs2196521) no intron 3 do gene *MME* associados como fator de risco para DA. E em vermelho, SNPs ainda não estudados para associação com DA, sendo o rs13086740 no intron 3 e rs2016846 no intron 10.



2.3.5 Grelina

2.3.5.1 O gene *GHRL*

O gene da grelina (*GHRL*) está localizado no cromossomo 3 (3p25-p26) (Smith *et al.*, 1997). O número de exons é considerado cinco por alguns autores (Kojima e Kangawa, 2005) sendo que, o primeiro e mais curto, contém apenas 20 pb englobando parte da região 5' não traduzida (5' UTR). Alguns pesquisadores consideram que o gene da grelina contém 4 exons (Ukkola *et al.*, 2001) (Figura 14). O peptídeo grelina, contendo 28 aminoácidos, é codificado pelos exons 2 e 3 (Kojima e Kangawa, 2005).



Figura 14. Gene *GHRL* com os 5 exons e alguns de seus polimorfismos (Fonte: Garcia *et al.*, 2009).

2.3.5.2 A Grelina

A Grelina é produzida em uma grande variedade de tecidos, incluindo o encéfalo, onde atua como um fator parácrino/autócrino (Lago *et al.*, 2005). Ela é um peptídeo estimulador de apetite e que atua na liberação do hormônio de crescimento (GH). Este hormônio é multifuncional, regula o crescimento celular e corporal e atua no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, liberação de insulina, bem como na homeostase energética (Aetsinger *et al.*, 1996; Korbonits *et al.*, 2004; Chollet *et al.*, 2009).

O precursor da grelina é codificado pelos 5 exons do gene *GHRL* em uma sequência de 117 aminoácidos, distribuídos em 23 aminoácidos do peptídeo grupo n-octanoil (C8:0) sinal e 94 aminoácidos da pró-grelina, os quais compreendem os 28 aminoácidos da grelina madura e mais 66 aminoácidos, que incluem os 23 da obestatina, hormônio com características antagônicas à grelina, que suprime o apetite e a atividade estomacal (Kojima *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2005).

A partir da atuação neuroprotetora da grelina nos processos da memória e aprendizagem (Mattson, 2004; Proto *et al.*, 2006; Koon *et al.*, 2009) diminuindo a hiperfosforilação da tau neuronal, alguns autores sugerem um relevante papel deste hormônio na doença de Alzheimer (Golomb *et al.*, 2000; Selkoe, 2001; Epelbaum *et al.*, 2009; Gahete *et al.*, 2011). Um estudo demonstrou que os pacientes com DA tem uma redução na produção da grelina encefálica em comparação com controles pareados por idade (Gahete *et al.*, 2010).

Um estudo de associação realizado no Japão utilizando vários SNPs para o gene *GHRL* encontrou associação do polimorfismo no exon 4 (*L90G* - rs4684677) e DA. Não foram encontrados outros estudos de associação de polimorfismos da grelina e DA em populações Caucásicas. Dantas *et al.* (2011) encontraram uma correlação positiva entre a presença de um polimorfismo no exon 2 da Grelina, alelo *72M* (*L72M* - rs696217) e a atividade da BChE. Os autores mostraram que o alelo *72M* está associado com o aumento da atividade da butirilcolinesterase considerando a relação das variantes do exon 1 do gene *BCHE* com a atividade desta enzima, embora os mecanismos desta interação não tenham sido elucidados.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar, por meio de um estudo caso-controle, a associação entre polimorfismos dos genes *BCHE*, *APOE*, *SLITRK3*, *MME* e *GHRL* e a demência de Alzheimer. E investigar a relação entre a concentração protéica da ApoE e perfil das proteínas da via colinérgica: BChE e AChE em pacientes e idosos controle.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Genotipar, em pacientes com a doença de Alzheimer (DA) e controles idosos (CI), os polimorfismos: *-116A* (rs1803274), *A539T* (rs1126680, variante *K*) e *1914G* do gene *BCHE*; *L72M* da *GHRL* (rs696217); *APOE4* do gene *APOE*; rs13086740 e rs2016846 do *MME*, e os SNPs rs3828419 e rs17449213 do gene *SLITRK3*, para uma amostra do estado de São Paulo e outra no estado do Paraná.
- 2) Verificar a presença de associação entre as variantes genotipadas e a doença de Alzheimer através da comparação entre as frequências alélicas e genotípicas entre os dois grupos (DA e CI).
- 3) Mensurar a concentração protéica da Apolipoproteína E (ApoE) por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA-Sanduiche) em plasma de pacientes com a doença de Alzheimer e controles idosos.
- 4) Otimizar um ensaio de imunoadsorção enzimática para quantificação plasmática da Butirilcolinesterase (BChE) e Acetilcolinesterase (AChE).
- 5) Avaliar o perfil (concentração proteica e atividade enzimática) total e funcional das proteínas Butirilcolinesterase (BChE) e Acetilcolinesterase (AChE) por ELISA-Sanduiche em plasma de pacientes com a doença de Alzheimer e controles idosos.

- 6) Comparar os níveis de concentração e atividade das proteínas avaliadas entre o grupo controle e DA e avaliar se existe associação entre os perfis protéicos e as variantes genéticas avaliadas.

4. JUSTIFICATIVA

A Doença de Alzheimer permanece sendo uma demência com patogênese e tratamento eficaz desconhecidos. Vários genes têm sido investigados no intuito de elucidar a dinâmica da doença. Todos os genes propostos, neste trabalho, atuam em regiões encefálicas e em vias que fazem parte do circuito colinérgico, afetados nas demências, gerando os sintomas característicos da síndrome demencial: a perda de memória e incapacidade para atividades de vida diária. Entre os fatores genéticos que possuem uma correlação com a DA está o alelo $\epsilon 4$ da *APOE* e a variante *K* da *BCHE*. Alguns autores sugerem uma sinergia entre variantes destes genes como fator de risco para a DA. Porém, os dados de associação são controversos.

A partir de dados indicando que, a variante *K* por si só não resulta na diminuição da atividade da BChE, mas sim apenas na presença de outras variantes em desequilíbrio de ligação (*-116A* e/ou *1914G*) sugeriu-se que este trabalho possa contribuir para elucidar a controvérsia em torno da associação entre variante *K* e DA. Isso, a partir da investigação da atividade e concentração dos níveis protéicos da BChE na presença e ausência destas variantes.

A controvérsia entre a associação ou não da BChE e DA pode ser decorrente do efeito de algum outro gene próximo a *BCHE*. Por essa razão, avaliamos também o gene *SLITRK3* ainda não investigado quanto à associação com DA. Esse gene tem ampla expressão no córtex cerebral adulto e no cérebro fetal, principalmente no hipocampo. A proteína Slitrk3 atua como um fator trófico de supressão neuritogênica, processo em desequilíbrio na DA. Outro gene próximo a *BCHE*, que vem apresentando associação com a DA, é o gene *MME*. Esse é amplamente expresso no córtex, exclusivamente nos neurônios. *MME* codifica a proteína neprilissina, com importante papel na degradação do peptídeo beta-amilóide, formador das placas senis em DA. Para ambos, *SLITRK3* e *MME*, foram selecionados SNPs representativos de blocos haplotípicos ao longo dos genes. O polimorfismo no gene *SLITRK3* rs3828419 é uma mutação missense no exon 2 (*ATT>GTT*), que confere substituição do aminoácido leucina por valina. O rs17449213 está localizado na porção 3'UTR, podendo estar relacionado com controle de transcrição do gene *SLITRK3*. Os SNPs do *MME*, rs13086740 (intron 3) e rs2016846 (intron 10) correspondem a substituição de base em regiões intrônicas, sendo que estas regiões podem ser importantes no controle do processo de splicing.

É importante ainda avaliar a atividade da BChE e da AChE com relação aos polimorfismos para o gene *BCHE*, pois estes podem influenciar a resposta ao inibidor

colinérgico em uso. Ainda que apenas a rivastigmina seja inibidora da AChE e da BChE, a inibição da AChE tende a aumentar a síntese de BChE. A resposta dos pacientes com DA aos IChE é heterogênea, muitos pacientes não apresentam resposta clínica esperada e 16% apresentam algum efeito colateral à medicação. Os efeitos dos IChEs ocorrem em uma janela terapêutica de 30% a 60% de inibição enzimática, e não há critérios claros para indicação de cada um dos inibidores. Consideramos que variantes que reduzem ou aumentam a atividade da enzima butiricolinesterase podem vir a gerar diferentes respostas aos medicamentos, e que sua avaliação possa contribuir na indicação do medicamento aos pacientes DA. No Brasil, em 2008, o Sistema Único de Saúde (SUS) forneceu, pelo Programa de Medicamentos Excepcionais, inibidores colinérgicos para 47.886 idosos com DA. Isso corresponde a 11,9% dos pacientes indicados para uso de IChEs, e ao gasto anual de R\$ 99.747.356,53. Destes pacientes, 71% fizeram uso de rivastigmina, 26% de Donepezil e 2,6% de galantamina.

Desta forma será possível, além de contribuir na elucidação de fatores genéticos e protéicos que atuam na doença de Alzheimer, buscar identificar marcadores que possam auxiliar no diagnóstico e tratamento das demências.

CAPÍTULO I

Analysis of *L72M GHRL* variant and Alzheimer's disease in a Brazilian Population

Manuscrito submetido à revista *Neuroscience Letters*

Daiane Priscila Simão-Silva^a, Patricia Fernanda Rocha Dias^a, Micheli Pecharki^a, Paulo Henrique Ferreira Bertolucci^b, Lucas Trevisani Rasmussen^c, Spencer Luiz Marques Payão^c, Mauro Roberto Piovezan^d, Lupe Furtado-Alle^a, Ricardo Lehtonen Rodrigues Souza^a

^aDepartment of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil;

^bDepartment of Behavioral Neurology, Federal University of São Paulo, Brazil; ^cDepartment of Genetic and Molecular Biology of Hemocentro, School of Medicine of Marília, São Paulo, Brazil

^dDepartment of Neurology and Cognitive Dysfunction Ambulatory, Hospital of Clinics of Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

ABSTRACT

In Alzheimer's disease (AD) the pattern of expression of ghrelin is modified. A reduction in this peptide hormone was observed in some regions of the brain as the hippocampus and the temporal lobe, both associated with cognitive system and memory. Ghrelin is the multifunctional hormone with an important role in regulation of energy balance and metabolic function and is encoded by the *GHRL* gene. The aim of this work was to verify the relationship of the *L72M GHRL* variant with Alzheimer's disease. By case-control association study, DNA samples from 194 AD patients and 201 elderly control (EC) were genotyped for *L72M* Ghrelin variant (rs696217) and the allele frequencies were similar in cases and controls (*L72M*: 9.07% and 7.71%, respectively). These results suggest that *L72M* variant is not a risk factor to Alzheimer's disease. We did not find association with this variant of *GHRL*, which has been correlated with metabolic effects and recent evidence, suggests a strict link between metabolic disorders and AD. This work does not exclude the possibility of action of the others variants or epigenetic control factors of *GHRL* in Alzheimer's disease.

Key Words: Ghrelin, *L72M* variant, rs696217, neurodegenerative disease, metabolic disorders.

INTRODUCTION

In Alzheimer Disease (AD) the pattern of expression of the orexigenic hormone ghrelin is modified [1]. In this neurological disorder is observed a profound and progressively cognitive decline, including memory loss, by the functional and morphological deterioration of the hippocampus and temporal lobe with accumulate of aggregates of the amyloid- β peptide (A β) and neurofibrillary tangles (NFT) [2]. In these areas of cognitive system and memory a reduction of ghrelin was observed in AD brain [3, 4].

Ghrelin is a hormone with a plethora of functions and it is codified by the *GHRL* gene and contains four exons but only exons 1 and 2 code for the mature peptide [5]. A family of related peptides that can be generated by alternative splicing and/or post-translational modifications from *GHRL* gene [6]. The *L72M* (C/A, rs696217, p.L72M, 408 nt) variant is located in exon 2, outside the coding region for mature ghrelin [7].

Ghrelin is known to play an important role in regulatory system for growth, energy homeostasis and metabolic function [8], has a significant role in neurotropy, particularly in the hippocampus [3] and in some inflammatory process [9]. It also acts in cognitive [4] memory and learning processes [3]. Ghrelin was correlated with a number of diseases, including anorexia nervosa [10], cachexia [11] eating disorder [12], heavy alcohol use [13], breast cancer [14], depression [15], and major depressive disorder [16], Prader-Willi Syndrome [17] Parkinson's disease [18] and Alzheimer Disease [3, 4, 19].

Considering that AD is deeply affected by the metabolic and inflammatory conditions and ghrelin carry out in the regulation of energy balance [4, 11] and inflammatory processes [9] we selected a variant of *GHRL* that was associated with metabolic syndrome and obesity [20], the *L72M*, to verify the relationship of this variant with Alzheimer's disease by a case-control association study in a Brazilian population.

METHODS

Population samples

The Brazilian subjects samples were obtained from Paraná and São Paulo States, from 395 elderly, being 194 AD patients (mean age 76.1 ± 8.77 ; males: 73, females: 121), with age and sex matched with 201 healthy controls (mean age 71.9 ± 8.25 ; males: 58, females: 143) as of Behavioral Neurology Ambulatory UNIFESP/EPM, Geriatric Ambulatory of FAMEMA and Cognitive Dysfunction Ambulatory, Hospital of Clinics UFPR by Paraná State.

The AD patients were diagnosed according to the NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's disease and Related Disorders Association) criteria for probable AD [21, 22]. The cohort has been previously described for control group [23]. All subjects gave informed consent for participation in this study and this research is approved by the institutional Ethics Committee study (Protocol number 1192.117.11.08). All experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Laboratory analysis

Total genomic DNA was extracted from peripheral blood samples using a Qiagen extraction kit, according to the manufacturer's instructions, or by a salting out method [24]. Genotyping of the *L72M* variant and *APOE* was performed with the kit TaqMan genotyping assays (Applied Biosystems).

Statistical analysis

Allele frequencies were obtained by direct counting. The chi-square test, used to compare categorical variables, was calculated using Clump software [25] and SPSS version 17.0 for Windows; (Chicago, Ill., USA) to performed Logistic regression (forward Wald method) to estimate the relationship between AD, *APOE* and *GHRL* polymorphism. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

The genotype distributions of the *L72M* variant of the *GHRL* gene were in Hardy-Weinberg equilibrium in patients and controls. Genotypes and allele frequencies of the *GHRL* variant analyzed are summarized in Table 1. The genotypic and allele distribution of rs696217 did not show significant differences between cases and controls.

The APOε4 allele showed, by logistic regression, strong association ($B = -1.648$, $SE = 0.230$, $Wald = 51.281$, $p = 0.000$, $exp(B) = 0.192$) with AD, but not synergistically with *L72M* variant or other subgroups of the AD patients.

Table 1. Genotypes and allele frequencies of *L72M GHRL* gene variants in Alzheimer Disease (AD) and Elderly control (EC), and results of comparisons by χ^2 (p) between them.

	AD		EC		χ^2	P
	N	Frequency (%)	N	Frequency (%)		
<i>GHRL</i> gene (rs696217)						
Genotype						
GG	161	83.42	171	85.07	1.14	0.56
GT	29	15.03	29	14.43		
TT	3	1.55	1	0.50		
Alleles						
G	351	90.93	371	92.29	0.47	0.49
T	35	9.07	31	7.71		

DISCUSSION

Although many researchers have shown that ghrelin is involved in the neuropathology of Alzheimer's disease [3, 4, 14], the only study of genetic association between *GHRL* gene and AD was performed in a Japanese population [19], and this is the first study in a Caucasian population. Similar to our study, Shibata and collaborators [19] did not find association between *L72M* variant of *GHRL* and AD, but their described genotype frequencies were significant different from our cases and controls ($p < 0.0001$). In Shibata's study [19] the heterozygote genotype was more frequent than expected and the genotype frequencies were not in HWE. Even so, our data are consistent in not finding association in a different population. When we compare the *L72M* variant frequencies from our sample with other Brazilian population study [26] and other Caucasian population [27], we did not find statistical difference between the frequencies ($p > 0.7$ and $p > 0.2$ respectively).

The *L72M* variant was correlated with obesity [7, 28, 29] higher triglyceride levels, dietary fat intake and lower HDL-cholesterol [30], higher body mass index (BMI) [28, 31], fat mass and visceral fat [31], modulation of glucose-induced insulin secretion [32], risk for type 2 diabetes [33] and increase in prevalence of metabolic syndrome [29, 30]. A large bibliography is available showing positive correlations between Alzheimer's disease and metabolic factors such as obesity, abdominal adiposity, [34] diabetes and insulin resistance, BMI [34, 35], abnormal glucose and insulin levels [36], and metabolic syndrome [37]. The

metabolic disturbance is an important factor contributing to neurodegenerative diseases; however, the neuropathological mechanisms underlying these changes are not yet clear [38].

CONCLUSION

The *GHRL* gene is very complex and can be regulated at multiple levels [6], and the *L72M* variant, located outside the coding region for mature ghrelin, could alter the stability of the mRNA or interfere with the splicing of the prepro-hormone. Despite the recent evidence that suggests a strict link between metabolic disorders and AD [37, 39, 40], in this work we did not find association with the variant of Ghrelin that has a known correlation with metabolic effects. Gahete *et al* [1] points to the need of works to establish the precise role of the ghrelin system in AD and although the *L72M* mutation is not affecting the susceptibility to AD, it does not exclude the possibility of action of other variants or epigenetic control factors of *GHRL* gene in Alzheimer's disease.

REFERENCES

- [1] M.D. Gahete, J. Cordoba-Chacon, R.D. Kineman, R.M. Luque, J.P. Castano, Role of ghrelin system in neuroprotection and cognitive functions: implications in Alzheimer's disease, *Peptides*. 32 (2011) 2225-2228.
- [2] M.P. Mattson, Pathways towards and away from Alzheimer's disease, *Nature*. 430 (2004) 631-639.
- [3] S. Diano, S.A. Farr, S.C. Benoit, E.C. McNay, I. Da Silva, B. Horvath, F.S. Gaskin, N. Nonaka, L.B. Jaeger, W.A. Banks, J.E. Morley, S. Pinto, R.S. Sherwin, L. Xu, K.A. Yamada, M.W. Sleeman, M.H. Tschop, T.L. Horvath, Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance, *Nat Neurosci*. 9 (2006) 381-388.
- [4] M.D. Gahete, A. Rubio, J. Cordoba-Chacon, F. Gracia-Navarro, R.D. Kineman, J. Avila, R.M. Luque, J.P. Castano, Expression of the ghrelin and neurotensin systems is altered in the temporal lobe of Alzheimer's disease patients, *J Alzheimers Dis*. 22 (2010) 819-828.
- [5] M. Korbonits, A.B. Grossman, Ghrelin: update on a novel hormonal system, *Eur J Endocrinol*. 151 Suppl 1 (2004) S67-70.
- [6] I. Seim, A.C. Herington, L.K. Chopin, New insights into the molecular complexity of the ghrelin gene locus, *Cytokine Growth Factor Rev*. 20 (2009) 297-304.
- [7] E. Miraglia Del Giudice, N. Santoro, G. Cirillo, P. Raimondo, A. Grandone, A. D'aniello, M. Di Nardo, L. Perrone, Molecular screening of the ghrelin gene in Italian obese children: the

Leu72Met variant is associated with an earlier onset of obesity, *Int J Obes Relat Metab Disord.* 28 (2004) 447-450.

[8] A.J. Van Der Lely, M. Tschop, M.L. Heiman, E. Ghigo, Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin, *Endocr Rev.* 25 (2004) 426-457.

[9] V.D. Dixit, E.M. Schaffer, R.S. Pyle, G.D. Collins, S.K. Sakthivel, R. Palaniappan, J.W. Lillard, Jr., D.D. Taub, Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells, *J Clin Invest.* 114 (2004) 57-66.

[10] U. Cuntz, E. Fruhauf, R. Wawarta, M. Tschop, C. Folwaczny, R. Riepl, P. Lehnert, M. Fichter, B. Otto, A role for the novel weight-regulating hormone ghrelin in anorexia nervosa, *Am Clin Lab.* 21 (2002) 22-23.

[11] C. De Vriese, C. Delporte, Influence of ghrelin on food intake and energy homeostasis, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 10 (2007) 615-619.

[12] P. Monteleone, A. Tortorella, E. Castaldo, C. Di Filippo, M. Maj, The Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene is significantly associated with binge eating disorder, *Psychiatr Genet.* 17 (2007) 13-16.

[13] S. Landgren, E. Jerlhag, J. Hallman, L. Orelund, L. Lissner, E. Strandhagen, D.S. Thelle, H. Zetterberg, K. Blennow, J.A. Engel, Genetic variation of the ghrelin signaling system in females with severe alcohol dependence, *Alcohol Clin Exp Res.* 34 (2010) 1519-1524.

[14] M.D. Gahete, J. Cordoba-Chacon, M. Hergueta-Redondo, A.J. Martinez-Fuentes, R.D. Kineman, G. Moreno-Bueno, R.M. Luque, J.P. Castano, A novel human ghrelin variant (In1-ghrelin) and ghrelin-O-acyltransferase are overexpressed in breast cancer: potential pathophysiological relevance, *PLoS One.* 6 (2011) e23302.

[15] M. Lutter, I. Sakata, S. Osborne-Lawrence, S.A. Rovinsky, J.G. Anderson, S. Jung, S. Birnbaum, M. Yanagisawa, J.K. Elmquist, E.J. Nestler, J.M. Zigman, The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress, *Nat Neurosci.* 11 (2008) 752-753.

[16] K. Matsuo, M. Nakano, M. Nakashima, T. Watanuki, K. Egashira, T. Matsubara, Y. Watanabe, Neural correlates of plasma acylated ghrelin level in individuals with major depressive disorder, *Brain Res.* 1473 (2012) 185-192.

[17] D.E. Cummings, K. Clement, J.Q. Purnell, C. Vaisse, K.E. Foster, R.S. Frayo, M.W. Schwartz, A. Basdevant, D.S. Weigle, Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome, *Nat Med.* 8 (2002) 643-644.

[18] Z.B. Andrews, D. Erion, R. Beiler, Z.W. Liu, A. Abizaid, J. Zigman, J.D. Elsworth, J.M. Savitt, R. Dimarchi, M. Tschoep, R.H. Roth, X.B. Gao, T.L. Horvath, Ghrelin promotes and

protects nigrostriatal dopamine function via a UCP2-dependent mitochondrial mechanism, *J Neurosci.* 29 (2009) 14057-14065.

[19] N. Shibata, T. Ohnuma, B. Kuerban, M. Komatsu, H. Arai, Genetic association between ghrelin polymorphisms and Alzheimer's disease in a Japanese population, *Dement Geriatr Cogn Disord.* 32 (2011) 178-181.

[20] L. Pulkkinen, O. Ukkola, M. Kolehmainen, M. Uusitupa, Ghrelin in diabetes and metabolic syndrome, *Int J Pept.* 2010 (2010)

[21] G. Mckhann, D. Drachman, M. Folstein, R. Katzman, D. Price, E.M. Stadlan, Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease, *Neurology.* 34 (1984) 939-944.

[22] M.W. Howard, T.E. Youker, V.S. Venkatadass, The persistence of memory: contiguity effects across hundreds of seconds, *Psychon Bull Rev.* 15 (2008) 58-63.

[23] D.P. Simao-Silva, P.H. Bertolucci, R.W. De Labio, S.L. Payao, L. Furtado-Alle, R.L. Souza, Association analysis between K and -116A variants of butyrylcholinesterase and Alzheimer's disease in a Brazilian population, *Chem Biol Interact.* 203 (2013) 358-360.

[24] D.K. Lahiri, J.I. Nurnberger, Jr., A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies, *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 5444.

[25] P.C. Sham, D. Curtis, Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci, *Ann Hum Genet.* 59 (1995) 97-105.

[26] V.G. Dantas, L. Furtado-Alle, R.L. Souza, E.A. Chautard-Freire-Maia, Obesity and variants of the GHRL (ghrelin) and BCHE (butyrylcholinesterase) genes, *Genet Mol Biol.* 34 (2011) 205-207.

[27] S.T. Sherry, M.H. Ward, M. Kholodov, J. Baker, L. Phan, E.M. Smigielski, K. Sirotkin, dbSNP: the NCBI database of genetic variation, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 308-311.

[28] O. Ukkola, E. Ravussin, P. Jacobson, E.E. Snyder, M. Chagnon, L. Sjostrom, C. Bouchard, Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in humans, *J Clin Endocrinol Metab.* 86 (2001) 3996-3999.

[29] C. Bing, L. Ambye, M. Fenger, T. Jorgensen, K. Borch-Johnsen, S. Madsbad, S.A. Urhammer, Large-scale studies of the Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene in relation to the metabolic syndrome and associated quantitative traits, *Diabet Med.* 22 (2005) 1157-1160.

[30] N.I. Steinle, T.I. Pollin, J.R. O'connell, B.D. Mitchell, A.R. Shuldiner, Variants in the ghrelin gene are associated with metabolic syndrome in the Old Order Amish, *J Clin Endocrinol Metab.* 90 (2005) 6672-6677.

- [31] O. Ukkola, E. Ravussin, P. Jacobson, L. Perusse, T. Rankinen, M. Tschop, M.L. Heiman, A.S. Leon, D.C. Rao, J.S. Skinner, J.H. Wilmore, L. Sjostrom, C. Bouchard, Role of ghrelin polymorphisms in obesity based on three different studies, *Obes Res.* 10 (2002) 782-791.
- [32] M. Korbonits, M. Gueorguiev, E. O'grady, C. Lecoer, D.C. Swan, C.A. Mein, J. Weill, A.B. Grossman, P. Froguel, A variation in the ghrelin gene increases weight and decreases insulin secretion in tall, obese children, *J Clin Endocrinol Metab.* 87 (2002) 4005-4008.
- [33] N. Liao, Z.K. Xie, J. Huang, Z.F. Xie, Association between the ghrelin Leu72Met polymorphism and type 2 diabetes risk: A meta-analysis, *Gene.* 517 (2013) 179-183.
- [34] L.A. Profenno, A.P. Porsteinsson, S.V. Faraone, Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders, *Biol Psychiatry.* 67 (2010) 505-512.
- [35] L.M. Besser, D.P. Gill, S.E. Monsell, W. Brenowitz, D.H. Meranus, W. Kukull, D.R. Gustafson, Body mass index, weight change, and clinical progression in mild cognitive impairment and Alzheimer disease, *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 28 (2014) 36-43.
- [36] J.A. Luchsinger, M.X. Tang, S. Shea, R. Mayeux, Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease, *Neurology.* 63 (2004) 1187-1192.
- [37] V. Frisardi, B.P. Imbimbo, Metabolic-cognitive syndrome: metabolic approach for the management of Alzheimer's disease risk, *J Alzheimers Dis.* 30 Suppl 2 (2012) S1-4.
- [38] S. Craft, Insulin resistance and cognitive impairment: a view through the prism of epidemiology, *Arch Neurol.* 62 (2005) 1043-1044.
- [39] S. Craft, The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and vascular dementia: two roads converged, *Arch Neurol.* 66 (2009) 300-305.
- [40] S. Merlo, S. Spampinato, P.L. Canonico, A. Copani, M.A. Sortino, Alzheimer's disease: brain expression of a metabolic disorder?, *Trends Endocrinol Metab.* 21 (2010) 537-544.

CAPÍTULO II

Association analysis between *K* and *-116A* variants of butyrylcholinesterase and Alzheimer's Disease in a Brazilian population.

Artigo publicado na revista *Chemico-Biological Interactions*

Daiane Priscila Simão-Silva^a, Paulo Henrique Ferreira Bertolucci^b, Roger William de Labio^c, Spencer Luiz Marques Payão^c, Lupe Furtado Alle^a, Ricardo Lehtonen Rodrigues Souza^a

^aDepartment of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil; ^bDepartment of Behavioral Neurology, Federal University of São Paulo, Brazil; ^cDepartment of Genetic and Molecular Biology of Hemocentro, School of Medicine of Marília, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

In Alzheimer's disease (AD) a reduction in acetylcholinesterase (AChE) and an increase in butyrylcholinesterase (BChE) activity are observed. *K* variant (*539T*) is the most common variant of the *BCHE* gene and, although controversial, several studies reported association between *K* variant and AD. Previous results showed that the *K* variant alone is not capable of diminishing BChE activity, depending on the presence of the *-116A* variant. Considering that, we conducted a case-control association study using a clinically well defined group of AD patients (n=82) and age and sex matched control subjects (EC; n = 78) in order to test the association with these variations of *BCHE* gene in a Brazilian population. The allele, genotype and haplotype frequencies of the *K* and the *-116A* variants of *BCHE* gene were not significantly different between cases and controls. Although not reaching statistical significance, the results suggested that the presence of *-116A* variant may have a protective effect against AD. The association of the *K* variant with AD in a controversial manner in different surveys is probably caused by its linkage disequilibrium with *-116A* that, by reducing BChE activity, potentially increases cholinergic transmission in comparison with usual genotypes.

Keywords: Alzheimer's disease; *BCHE*; Butyrylcholinesterase.

INTRODUCTION

In Alzheimer's disease (AD, OMIM 104300) a significant reduction in Acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) and an increase in Butyrylcholinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) activity are observed. These changes are especially found in the hippocampus, suggesting a relationship with the loss of episodic memory in AD [1, 2], and in the temporal cortex, where the increased level of BChE is associated with cognitive decline in dementias [3]. The acetylcholine hydrolyzing enzyme BChE is linked to the neurofibrillary tangles and amyloid plaques characteristic of AD [4]. BChE activity was related to the transformation of neurotoxic plaques from benign diffuse state to the compact malignant form associated with dystrophic neurites, degeneration and dementia in AD [5, 6]. Other studies ascertain that BChE is able to facilitate the suppression of amyloid formation and the presence of BChE in amyloid plaques implies that BChE incorporates into A β -fibrils at a late phase of their formation [7, 8].

Based in the biochemical evidences supporting a role of BChE in the pathophysiology of AD, studies have been conducted about the *BCHE* gene and AD. Over 65 genetic variants were described for *BCHE* gene [9], but AD association studies are restricted to the most common variant of the coding region of *BCHE* gene, the *K* variant (rs1803274, A539T). This mutation does not affect hydrolytic activity of BChE, but destabilizes and impairs its capacity to attenuate fibrils formation [7, 8] and is a long-debated risk factor for AD. The presence of the *K* variant was associated with 30% decrease in enzymatic activity of BChE in serum [10] but the *K* variant alone is not associated with decreased BChE activity, being the 5' UTR *-116A* variant necessary for this decrease [11]. 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 [12] with described frequency for Caucasian population among 5.0 to 9.3% [11, 13]. Considering the linkage disequilibrium between variants of exons 1 and 4 of the *BCHE* gene, and the effect of the presence of *-116A* variant on the BChE activity, we conducted this case-control study in order to test the association among AD and *-116* and *K* variants in a Brazilian population.

MATERIALS AND METHODS

Population samples

Samples were obtained from 160 Brazilian individuals, being 82 AD patients (mean age 74.5 ± 8.52) from the Behavioral Neurology Ambulatory UNIFESP/EPM, with age and sex matched with 78 healthy elderly controls (mean age 71.7 ± 8.85) from the Geriatric Ambulatory of FAMEMA. The AD patients were diagnosed according to the NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's disease and Related Disorders Association*) criteria for probable AD [14, 15]. The control group was given clinical, mental, and neurological examinations and exclusion criteria were a history and 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. Patients, as well as controls, were from São Paulo/SP/Brazil, and all subjects gave informed consent for participation in this study. The institutional Ethics Committee approved the study (Protocol number 1192.117.11.08). All experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Laboratory analysis

Total genomic DNA was extracted from peripheral blood samples using a Qiagen extraction kit, according to the manufacturer's instructions. Genotyping was performed with the kit TaqMan genotyping assays (Applied Biosystems), as previously described [16].

Statistical analysis

Allele frequencies were obtained by counting the alleles from the observed genotypes. The chi-square test, used to compare categorical variables, was calculated using Clump software [17]. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. For estimating haplotype frequencies the Arlequin software [18] was used.

RESULTS

Genotypes and allele frequencies of the *BCHE* variants analyzed are summarized in Table 1. In the examined samples the genotype distributions were in Hardy–Weinberg equilibrium. In the haplotype analysis, 4 haplotypes were found and their frequencies in controls and patients are shown in table 2.

Table 1. Genotypes and allele frequencies of *K* and *-116A BCHE* gene variants in Alzheimer Disease (AD) and Elderly control (EC), and results of comparisons (χ^2 , *p*) between them.

	AD		EC		χ^2	<i>p</i>	
	N	Frequency (%)	N	Frequency (%)			
<i>BCHE K</i>							
Genotype							
GG	50	64.10	47	58.75	1.17	> 0.20	
GA	22	28.20	29	36.25			
AA	6	7.69	4	5.00			
Allele							
		Frequency (%)		Frequency (%)	χ^2	<i>p</i>	Odds ratio (95% C.I.)
G	123	78.80 ± 0.03	123	76.88 ± 0.03	0.08	> 0.70	1.08 (0.64 - 1.83)
A	33	21.20 ± 0.03	37	23.12 ± 0.03			
<i>BCHE -116A</i>							
Genotype							
GG	72	88.90	62	78.48	3.18	> 0.05	
GA	9	11.10	17	21.52			
AA	0	0.00	0	0.00			
Allele							
		Frequency (%) ± SD		Frequency (%) ± SD	χ^2	<i>p</i>	Odds ratio (95% C.I.)
G	153	94.50 ± 0.02	141	89.25 ± 0.02	2.90	> 0.05	2.05 (0.89 - 4.75)
A	9	5.50 ± 0.02	17	10.75 ± 0.02			

Table 2. Haplotype frequencies and comparisons between Alzheimer Disease (AD) and Elderly control (EC).

Haplotypes	Variants of <i>BCHE</i>		Estimated frequency (%)	
	-116A	K	AD	EC
H1	A	A	5.77	9.25
H2	A	G	0.00	1.51
H3	G	A	16.03	14.17
H4	G	G	78.21	75.07
χ^2			2.57	
p			> 0.10	

DISCUSSION

The association of butyrylcholinesterase *K* variant with AD is controversial and, in present study study the allele frequencies of *K* variant were consistent with other studies which did not find association between AD and *K* variant [19, 20]. But differed significantly of studies such as Bizzaro *et al.* [21], which suggest a protective effect of *K* variant for AD, and differed also of surveys that suggest *K* variant as a risk factor for AD [22, 23]. Podoly *et al.* [25] considered that the controversial results are due to biochemical properties of variant *K*, which may have ambiguous effect on AD because the same structural features that destabilize BChE variant *K* are those that make it less effective as a neuroprotector. While the reduction in the activity attributed to *K* variant may be a protective factor for AD by increasing cholinergic transmission, [26], on the other hand, the unstable molecular conformation of variant *K* could affect its capability of attenuate fibril formation and thus act as a risk factor for AD [25]. These arguments differ from other work [27] which stated that the *K* variant is similar to wild-type BChE in enzyme activity and protein turnover, and proposed that the decrease in the number of circulating molecules, associated with the *K* variant phenotype, may be due to mutation in the promoter or regulatory region of the *BCHE* gene.

Another important finding, to which we give emphasis in our investigation, is that variant *K* alone does not reduces BChE activity, but only when associated with -116A variant of *BCHE* gene [11]. The -116A allele is found at low frequencies in natural populations and we found it in 5.5% AD patients chromosomes and almost two folds in EC chromosomes (table 1). This data, along with haplotype analysis, although not reaching statistical significance, provide the following considerations: 1) that the presence of -116A variant in

haplotype 1 and 2 (table 2) may be responsible for a reduction in BChE activity and potentially increased cholinergic transmission in comparison with usual genotypes, giving a protective effect against AD. Considering that the *K* variant alone is not capable of diminishing BChE activity, its association with AD in a controversial manner in different surveys is probably caused by its linkage disequilibrium with *-116A*; 2) the higher frequency of haplotype 3, which carries only the *K* variant, in AD group is consistent with the Podoly *et al.*[25] hypothesis, that the *K* variant generates enzymes with impaired stability and quaternary organization and consequently abolishes its hydrolytic activity, accounting for risk in terms of its interaction with aberrant A β . The lack of statistical significance, despite the great difference between the frequencies of haplotypes, is possibly due to the low allele frequency of *-116A* and to the balance between protective and predisposition effects that the *-116A* and *K* variants respectively confer.

It is known that BChE plays an important role in Alzheimer's disease, but the role of the variants of this enzyme needs to be better understood. In this work we conclude that the association of the *K* variant with AD is controversial in different surveys probably because of its linkage disequilibrium with *-116A* and that the analysis of *K* variant needs to be performed taking into account the *-116A* variant. We consider that the *-116A* variant is feasible to perform a protective role in AD while *K* variant may be a risk factor.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

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

REFERENCES

- [1] E.K. Perry, G. Blessed, B.E. Tomlinson, Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 4 (1978) 273–277.
- [2] T. Arendt, M.K. Brückner, M. Lange, V. Vigl, Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development – a study of molecular forms, *Neurochem. Int.* 21(1992)381–396.
- [3] E. Perry, I. McKeith, C. Ballard, Butyrylcholinesterase and progression of cognitive deficits in dementia with Lewy bodies, *Neurol.* 60 (2003) 1852–1853.
- [4] K.A. Carson, C. Geula, M.M. Mesulam, Electron microscopic localization of cholinesterase activity in Alzheimer brain tissue, *Brain. Res.* 540 (1991) 204–208.
- [5] A.L. Guillozet, J.F. Smiley, D.C. Mash, M.M. Mesulam, Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques, *Ann. Neurol.* 42 (1997) 909–918.
- [6] S. Darvesh, M.K. Cash, G.A. Reid, E. Martin, A. Mitnitski, C. Geula, Butyrylcholinesterase is associated with β -amyloid plaques in the transgenic APPSWE/PSEN1dE9 mouse model of Alzheimer disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71 (2011) 2–14.
- [7] S. Diamant, E. Podoly, A. Friedler, H. Ligumsky, O. Livnah, H. Soreq, Butyrylcholinesterase attenuates amyloid fibril formation in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (23) (2006) 8628–8633.
- [8] E. Podoly, G. Hanin, H. Soreq, Alanine-to-threonine substitutions and amyloid diseases: Butyrylcholinesterase as a case study, *Chem. Biol. Interact.* 187 (2010) 64–71.
- [9] R.L.R. Souza, L.R. Mikami, R.O.B. Maegawa, E.A. Chautard-Freire-Maia, Four new mutations in the *BCHE* gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample, *Mol. Genet. Metab.* 84 (2005) 349–353.
- [10] H.M. Rubinstein, A.A. Dietz, T. Lubrano, Ek1 another quantitative variant at cholinesterase locus 1, *J. Med. Genet.* 15 (1978) 27–29.
- [11] L. Furtado-Alle, F.A. Andrade, K. Nunes, L.R. Mikami, R.L.R. Souza, E.A. Chautard-Freire-Maia, Association of variants of the -116 site of the butyrylcholinesterase *BCHE* gene to enzyme activity and body mass index. *Chem. Biol. Interact.* 175 (2008) 115–118.
- [12] C.F. Bartels, A.F.L. van der Spek, B.N. La Du, Two polymorphisms in the non-coding regions of the *BCHE* gene, *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 6171.
- [13] S.T. Sherry, M.H. Ward, M. Kholodov, J. Baker, L. Phan, E.M. Smigielski, K. Sirotkin, dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 29(1) (2001) 308–311.

- [14] G. McKhann, D. Drachman, M. Folstein, R. Katzman, D. Price, E.M. Stadlan, Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease, *Neurol.* 34(1984)939-944.
- [15] M. W. Howard, T.E. Youker, V. Venkatadass, The persistence of memory: Contiguity effect across several minutes. *Psychon. Bull. Rev.* 15(2008) 58–63.
- [16] H. J. P. Gomes, R. L. R. Souza, F. C. Prevedello, M. T. Mira, E. A. Chautard-Freire-Maia, Investigation of Association between Susceptibility to Leprosy and SNPs inside and near the BCHE Gene of Butyrylcholinesterase, *Am. J. Trop. Med.*2012 (2012) 1-6.
- [17] P. C. SHAM, D. CURTIS, Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Annals Hum Genetics*, 59 (1995) 97-105.
- [18] S. Schneider, D. Roessli, L. Excoffier, A Software for Population Genetics Data Analysis, Version 2000, Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000, <http://anthropologie.unige.ch/arlequin/>.
- [19] N. Brindle, Y. Song, E. Rogaeva, S. Premkumar, G. Levesque, G. Yu, M. Ikeda, M. M. Nishimura, A. Paterson, S. Sorbi, R. Duara, L. Farrer, Analysis of the butyrylcholinesterase gene and nearby chromosome 3 markers in Alzheimer disease. *Hum Mol Genet.* 7(5) (1998) 933-935.
- [20] M. Piccardi, D. Congiu, A. Squassina, F. Manconi, P.F. Putzu, R.M. Mereu, C. Chillotti, M. Del Zompo, Alzheimer's disease: case-control association study of polymorphisms in ACHE, CHAT, and BCHE genes in a Sardinian sample. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 144B(7) (2007) 895-899.
- [21] A. Bizzarro, V. Guglielmi, R. Lomastro, A. Valenza, A. Lauria, C. Marra, M.C. Silveri, F.D. Tiziano, C. Brahe, C. Masullo, BuChE K variant is decreased in Alzheimer's disease not in fronto-temporal dementia, *J. Neural. Transm.*117(3) (2010) 377-83.
- [22] A.V. Raygani, M. Zahrai, A. Soltanzadeh, M. Doosti, E. Javadi, T. Pourmotabbed, Analysis of association between butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E genotypes in Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 371(2004) 142-146.
- [23] K. Beyer, J. I. Lao, P. Latorre, A. Ariza, Age at onset: an essential variable for the definition of genetic risk factors for sporadic Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1056 (2005) 260-278.
- [24] D.J. Lehmann, C. Johnston, A.D. Smith, Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and Apolipoprotein E4 in late onset confirmed Alzheimer's disease, *Hum. Mol. Genet.* 6 (1997) 1933–1936.

[25] E. Podoly, D.E. Shalev, S. Shenhar-Tsarfaty, E.R. Bennett, E. Ben Assayag, H. Wilgus, O. Livnah, H. Soreq, The butyrylcholinesterase K variant confers structurally derived risks for Alzheimer pathology, *J. Biol. Chem.* 284 (25) (2009) 17170–17179.

[26] K.K. O'Brien, B.K. Saxby, C.G. Ballard, J. Grace, F. Harrington, G.A. Ford, J.T. O'Brien, A.G. Swan, A.F. Fairbairn, K. Wesnes, T. del Ser, J.A. Edwardson, C.M. Morris, I.G. McKeith, Regulation of attention and response to therapy in dementia by butyrylcholinesterase, *Pharmacogenetics* 13 (4) (2003) 231–239.

[27] C.V. Altamirano, C.F. Bartels, O. Lockridge, The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild type enzyme, *J. Neurochem.* 74 (2000) 869–877.

CAPÍTULO III

A Variante *K* da *BCHE* está associada à Doença de Alzheimer? Uma Avaliação ao nível Plasmático.

INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer é caracterizada pela formação de emaranhados neurofibrilares (NFTs) intraneuronais e placas β -amilóides ($A\beta$) extracelulares (Hyman e Trajanowski, 1997). Além destas alterações estruturais, há uma perda generalizada dos neurônios colinérgicos e redução do neurotransmissor acetilcolina (ACh) (Davis *et al.*, 1997) resultando em uma disfunção colinérgica característica da DA (Coyle *et al.*, 1983). Essas alterações são concomitantes a uma mudança significativa das colinesterases, com redução na atividade da Acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e aumento na atividade da Butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) na via colinérgica cerebral (Perry *et al.*, 1978). Além disso, ambas as colinesterases são encontradas nas placas $A\beta$ e NFTs (Darvesh *et al.*, 2010). Estas alterações ocorrem principalmente no hipocampo, sugerindo uma relação com a perda de memória episódica na DA (Perry *et al.*, 1978; Arent *et al.*, 1992). O estudo de polimorfismos dos genes *BCHE* e *ACHE* vem sendo ferramentas muito utilizadas na busca do entendimento das alterações que ocorrem na via colinérgica nos pacientes com DA.

A mutação não sinônima *K* (539T) é a variante mais comum do gene *BCHE* e vários estudos já mostraram associação entre variante *K* e DA (Tilley *et al.*, 1999, Lehemann *et al.*, 2001; Daher-Shori *et al.*, 2011). No entanto, tal associação é controversa, enquanto alguns trabalhos sugerem um efeito protetor, outros sugerem a variante *K* como um fator de risco para a DA (Alvarez-Arcaya *et al.*, 2000). Podoly *et al.* (2009) discutem que os resultados controversos são devido às propriedades bioquímicas da variante *K*, a qual pode ter um efeito ambíguo sobre a DA: a relação de proteção é atribuída à variante devido a diminuição na atividade da BChE, o que aumentaria a neurotransmissão colinérgica, ao passo que as alterações estruturais da BChE-*K* desestabilizam a molécula, prejudicando a atuação neuroprotetora e tornando a variante *K*, um fator de risco.

Esta proposição difere dos resultados encontrados no trabalho de Altamirano *et al.*, (2000) que não identificaram diferença na atividade enzimática e na estrutura proteica entre a variante *K* e o tipo selvagem da BChE, propondo que a redução do número de moléculas circulantes no fenótipo variante pode ser devido a mutações no promotor ou uma região

reguladora do gene. Conforme Darveh *et al.*, (2000) a redução na atividade da BChE-K envolve a interação da forma variante com uma ou mais proteínas.

Outra consideração importante é que, de acordo com alguns estudos, a variante *K* pode, por si só, não estar associada com a diminuição da atividade da BChE, sendo necessária a presença das variantes *-116A* (Furtado-Alle *et al.*, 2008) e/ou variante *1914G* (Lima *et al.*, 2013). Simão-Silva *et al.*, (2013) sugerem que os estudos de associação com a variante *K* e DA são controversos possivelmente por causa do desequilíbrio de ligação com a *-116A* (SNP: G/A; rs1126680) e que a análise da variante *K* deve ser realizada tendo em conta essa variante. Os autores consideram também que a *-116A* pode conferir um papel protetor na DA, enquanto que a variante *K* pode ser um fator de risco. A variante *1914G* (SNP: A/G; rs3495) é encontrada preferencialmente em *cis* com *K* e *-116A* e está associada à diminuição na atividade da BChE (Lima *et al.*, 2013).

Existem muitos estudos sugerindo um sinergismo entre *BCHE-K* e o alelo $\epsilon 4$ do gene *APOE*, sendo esta associação um fator de risco para DA (Yoo *et al.*, 2014; Lane *et al.*, 2008; Raygani *et al.*, 2004). Darreh-Shori *et al.*, (2012) identificaram, em líquor, que a atividade da BChE-K na ausência do alelo *APOE4* é inalterada em pacientes com DA. Os autores sugerem que a variante BChE-K é ApoE4 dependente para atuação como fator de risco para DA através de uma modulação fenotípica da BChE e, na ausência da *K*, a *APOE4* pode conferir efeito protetor para doença. Esta modulação do genótipo *APOE4* sobre a BChE estaria afetando a expressão gênica do gene *BCHE*, a pós-transcrição ou a concentração da proteína através de uma interação que mantêm as moléculas da BChE circulante em estado latente.

Outra possibilidade apontada a fim de esclarecer a controvérsia entre a associação da *BCHE-K* com a doença de Alzheimer seria a sua possível associação com variantes de genes próximos ao gene *BCHE* (Combarros *et al.*, 2009). Estes também poderiam estar associados com a redução na atividade da BChE (Benyamin, *et al.*, 2011) ao invés das mutações no próprio gene *BCHE*.

Assim sendo, investigou-se dois genes a jusante ao gene da *BCHE*, o gene *SLITRK3* (MIM 609679: *SLIT-AND NTRK-LIKE FAMILY, MEMBER 3*) que está localizado no cromossomo 3 (3q26.2), contendo 2 exons, sendo apenas um deles codificante. Este gene é amplamente expresso no córtex cerebral adulto, com atuação da proteína Slitrk3 como um fator trófico de supressão neuritogênica (Aruga *et al.*, 2003), função esta alterada na DA. Os processos neuronais anormais, os neuritos distróficos (DNs), são encontrados em torno das placas amilóides e estão estreitamente associados com os emaranhados neurofibrilares em pacientes com DA (Pérez-Gracia *et al.*, 2008), justificando, desta forma, a possibilidade de

associação deste gene com a doença. Não foi encontrado na literatura nenhum estudo de associação entre o *SLITRK3* e a doença de Alzheimer até o momento. O outro gene também a jusante da *BCHE* considerado neste estudo foi o *MME* (MIM 120520: *MEMBRANE METALLO-ENDOPEPTIDASE*), cromossomo 3 (3q25.2), com 24 exons e que codifica a proteína madura neprililina, com 742 aminoácidos. Ocorre uma diminuição significativa nos níveis de mRNA do *MME* na doença de Alzheimer, estando a diminuição correlacionada com a deposição da proteína beta amilóide, mas não com a demência (Russo *et al.*, 2005).

Considerando os fatores apontados como potenciais interventores na associação da variante *K* e a doença de Alzheimer, este trabalho teve por objetivo: a) investigar a associação das variantes *K* e *-116A* do gene *BCHE* entre pacientes com a doença de Alzheimer e controles idosos (CI), assim como entre variantes dos genes a jusante da *BCHE*, o *MME* e o *SLITRK3*; b) avaliar o efeito da possível sinergia entre as variantes *K*, *-116A* e *1914G* do gene *BCHE*, variante *APOE4* do gene *APOE* e de duas variantes do gene *MME* (rs13086740; rs2016846) e *SLITRK3* (rs13086740; rs2016846) com relação aos perfis plasmático da BChE e AChE (atividade e concentração) e da APOE (concentração) na DA e CI.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra Populacional

A amostra foi obtida no Estado do Paraná, sendo constituída por 230 idosos, predominantemente Euro-Brasileiros, sendo 112 com a doença de Alzheimer e 118 idosos controles provenientes do Ambulatório de Disfunção Cognitiva do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e do Ambulatório de Desordens de Memória e do Comportamento do Instituto de Neurologia de Curitiba. O critério de diagnóstico utilizado foi o NIA-AA (*National Institute on Aging – NIA e Alzheimer’s Association - AA*) (McKhann *et al.*, 2011). Tal critério foi estabelecido com base no DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), com adaptações para o diagnóstico PROVÁVEL de doença de Alzheimer. Para este trabalho, foi considerada a função cognitiva global avaliada por meio do teste de rastreio padrão MEEM (Mini-Exame de Estado Mental) (Folstein *et al.*, 1975). Para o estagiamento da doença foi considerado a escala clínica de Demência, o CDR (*Clinical Dementia Rating*), que vai de 0 (cognitivamente saudável), 0,5 para um nível de comprometimento leve da cognição (CCL) e nos estágios da doença de 1 a 3, sendo leve (1), moderada (2) e grave (3) (Moris, 1993).

Para amostras do grupo controle foram priorizados sexo e idade aproximada à dos pacientes com DA, que não apresentassem sequelas de Acidente Vascular Cerebral, nem depressão profunda e não alcoolistas, tendo sido avaliados pelo Mini Exame do Estado Mental e pela aplicação do PFEFFER. Todos os sujeitos consentiram na participação neste estudo. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da instituição onde o estudo foi realizado (protocolo de aprovação: 1192.117.11.08) Todos os experimentos foram realizados em conformidade com a Declaração de Helsinki.

Análise Laboratorial

Genotipagem das variantes alélicas

O DNA genômico total foi extraído do sangue periférico pelo método salting out (Lahiri e Nurnberger, 1991) e diluído para concentração final de 20 ng/μL. A genotipagem foi realizada utilizando Kits de *TaqMan SNP Genotyping Assays* (Applied Biosystems) para as variantes -116A (rs1803274; alelos, A/G), 1914A (rs3495 alelos A/G) e 539T (rs1126680; alelos G/A: usual e variante K) do gene *BCHE*, do gene *APOE* (rs429358 alelos T/C e rs7412 alelos C/T sendo TT = *APOε2*, TC = *APOε3* e CC = *APOε4*), *MME* (rs13086740; alelos A/G e rs2016846; alelos G/T) e *SLITRK3* (rs3828419; alelos A/G e rs17449213; alelos A/G) de acordo com as instruções do fabricante.

Mensuração da concentração proteica da ApoE

Os níveis da proteína ApoE no plasma das amostras de pacientes e controles foram medidos por ELISA (*sandwich enzyme linked immunosorbent assay*) como descrito por Darreh-Shori *et al.*, (2009), utilizando o anticorpo de captura MAB A1.4Ab (Mouse anti-ApoE, monoclonal Ab, Sigma) e GAB947 Ab (Goat anti-ApoE, polyclonal, AB947, Chemincon Int.) após incubação das amostras de plasma diluídas 500X em tampão TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 0.9% NaCl; 0.05% Tween 20; todos da Sigma). O controle positivo utilizado foi ApoE humana purificada (ALP70-50UG, Merck).

Análise da concentração e atividade da AChE e otimização do protocolo para BChE no plasma

O padrão de atividade e concentração protéica da AChE foi mensurado seguindo o método descrito por Darreh-Shori *et al.*, (2008) com alteração apenas dos anticorpos utilizados para detecção de AChE à nível plasmático (não em líquido). Foram utilizados os anticorpos HR2 Ab (ABR) Mouse anti-AChE, monoclonal e C16 Ab, Goat anti-AChE, policlonal sc6430, seguindo as recomendações de diluição do fabricante (SCBT).

A atividade e concentração da BChE foram avaliadas conforme descrito por Darreh-Shori *et al.*, (2011) e funcional (BChE-F), com otimização do protocolo para análise do plasma. A atividade total (BChE-T) foi mensurada pelo método colorimétrico de Ellman modificado, utilizando iodeto de Butirilcolina (BTC) como substrato (concentração final 5,0 mM Sigma, St. Louis, MO) com inibidor seletivo da AChE, BW284C51 (concentração final 1,0 μ M, Sigma) (Darreh-Shori *et al.*, 2006). A proporção de proteína ativa, denominada funcional (BChE-F) consiste na mensuração da BChE circulante após medição da proporção da proteína BChE por ELISA sanduíche. Após a conclusão do ELISA sanduíche as placas foram lavadas por 2 vezes (5 minutos) com tampão TBS-T^{0,05%} (Tris-NaCl, pH 7,6, 0,05% Tween 20; 300 μ L/poço) e uma vez com tampão DEA (Diethanolamine, 1,0M, pH 9,8). Em seguida, foi adicionado o substrato p-Nitrophenyl-Na₂-6H₂O, diluído em tampão DEA (200 μ L/poço; sem o inibidor BW280C51) e incubado por duas horas. A leitura cinética foi realizada a 405nm, obtendo a proporção das moléculas da BChE imunoabsorvidas na placa para cada amostra, sem interferência da atividade de fosfatases alcalinas, por exemplo (Darreh-Shori *et al.*, 2009). Foi utilizado como controle, para determinação da curva padrão, um pool de plasma de 20 amostras provenientes de banco de plasma do Departamento de Neurobiologia do Instituto Karolinska em Estocolmo - SE, local onde os experimentos foram realizados.

O nível de proteína BChE no plasma foi medido por ELISA sanduíche, com modificações do protocolo descrito por Darreh-Shori *et al.*, (2006). As amostras foram diluídas em 400X em tampão TBS-T^{0,2%} e como padrão para quantificação proteica foi utilizado Butirilcolinesterase parcialmente purificada do soro humano (c-9971, Sigma). Para quantificação do padrão protéico foram utilizados dois anticorpos seletivos para BChE humana: para captura o anticorpo monoclonal 3E8 Ab17246 (Mouse anti-BChE,; Abcam) e pós incubação com antígeno o anticorpo policlonal Ab82307 (Rabbitanti-BChE, Abcam). As placas de ELISA Nunc-maxisorb foram cobertas durante a noite a 4°C pela adição da solução

do anticorpo 3E8 (Fator de diluição: 1/500 em solução de carbonato pH 9,5). Após lavagem, as placas foram incubadas por duas horas em temperatura ambiente (TA; 22,5°C) em solução bloqueadora (5% BSA em solução de carbonato). A incubação das amostras controle e das amostras de plasma (todas em triplicata) foi de 2 horas em temperatura ambiente (50 uL/poço). Posterior à incubação, foram adicionados 25 uL/poço do mastermix com o substrato BTC para leitura da atividade conforme já descrito. Depois da leitura, as placas permaneceram incubadas por 3 horas a 4°C e foram lavadas para próxima incubação com o segundo anticorpo policlonal (Fator de Diluição: 1:1000 em TBS-T-BSA), por 1 hora em TA. Após a lavagem as placas foram incubadas, por igual período e temperatura, com o anticorpo conjugado à fosfatase alcalina (Anti-Rabbit IgG Ap conjugate, Promega; FD: 1/1000). A próxima incubação consistiu de 200 uL de substrato (di-sodium 4-nitrophenyl phosphate, 10 mM, #73724, Sigma) em tampão DEA por duas horas em TA, com leituras subsequentes no espectrofotômetro (SpectraMax 250; Molecular Devices Corporation) em 405 nm utilizando o software SOFTmax PRO (versão 2.6.1 for PC; Molecular Devices Corporation).

Análises Estatísticas

As frequências alélicas, genotípicas e o resultado para o teste da hipótese de equilíbrio de Hardy–Weinberg foram obtidos com uso do programa estatístico R (R Development Core Team, 2008) e StatView. Os testes de Qui-quadrado (χ^2) foram realizados com o Clump.

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a normalidade da distribuição das variáveis. As comparações entre as médias foram realizadas pelo teste t (variáveis paramétricas) pelo teste de Mann-Whitney (variáveis não-paramétricas), e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação entre medianas dentro dos grupos.

Foram realizadas análises de regressão múltipla (Stepwise), correlação de Spearman (não-paramétricas) e Z teste bicaudal (paramétricas) entre variáveis independentes. Um nível de 5% de significância foi adotado para todas as análises estatísticas realizadas. Os gráficos e figuras foram geradas no programa StatView 5.0.

RESULTADOS

Amostra

As características da população amostrada estão organizadas na Tabela 1. A amostra obtida de pacientes com a doença de Alzheimer foi heterogênea em relação ao uso dos medicamentos para a doença, sendo esses os inibidores de colinesterase (ChEIs) e a Memantina, um antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). A AChE é o alvo primário dos inibidores das colinesterases (donepezil- DNP e galantamina- GLT) e AChE e BChE podem ser inibidas pela Rivastigmina (RVG). Desta forma, não foi possível o estabelecimento de um grupo *baseline* e para os resultados referentes à atividade enzimática da BChE e AChE o uso ou não dos inibidores foi levado em consideração.

Associação genética

As distribuições genótípicas estão em equilíbrio de Hardy–Weinberg para todos os polimorfismos avaliados. A variante *1914G* do gene *BCHE* não foi genotipada para as amostras controle, não constando, desta forma, nas análises de associação. As frequências alélicas e genótípicas para todas as variantes podem ser vistas na Tabela 2. Apenas o alelo *APOE4* do gene *APOE* foi associado com a doença de Alzheimer (Tabela 2).

Não houve diferença significativa na atividade e concentração da BChE entre o grupo de pacientes em uso dos inibidores colinesterásicos ($n = 77$) e não usuários ($n = 33$), (BChE-F = $1,56 \pm 0,69$ nmol/min/ug; $t = -0,071$; $p = 0,94$). Quando comparadas as médias de atividade/concentração entre os diferentes tipos de inibidores, também não houve diferença significativa entre eles, inclusive entre o uso ou não ($p = 0,65$) da Rivastigmina (inibidor da BChE e AChE). Considerando a variante *K* da *BCHE*, estar fazendo uso ou não de inibidores não diferiu na atividade da enzima (BChE-F: $K^+ = 1,43 \pm 0,55$ nmol/min/ug; em BChE- $K^- = 1,61 \pm 0,73$ nmol/min/ug; $t = -0,35$; $p = 0,53$). A atividade funcional da BChE (BChE-F) e a concentração total BChE-T ($p = 0,00$), foram significativamente distintas entre casos e controles, conforme é apresentado na Tabela 1. Houve correlação positiva, tanto nos casos quanto nos controles, entre a atividade da BChE-F e a concentração protéica funcional (DA: $\rho = 0,51$; $p = 7,09e^{-09}$; CI: $\rho = 0,56$; $p = 2,92e^{-11}$) e, na figura 1, entre a atividade da BChE-F e concentração da BChE total.

Tabela 1. Características da população (total), pacientes (DA) e controles (CI) e a média do perfil (concentração e atividade) da butirilcolinesterase \pm desvio padrão (D.P) no plasma.

	DA n = 112	CI n = 118	Total n = 230	
	Média \pm D.P	Media \pm D.P	Media \pm D.P	<i>p</i> *
Idade	77,72 \pm 8,53	72,10 \pm 7,08	74,89 \pm 8,69	0,05
Anos de Estudo	5,32 \pm 4,58	6,33 \pm 4,57	5,84 \pm 4,64	0,10
MEEM	13,44 \pm 8,37	26,77 \pm 2,58	20,02 \pm 9,08	0,00
IMC^a	24,85 \pm 3,88	27,57 \pm 4,21	26,30 \pm 4,27	0,00
Sexo M/F	44/68	32/86	76/154	0,06
Perfil da BChE				
Atividade				
BChE-T^b	2,58 \pm 0,85	2,71 \pm 0,86		0,23
BChE-F^c	1,43 \pm 0,68	1,71 \pm 0,66		0,00
Concentração^d				
BChE-F	4,03 \pm 1,32	4,24 \pm 1,32		0,22
BChE-T	8,12 \pm 4,46	6,19 \pm 3,16		0,00
BChE T-F**	4,09 \pm 2,53	1,95 \pm 2,69		0,00
Perfil da AChE				
Atividade	4,21 \pm 2,31	3,81 \pm 1,33		0,00
Proteína	13,05 \pm 13,38 $\mu\text{g/mL}$	14,26 \pm 18,93 $\mu\text{g/mL}$		0,27

Notas: ^a n = 68 e 77 respectivamente. ^b Atividade enzimática em nmol/min/mL e ^c nmol/min/ μg . ^d Concentração proteica em ng/mL. **t*-test para variáveis paramétricas; Mann-Whitney teste U para variáveis não paramétricas e χ^2 para teste de distribuição de variáveis. ** Diferença entre a concentração total e funcional da BChE. MEEM = Mini Exame do Estado Mental (Escala de 0 a 30); IMC = Índice de Massa Corporal.

Tabela 2. Frequências alélicas e genótípicas das variantes do gene *BCHE*, *SLITRK3*, *MME* e *APOE* na Doença de Alzheimer (DA) e Controles idosos (CI) e os resultados das comparações (χ^2 , p) entre elas.

	AD		CI		χ^2	P		AD		CI		χ^2	p
	N	F	N	F				N	F	N	F		
<i>BCHE</i>													
<i>K</i> (rs1803274)							<i>-116A</i> (rs1126680)						
Genótipo							Genótipo						
GG	68	0,64	77	0,67	0,48	0,5	GG	88	0,81	99	0,85	0,6	0,5
GA	29	0,29	32	0,28			GA	20	0,18	17	0,15		
AA	3	0,07	6	0,05			AA	1	0,01	1	0,01		
Alelos							Alelos						
G	167	0,78	186	0,81	0,55	0,5	G	196	0,9	215	0,92	0,53	0,5
A	47	0,22	44	0,19			A	22	0,1	19	0,08		
<i>SLITRK3</i>													
<i>rs 3828419</i>							<i>rs17449213</i>						
Genótipo							Genótipo						
AA	101	0,93	112	0,96	1,88	0,2	GG	95	0,89	98	0,84	1,30	0,2
AG	8	0,07	5	0,04			GA	11	0,10	17	0,15		
GG	0	0	0	0			AA	1	0,01	1	0,01		
Alelos							Alelos						
A	200	0,92	220	0,94	0,89	0,5	G	13	0,06	19	0,08	0,95	0,5
G	18	0,08	14	0,06			A	201	0,94	213	0,92		
<i>MME</i>													
<i>rs13086740</i>							<i>rs2016846</i>						
Genótipo							Genótipo						
AA	82	0,71	83	0,73	0,91	0,5	GG	30	0,31	34	0,33	3,3	0,1
AG	24	0,26	31	0,24			GT	51	0,53	46	0,44		
GG	3	0,03	3	0,03			TT	15	0,16	25	0,24		
Alelos							Alelos						
A	184	0,85	197	0,84	0,08	0,8	G	111	0,54	114	0,58	0,5	0,5
G	32	0,15	37	0,16			T	81	0,46	96	0,42		
<i>APOE</i>							<i>BCHE</i>						
							<i>1914G</i> (rs3495)						
Genótipo							Genótipo						
23	12	0,11	12	0,10	20,21	0,0	GG	22	0,40				
33	43	0,38	81	0,67			GA	19	0,35				
24	7	0,06	0	0,00			AA	14	0,25				
34	44	0,39	27	0,22			G	63	0,57				
44	8	0,07	1	0,01			A	47	0,43				
Alelos													
2	19	0,08	12	0,04	25,69	0,0							
3	142	0,62	201	0,83									
4	67	0,29	29	0,12									

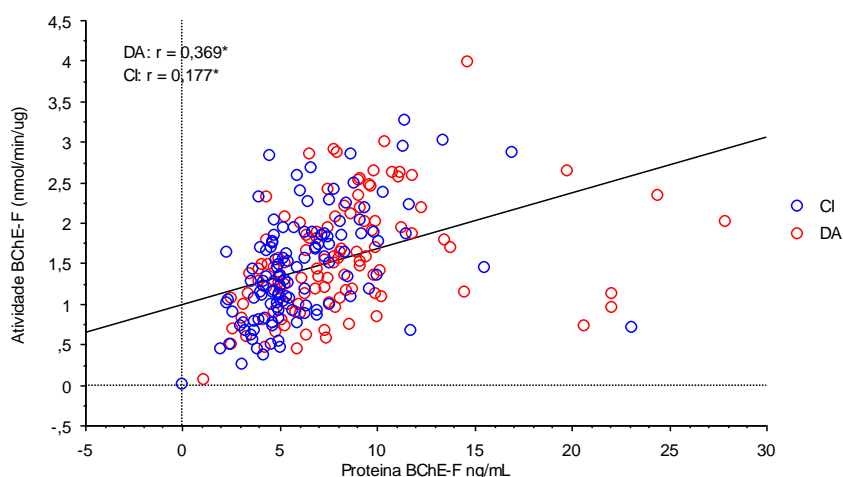


Figura 1. Correlação entre a atividade funcional da BChE e a concentração proteica total (BChE-T). * $p < 0,0001$.

Perfil proteico e enzimático da BChE

Considerando que houve diferença na atividade funcional da BChE entre casos e controles, foi conduzida uma análise de regressão múltipla, considerando a BChE-F como variável dependente e as variantes genéticas, presença ou não da doença, ApoE, atividade e concentração da AChE, sexo, idade, índice de massa corpórea (IMC), presença e ausência da DA e o uso de inibidores como variáveis independentes. Destas, atuaram como fatores independentes: a presença ou não da doença ($\beta = 0,37 \pm 0,119$; $p = 0,00$), a variante *rs2016846* do gene *MME* ($\beta = 0,20 \pm 0,197$; $p = 0,01$), a atividade da AChE ($\beta = 0,14 \pm 0,053$; $p = 0,01$).

Variantes da BCHE e APOE4 e o perfil da BChE

Para BChE-T, que não diferiu entre os grupos, a redução da atividade na presença do alelo K^1 foi de 22,8% na amostra como um todo (BChE- K^+ = $3,92 \pm 1,67$ nmol/min/ μ g; BChE- K^- = $5,08 \pm 2,40$ nmol/min/ μ g; $p = 0,008$) independente da DA ($p = 0,18$) e do alelo

¹Foi adotada a nomenclatura K^+ , por exemplo, para designar a presença da variante, desta forma K^+ representa os genótipos homozigotos KK (AA) somados aos heterozigotos KU (AG), sendo K^- o genótipo homozigoto para forma usual (UU). Para as outras variantes dos genes *BCHE* e *MME* foram adotadas as letras referentes às formas alélicas não usuais A, G e T, sendo A^+ (AA+AG) e A^- (GG) e assim por diante. Para *APOE* foi considerada apenas a presença ou não do alelo $\epsilon 4$, sendo *APOE* $\epsilon 4^+$ as variantes *APOE* $\epsilon 4\epsilon 4$ somada a *APOE* $\epsilon 2 \epsilon 4$, *APOE* $\epsilon 3\epsilon 4$.

APOE4 ($p = 0,10$). O alelo *APOE4* do gene *APOE*, associado ou não às variantes da *BCHE*, não esteve associado com a atividade ou nível de concentração protéica da BChE entre os grupos.

O alelo *-116A* na presença ou não da variante *K*, também não foi associado com o perfil plasmático da BChE. A variante *1914G* (genotipada apenas no grupo de pacientes), se associada com a *K*, representou redução em 25% na atividade da BChE-F ($n = 13$: BChE - $1914G^+$ e $K^+ = 1,40 \pm 0,35$ nmol/min/ μ g; $n = 65$: BChE - não $1914G^+$ e $K^+ = 1,75 \pm 0,43$ nmol/min/ μ g; $t = 2,13$; $p = 0,01$). K^+ sem a variante *1914G* não esteve associada com a redução na atividade da BChE (K^+/G^- $n = 71$ e não - K^+/G^- $n = 20$; $t = -0,34$; $p = 0,71$). Quando considerado a interação *1914G* e *-116A* não houve diferença significativa na atividade da BChE. Desta forma, na doença de Alzheimer, a redução da atividade da BChE mostrou-se associada apenas à presença das variantes *K* e *1914G* do gene *BCHE* (Figura 2).

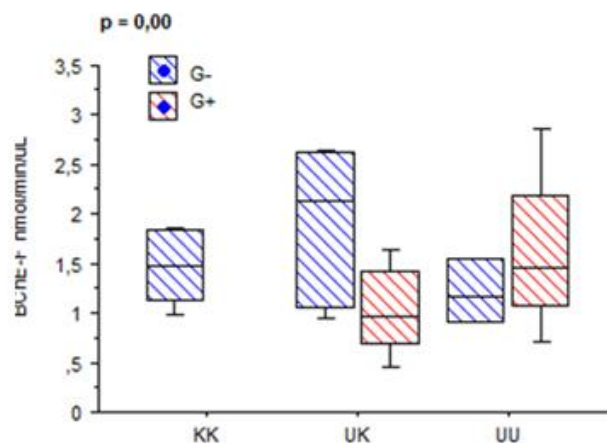


Figura 2. Atividade enzimática total da BChE (nmol/min/mL) em relação a presença da variante *1914G* e genótipo da variante *K*.

MME e o perfil da BChE

Por meio da análise de regressão, considerando-se o perfil da BChE como variável dependente, apontou-se que as variantes do gene *MME* atuam como fatores independentes sobre a atividade e concentração protéica da BChE. Tal resultado foi confirmado pelo teste de correlação e comparação entre as médias nos grupos considerando a presença e ausências das variantes. No grupo controle a atividade e concentração da proteína BChE está aumentada na presença do alelo usual da variante rs2016846 em homozigose ($n = 64$: GG = $1,64 \pm 0,55$

nmol/min/ μ g; n = 97: TG = $1,41 \pm 0,42$ nmol/min/ μ g; t = 1,91; p = 0,04), conforme pode ser visto na Tabela 3. No grupo Alzheimer, a distribuição genotípica diferiu significativamente entre o estágio leve da demência (CDR1) e os demais estágios (CDR2 e CDR3) ($\chi^2 = 10,75$; p = 0,02). A comparação entre AD, em CDR2 + CDR3, e controle mostraram uma diminuição significativa na frequência do alelo não usual (T) em homozigose ($\chi^2 = 8,01$, p = 0,012) (Tabela 4), mas sem diferença significativa na atividade da BChE (Figura 3).

Tabela 3. Perfil enzimático e proteico da BChE em relação aos genótipos do *MME* para as variantes rs2016846 e rs13086740 no grupo de idosos controle (CI).

<i>MME</i> rs2016846	CI			<i>MME</i> rs13086740	CI	
	Média \pm D.P		%*		Media \pm D.P	
	TG + TT	GG	P	GG + GA	AA	p
Atividade	n = 69	n = 33	14%	n = 33	n = 81	20%
BChE-T^a	2,62 \pm 0,87	2,99 \pm 0,84	0,04	2,35 \pm 0,92	2,83 \pm 0,81	0,007
BChE-F^b	n = 69 1,35 \pm 0,65	n = 33 1,66 \pm 0,69	23% 0,03	n = 33 1,26 \pm 0,74	n = 81 1,48 \pm 0,62	0,108
Proteína^c	n = 69	n = 33	14%	n = 33	n = 81	19%
BChE-F	4,10 \pm 1,31	4,67 \pm 1,35	0,04	3,70 \pm 1,26	4,42 \pm 1,34	0,008

Notas: ^aAtividade enzimática em nmol/min/mL e ^bnmol/min/ μ g. ^cConcentração proteica em ng/mL. * % de aumento da atividade ou da concentração protéica.

Tabela 4. Frequências alélicas e genotípicas da variante rs2016846 do gene *MME* nas fases leve (CDR1), moderada (CDR2) e grave (CDR3) da doença de Alzheimer e os resultados das comparações (χ^2 , p) entre elas.

	CDR1 n = 31		CDR 2 n = 36		CDR 3 n = 29		χ^2	P
	N	F (%)	N	F (%)	N	F (%)		
<i>MME</i> gene (rs2016846)								
Genótipo								
GG	9	29,03	10	27,78	11	37,93	10,75	0,001
GT	12	38,71	23	63,89	16	55,17		
TT	10	32,26	3	8,33	2	6,90		
Alleles								
G	30	48,35	43	59,38	38	65,52	3,78	0,100
T	32	52,65	29	41,62	20	34,48		

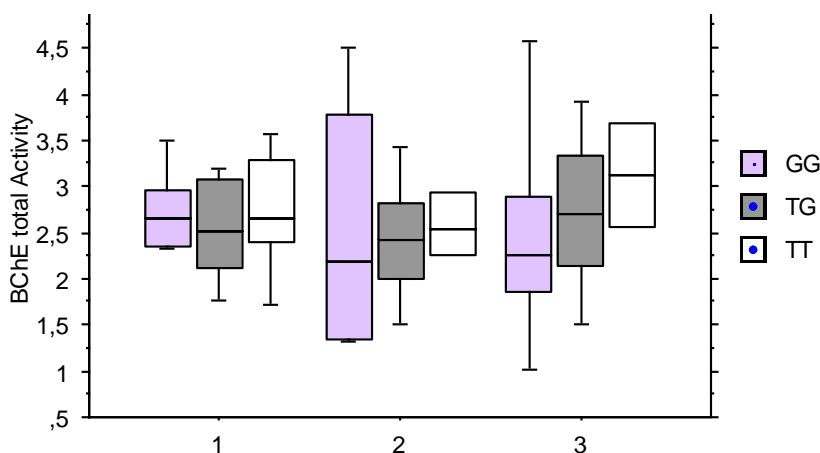


Figura 3. Atividade da BChE (nmol/min/mL) nos três diferentes estágio da Doença de Alzheimer (CDR: 1 = leve; 2 = moderado e 3 = grave) de acordo com o genótipo para variante rs2016846 do gene *MME*.

Houve associação entre as distribuições genótípicas da variante do *MME rs2016846* e a variante *K* ($\chi^2 = 13,90$; $p = 0,00$) e *1914G* ($\chi^2 = 8,64$; $p = 0,00$), mas não com a *-116A*. A correlação foi negativa entre a presença da variante *K* e o alelo usual da *MME* (*G*), associado ao aumento da atividade da BChE. As médias de atividade e concentração protéica para BChE diferiram significativamente no grupo CI, para o qual não foi realizada a genotipagem do loco *1914G*. Para a variante rs13086740 o perfil protéico e enzimático da BChE estiveram diminuídos no grupo controle na presença da variante *G* (Tabela 3).

ApoE e o perfil da BChE

A concentração da proteína ApoE aumentou significativamente na doença de Alzheimer (DA = $18,28 \pm 8,48$ $\mu\text{g/mL}$; $t = 6,41$; $p = 0,00$; CI = $12,51 \pm 4,70$ $\mu\text{g/mL}$; $t = 6,41$; $p = 0,00$) e foi considerada na análise de regressão múltipla como variável dependente e as variantes da *APOE*, *BCHE*, *SLITRK3*, *MME* e a presença ou não da doença, atividade e concentração da BChE como variáveis independentes. Nessa análise, a *APOE4* ($\beta = -4,23 \pm 1,7$, $p = 0,01$), atividade BChE-F ($\beta = -1,18 \pm 1,37$, $p = 0,03$) e variante *-116A* da *BCHE* ($\beta = 3,28 \pm 1,37$, $p = 0,01$) contribuem, independente, com a concentração da ApoE. Na análise de correlação de Spearman a atividade BChE-F e a concentração de ApoE apresentaram fraca correlação negativa ($\rho = -0,172$; $p = 0,01$) (Figura 4). Comparando a média das concentrações da ApoE entre a presença da variante *-116A*, houve aumento significativo da concentração protéica na amostra total ($n = 37$; $A^+ = 17,52 \pm 6,92$ $\mu\text{g/mL}$; $n = 189$; $A^- = 14,77 \pm 8,37$ $\mu\text{g/mL}$; $t = -2,12$; $p = 0,03$) e no grupo DA ($n = 20$; $A^+ = 21,58 \pm 8,68$ $\mu\text{g/mL}$; $n = 88$; $A^- =$

$17,41 \pm 6,53 \mu\text{g/mL}$; $t = -2,05$; $p = 0,04$) (Figura 5a). Quando considerada *APOE4*, a presença desta variante representou diminuição na concentração da ApoE no grupo de pacientes ($n = 55$: $\text{ApoE}^{4+} = 16,20 \mu\text{g/mL} \pm 7,05$; $n = 54$: $\text{ApoE}^{4-} = 20,23 \mu\text{g/mL} \pm 8,95$; $p = 0,01$) (Figura 5b).

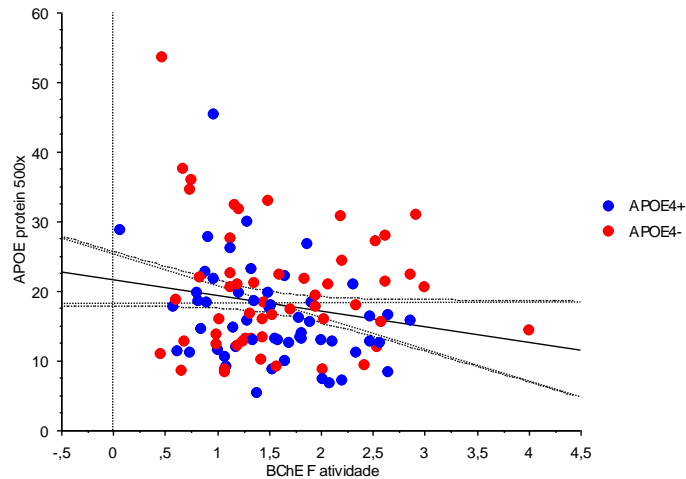


Figura 4. Correlação entre a atividade da BChE funcional (nmol/min/ μg) e a concentração da proteína ApoE ($\mu\text{g/mL}$) no grupo de pacientes com Alzheimer considerando a presença da variante *APOE4* (*APOE4+*) ou ausência (*APOE4-*), $\beta = -1,18 \pm 1,37$, $p = 0,03$.

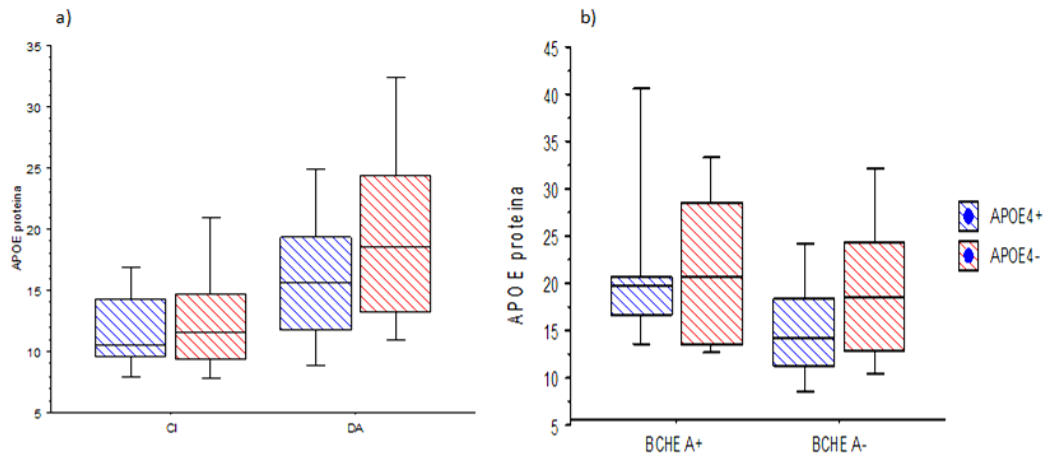


Figura 5. Concentração da proteína ApoE ($\mu\text{g/mL}$) de acordo com a presença (*APOE4+*) ou ausência (*APOE4-*) da variante *APOE4* a) nos grupo controle (CI) e nos pacientes (DA), b) e na presença (A+) ou ausência (A-) da variante *-116A* da *BCHE* nos pacientes.

A concentração da ApoE foi maior nos pacientes em fase grave (CDR3), que naqueles em fase leve (CDR1). E dentro dos grupos, é possível observar a diferença entre presença ou ausência da ApoE4 (Figura 6). A concentração da ApoE, ainda no grupo de pacientes,

apresentou correlação negativa com o desempenho cognitivo no teste de rastreio do mini-exame do estado mental (MEEM) ($\rho = -0,286$; $p = 0,00$). O valor da escala do MEEM aumenta com o melhor desempenho no teste (0 a 30) (Figura 7).

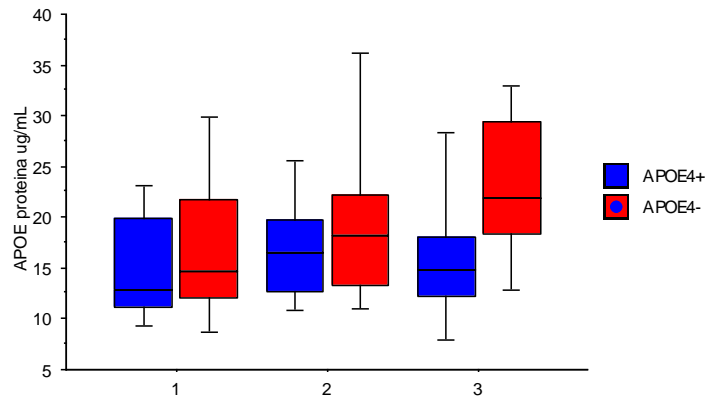


Figura 6. Concentração da proteína ApoE ($\mu\text{g/mL}$) com relação aos diferentes estágios da DA : leve (1 = CDR1), moderado (2 = CDR2) e grave (3 = CDR3) considerando a presença (APOE4+) ou ausência (APOE4-) da variante *APOE4*.

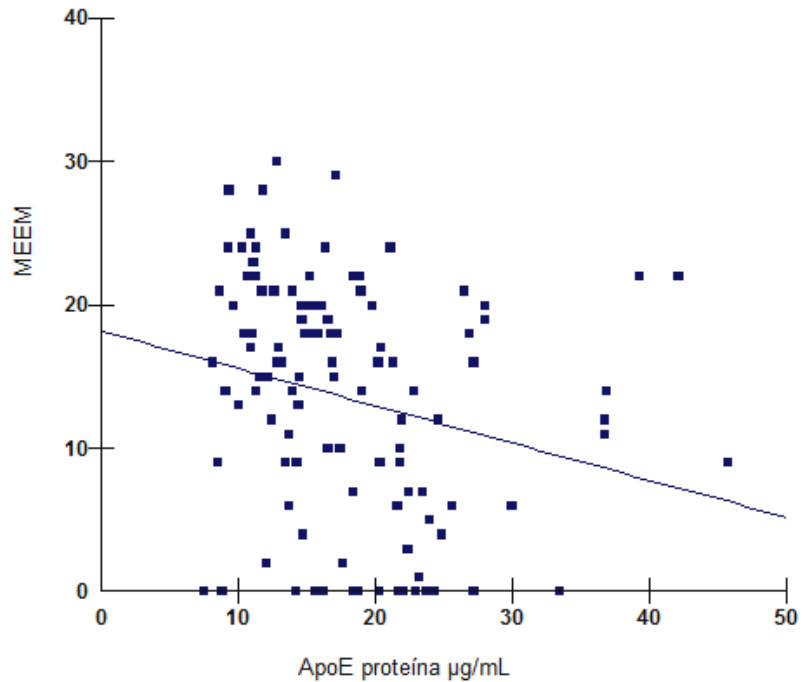


Figura 7. Correlação negativa entre a concentração da proteína ApoE e o desempenho cognitivo no mini-exame do estado mental (MEEM) nos pacientes com DA. $R = -0,321$; $p = 0,00$.

AChE e o perfil da BChE

A atividade da AChE, porém não a sua concentração, foi maior nos pacientes que nos idosos do grupo controle (Tabela 1) não havendo correlação entre a concentração da AChE e a sua atividade ($\rho = -0,00$; $p = 0,91$). Na análise de regressão múltipla, considerando a atividade da AChE como variável dependente e as demais variáveis mensuradas como independentes, atuaram de forma significativa sobre a atividade da AChE a atividade funcional da BChE ($\beta = 1,01 \pm 0,426$; $p = 0,00$) e a variante *1914G* da *BCHE* ($\beta = -1,28 \pm 0,561$; $p = 0,02$), ter ou não a doença de Alzheimer ($\beta = -3,18 \pm 0,80$; $p = 0,02$) e a variante *APOE4* ($\beta = 0,34 \pm 2,60$; $p = 0,01$). Houve um aumento na atividade da AChE em pacientes em uso de inibidor seletivo para a AChE, porém, não naqueles sob tratamento com rivastigmina (Tabela 5).

Considerando que a análise de regressão apontou as variantes *1914G* e *APOE4* como atuantes, de forma independente, sobre a atividade da AChE, comparamos a atividade nos grupos de pacientes conforme presença e ausência das variantes em questão. Foi avaliado apenas na DA devido à genotipagem para *1914G* ter sido realizada apenas para este grupo. Não houve diferença significativa na atividade da AChE entre os grupos quando considerados apenas as variantes *1914G* e *APOE4*, ou a ausência destas variantes. Porém, quando levada em conta a presença da *APOE4*, *1914G* e *K* (do gene *BCHE*), os pacientes $K^+ E4^+ G^+$ apresentaram maior atividade da AChE que pacientes $K^+ E4^+ G^-$ ($n = 28$) ($p = 0,03$). Ou seja, os pacientes que possuem a forma variante, seja em homozigose ou heterozigose de forma conjuga, *K*, *APOE4* e *1914G* tem atividade da AChE aumentada.

Tabela 5. Atividade e concentração média da AChE entre os pacientes em uso de inibidores para BChE e AChE (ChEI B+), apenas para AChE (ChEI B-) e sem uso de inibidor das colinesterases (sem ChEI).

	ChEI B+ (32)	ChEI B- (45)	Sem ChEI (33)	<i>p</i> *
	Mediana	Mediana	Médiana	
Atividade^a	3,53	5,43	3,92	0,000**
Proteína^b	12,92	5,83	5,76	>0,05

Notas:*Comparação entre as variantes não-paramétricas pelo teste de Kruskal-Wallis (conjunto de amostra) **com significância entre o uso de inibidores de ambas as colinesterases (ChEI B+) e o uso de inibidor apenas da AChE (ChEI B-), para o não uso de inibido não houve diferença significativa.^a unidade de medida: nmol/min/mL. ^b= µg/mL.

A correlação entre a atividade da BChE total e AChE total foi positiva na DA ($\rho = 0,35$; $p = 0,00$) e no grupo controle ($\rho = 0,53$; $p = 0,00$) (figura 8) e é possível identificar ainda na figura 8, um grupo de pacientes com atividade reduzida para AChE. O tipo de inibidor em uso para este grupo foi heterogêneo e a frequência das variantes genéticas no grupo não diferiu da esperada para nenhuma das variantes avaliadas neste estudo.

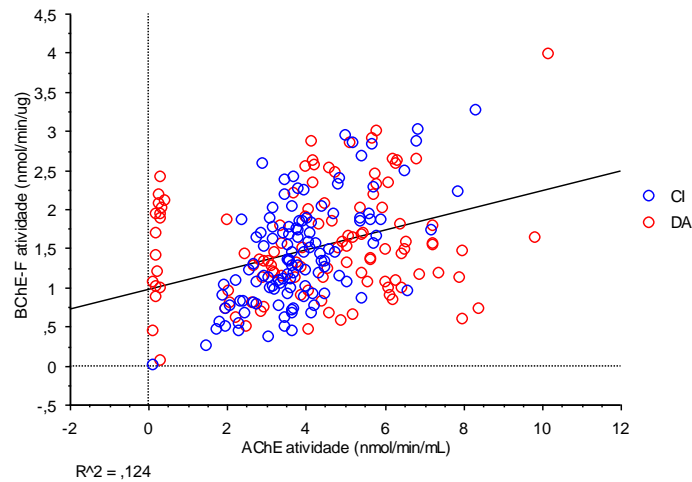


Figura 8. Correlação entre a atividade da BChE e AChE nos pacientes (DA) e controles (CI).

DISCUSSÃO

Para uma neurodegeneração complexa, como é a doença de Alzheimer, não se espera responder de forma simples a questão de associação de uma variante genética e sua função patológica. Considerando que esta demência crônica se manifesta na fase senil, se faz necessário considerar os mecanismos homeostáticos do organismo como um todo em relação às colinesterases, para poder elencar pontos que contribuam no entendimento da fisiopatologia da doença de Alzheimer. São inúmeros os trabalhos que avaliam a dinâmica da Butirilcolinesterase (BChE) e Acetilcolinesterase (AChE) a nível líquido e tecidual na DA (Berson et al., 2008; Darvesh, 2013), porém são escassos os trabalhos que avaliam a atividade e concentração destas enzimas no plasma.

A presente pesquisa, realizada ao nível plasmático, demonstrou que a atividade periférica das colinesterases está relacionada à DA de forma inversa aos níveis neurológicos (Darvesh, 2013), com redução na atividade da BChE e aumento da AChE, em relação ao grupo controle. Darreh-Shori *et. al.*, (2006) consideram que a atividade da BChE está

inversamente associada ao seu aprisionamento nos depósitos β -amilóides (A β) no parênquima cerebral (para os níveis líquóricos), devido a associação da BChE com a proteína ApoE.

Assim como nos estudos em líquido (Rapp *et al.*, 2006; Darreh-Shori *et al.*, 2011), o nível de concentração da ApoE, na presente amostra, está elevado nos pacientes DA de forma inversamente proporcional ao nível da atividade funcional da BChE. A ApoE parece exercer um duplo efeito sobre a BChE, reduzindo os níveis circulantes funcionais da enzima, mas também aumentando sua estabilidade funcional (Darreh-Shori *et al.*, 2009). Para o plasma foi possível observar que, assim como em líquido, no estudo de Darreh-Shori *et al.*, (2011), a proporção entre a forma proteica da BChE total e funcional diferem significativamente, estando a concentração total da proteína aumentada nos pacientes, ou seja, houve aumento na concentração proteica da BChE, porém, não de forma funcional, corroborando a hipótese de que a alteração na atividade da BChE podem decorrer da atenuação da proteína. Como os pacientes fazem uso de inibidores colinérgicos, esta inativação da BChE poderia ser decorrente do efeito da Rivastigmina (RVG). Porém, observou-se que não houve diferença entre as médias de atividade e concentração da BChE, entre os pacientes em uso da RVG com os não usuários desse medicamento no presente trabalho.

Pesquisadores sugerem que o aumento da estabilidade funcional da BChE na interação com a ApoE estaria associado a sua forma variante ApoE4 na ausência da variante K da BChE (Darreh-Shori *et al.*, 2009a, 2009b, 2011). Nossos dados não confirmam esta modulação da ApoE sob a atividade da BChE-K, mas a concentração da ApoE mostrou-se diminuída na ausência da variante -116A da *BCHE*. Esta variante está em desequilíbrio de ligação com a variante K (Bartelset *et al.*, 1990), o que não exclui que a variante K e ApoE possam estar em sinergia como proposto por Darreh-Shori *et al.*, (2012). Em nossa amostra, o efeito de associação entre a ausência da *BCHE* -116A e presença da *APOE4* significaram diminuição da concentração da ApoE (Figura 4b). A presença da variante -116A não modulou a atividade média da BChE, mas a diminuição da atividade funcional da BChE contribuiu com o aumento da concentração da ApoE. Um estudo de meta-análise (Wang *et al.*, 2014) sobre a concentração da ApoE em plasma reporta que os níveis de ApoE são muito sensíveis e diferem populacionalmente. Entre as características a serem consideradas nas análises populacionais estão as frequências genótípicas, e nossos resultados apontam a variante -116A como uma ds variáveis conferindo aumento na concentração da ApoE.

No presente trabalho, o aumento da concentração da ApoE foi associado a uma piora cognitiva semelhante ao encontrado por Fumihik e Yasumo *et al.*, (2011, apud Wang *et al.*, 2014), corroborando também com os dados de Daher-Shori *et al.*, (2011) pela diminuição do

desempenho no teste de rastreio (MEEM) (Figura 7). Além disso, houve aumento da concentração dessa enzima, de forma progressiva, com os estágios da demência. No estágio grave da doença (CDR3), a presença da forma variante ApoE4 representou diminuição da concentração da ApoE (Figura 6). Essa diminuição ao nível plasmático foi observada também em outros estudos (Gupta *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014). A variante *APOE4* consistiu um forte fator de risco para DA (Corder *et al.*, 1993), entretanto, a produção da ApoE ao nível periférico (fígado) e encefálico (astrócitos) são independentes (Boyles *et al.*, 1985; Pitas *et al.*, 1987). Ao nível plasmático, a redução da forma ApoE4 pode ser decorrente das suas características estruturais de formação de um “glóbulo fundido”, pois a forma ApoE4 é Arg112/Arg158 em comparação com ApoE2 (cys112/cys158) e ApoE3 (cys112/arg158) (Smit *et al.*, 1990). A formação deste “glóbulo” proporciona a interação entre a Arg-61 na porção N-terminal e Glu-255 no domínio carboxi-terminal da ApoE4 (Hatters *et al.*, 2006; Riddell *et al.*, 2008). Essa interação altera a afinidade da proteína aumentando a sua preferência por partículas lipoproteicas de menor densidade, o que culmina no aumento da remoção da ApoE4 e redução da reciclagem da molécula (Raffai *et al.*, 2001).

A *APOE4* está associada ao aumento nos níveis de hidrólise de acetilcolina no cérebro, possivelmente por uma interação da ApoE com as colinesterases. Na literatura, relata-se ainda a existência de uma complexa interação entre as colinesterases e a deposição do peptídeo β -amilóide, sendo essa interação influenciada pelo nível elevado da proteína ApoE (Hughes *et al.*, 2009; Darreh-Shori *et al.*, 2011; 2012). Uma das hipóteses para o mecanismo pelo qual os níveis de ApoE agem sobre a função colinérgica é a formação de um complexo molecular denominado BA β ACs (complexo BChE/AChE-A β -ApoE) (Darreh-Shori *et al.*, 2011a; 2011b; 2012). Este complexo teria uma modulação β -amilóide dependente, com taxa catalítica aumentada proporcional à concentração da A β . Os altos níveis de ApoE facilitariam a formação e acúmulo de BA β ACs, exercendo seu papel patológico na DA por facilitar o acúmulo anormal do complexo BA β AC, perturbando a sinalização colinérgica não neural (Darreh-Shori *et al.*, 2012a). Para Darreh-Shori *et al.* (2012b), o aumento dos níveis de ApoE ocorrem principalmente na presença da forma variante E4, que associada a BChE-K, conferem maior acúmulo do complexo BA β AC e maior risco para desenvolvimento da DA.

Contudo, a interação entre as variantes *BCHE-K* e *APOE4* como fator de risco para DA não é consenso na literatura. Alguns autores sugerem que *BCHE-K* em portadores da *APOE4* é um fator de proteção (Alvarez-Arcaya *et al.*, 2000), outros que *BCHE-K* e *APOE4* aumentam o risco para DA (Lehmann *et al.*, 2001), e alguns não encontram associação (Yamamoto *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000). Segundo Darreh-Shori *et al.*, (2012) a atividade da

BChE-K está diminuída somente na presença da ApoE4, e esta diminuição está associada ao risco para DA. Nossos resultados diferem, primeiro, pela não associação entre *K* e DA em duas amostras independentes (Simão-Silva *et al.*, 2013), e segundo por encontrar a atividade da BChE reduzida, independente da *APOE4*, porém de forma dependente da variante *1914G* do gene BChE, corroborando os resultados de Lima *et al.* (2013). A hipótese de que a *APOE4* module a variante *K* da BCHE ao nível fenotípico está baseada numa suposta interação entre as proteínas BChE-K e ApoE. Já para explicar a diminuição da atividade devido a *1914G*, é proposto uma possível alteração nos níveis de expressão do gene *BCHE* por interferência de microRNAs (miR-HSA), para qual a região 3'UTR da *BCHE*, onde se encontra a variante *1914G*, é alvo (Hanin e Soreq, 2011). A presença da variante *1914G* pode interferir na ligação da hsa-miR-498 e miR-HSA-662 alterando o nível de tradução do mRNA (Lima *et al.*, 2013). O desequilíbrio de ligação entre *1914G* e *K* pode justificar as associações encontradas por Darreh-Shoriet *al.*, (2012) que, em líquido, observou redução de 20% na expressão da BChE total em heterozigotos para *K*.

Considerando ainda a hipótese de diminuição na atividade da BChE-K pela sua interação com a proteína ApoE4 (Darreh-Shori *et al.*, 2012), seria esperado que, a proporção de proteína funcional *versus* total diferísse na presença dos alelos *APOE4* e *BCHE-K* no grupo controle, porém esta diferença não foi observada. Este dado pode ter sido decorrente da frequência diminuída do *APOE4* nos controles, porém o número amostral com a presença de *APOE4* e *BCHE-K* utilizado neste estudo é semelhante ao de Darreh-Shori *et al.*, (2012). Outro fator a se considerar, é que nossa amostra é proveniente de plasma e não de líquido. Porém, a dinâmica de correlação entre todas as outras variáveis avaliadas (aumento da atividade da AChE *versus* diminuição da BChE funcional, diferença na proporção entre a proteína BChE total e funcional, assim como aumento da concentração de ApoE inversamente proporcional à atividade da BChE funcional) foi a mesma entre as amostras de plasma no presente trabalho e nos níveis liquóricos no estudo de Darreh-Shori *et al.*, (2012).

Nossos resultados levam-nos a sugerir que a alteração nos níveis de expressão da proteína BChE total em sua forma variante *1914G*, atribuída em outros estudos apenas à variante *K* (Babaoglu *et al.*, 2004; Maetzler *et al.*, 2009; Darreh-Shori *et al.*, 2012) e, a diminuição da concentração da proteína BChE funcional são processos distintos. Observamos diminuição da atividade na presença de *1914G* e *K* nos dois grupos (CI e DA), já a diminuição da atividade funcional da BChE ocorreu apenas nos pacientes com DA, sendo esta apontada como consequência da própria demência, corroborando com os resultados de Bono (2014), para a mesma amostra, analisando a atividade e as formas moleculares da BChE.

Interessantemente, identificamos que o perfil da BChE foi influenciado pelas variantes do gene *MME*. Ambos os polimorfismos estudados foram associados a alterações nas concentrações protéicas e enzimáticas da BChE, sendo que o rs13086740 (T/G) foi associado, cerca de 20% de redução na atividade total e concentração protéica funcional da BChE e o alelo G a um decréscimo de 10% na atividade funcional da BChE-K. Combarros *et al.* (2009) propõe que a divergência na associação ou não da variante *K* com a DA poderia ser decorrente de variantes próximas ao gene *BCHE*. Neste trabalho, sugere-se que, dentre os múltiplos fatores que parecem atuar sobre a atividade da BChE, a variante *K* e a variante do rs13086740 (gene *MME*) estão associados a diminuição na atividade da BChE.

Já o SNP rs2016846 da *MME* foi associado, em homozigose para a forma usual, com aumento da atividade total e funcional da BChE, assim como com aumento da concentração proteica funcional. A homozigose (GG) ocorreu preferencialmente na ausência da variante *K* e *1914G* do gene *BCHE*. As mudanças no perfil da BChE relativas ao SNP rs2016846 foram observadas principalmente no grupo controle. A não constatação de alteração significativa na atividade e concentração da BChE no grupo de pacientes pode ser atribuída, primeiro ao desequilíbrio próprio da doença sobre a atividade da BChE, contudo, uma observação importante é que as distribuições genótípicas diferiram, neste grupo, entre os estágios da demência, com diminuição da frequência do alelo variante, em homozigose (TT), nos estágios moderado e grave (CDR2 e CDR3) da doença. Assim, a variante rs2016846, no presente trabalho, está associada à proteção contra a DA. Curiosamente, os pacientes CDR1 têm a mesma proporção da variante em estudo que o grupo controle. Esta constatação leva ao questionamento sobre as características clínicas e o diagnóstico destes pacientes no estágio leve da DA.

Buscando compreender a interação da BChE com a variante da *MME* (rs2016846), principalmente na DA, poderíamos considerar a atividade da BChE não apenas como hidrólise da colinas (como a Ach) (Taylor, 1994), mas também sua atuação na remoção dos agregados beta amilóide (Diamant *et al.*, 2006). Neste sentido, a redução de moléculas circulantes, como parece ocorrer no genótipo *BCHE 1914G*, não estaria representando apenas aumento na transmissão colinérgica, mas também aumento das formas neurotóxicas da A β . Porém, na ausência da variante *1914G* e *K*, que apresentaram associação negativa com a variante da *MME* (rs2016846), estaria ocorrendo um aumento da atividade da BChE por um possível efeito do genótipo GG, sem redução na síntese da proteína. Uma característica interessante do efeito desta variante foi modular a atividade total da BChE, o que não foi observado para as variantes do próprio gene *BCHE*. Como a mensuração da atividade total

ocorre no plasma total, antes das lavagens da placa, podemos propor uma interação em nível protéico para BChE e NEP (Neprilisina codificada pelo gene *MME*). O aumento da atividade nesta interação poderia contribuir a um mecanismo de déficit colinérgico, sendo a observação de uma tendência ao genótipo heterozigoto (50%) para o rs2016846, uma das formas de equilibrar a modulação da atividade da BChE entre as variantes *1914G* e *K* e a forma usual da *MME*.

Na doença de Alzheimer, os níveis de expressão de mRNA da *MME* estão significativamente reduzidos (Bai *et al.*, 2014). A redução da NEP, associada à redução da BChE funcional, poderia estar diretamente relacionada à diminuição da degradação de peptídeos extracitoplasmáticos como A β . Não encontramos nenhum estudo avaliando a interação proteica entre estas enzimas. Boger *et al.*, (2013) encontraram associação significativa para alterações em conjunto para o gene *BCHE* e *MME* em câncer de mama, associando este resultado à proximidade entre eles.

Outro fator atuante, possivelmente de forma recíproca, na atividade da BChE é a AChE. Nossos resultados de aumento da atividade periférica da AChE na DA também estiveram de acordo com os Darreh-Shori *et al.*, (2012), porém diferiram de seu estudo de (2006) em que a redução da AChE foi proporcional à redução da BChE. Os autores encontraram associação entre a presença da variante *K* e o aumento da atividade da AChE. Em nossos resultados pode ser observado um aumento na atividade da AChE com a presença dos alelos: *APOE4*, *BCHE-K* e *1914G*. Na ausência da variante *1914G* o aumento não foi significativo. Encontramos ainda correlação entre a diminuição da atividade da BChE e aumento da atividade da AChE, que se deu de forma mais acentuada no grupo controle, do que nos pacientes com doença de Alzheimer.

É relatado na literatura que, em altas concentrações de ACh, a AChE é substrato inibida e a BChE se torna mais eficiente na hidrólise das colinas (Silver, 1974). Em nível plasmático, o que observamos nos pacientes parece ser uma tentativa de retorno ao equilíbrio homeostático. Este retorno se daria por um aumento da atividade da AChE em decorrência da diminuição da atividade da BChE. Como a atividade da BChE em sua forma variante *1914G* esta reduzida, e na presença da *K* reduz ainda mais, o aumento na atividade da AChE pode estar associado a variante *1914G* como consequência deste processo de feedback. A redução da atividade da AChE na presença da variante *APOE4* indica que a complexidade de interação para modulação das colinesterases possivelmente ocorra em nível proteico, pois, diferentemente da BChE, a concentração proteica da AChE não esteve aumentado em relação ao grupo controle.

Ficou evidente a existência de um grupo de pacientes DA com atividade reduzida para AChE (Figura 8). Estes pacientes poderiam ser considerados, de forma teórica, bons respondedores para o inibidor colinérgico. Porém, das variantes avaliadas, nenhuma foi associada, isolada ou de forma combinada ao grupo. Uma investigação sobre a resposta clínica destes pacientes ao tratamento e evolução da DA poderia contribuir na investigação dos parâmetros que levam à formação deste grupo de pacientes.

A atividade da AChE foi diferente entre os grupos de pacientes submetidos a diferentes inibidores colinérgicos, com um curioso aumento para os pacientes em uso dos inibidores da AChE. Este fato pode decorrer de algum mecanismo de controle da atividade colinérgica, com compensação de atividade da AChE. Esta hipótese seria correspondente aos estudos clínicos que demonstram que a inibição da AChE e BChE (Rivastigmina-RVG) está correlacionada com melhor desempenho cognitivo em relação aos inibidores apenas da AChE, possivelmente pelo aumento dos níveis de ACh (Darreh-Shori *et al.*, 2002; Giacobini *et al.*, 2002). Outra possível causa seria a diferença entre as propriedades farmacológicas destes inibidores. A RVG é considerada um inibidor intermediário ou “pseudo-irreversível” tanto da AChE/BChE, inibindo diretamente a formação do complexo enzima-acetilcolina (Sano, 1999). Já os inibidores da AChE, a Galantamina e o Donepezil, são inibidores competitivos de curta duração que se ligam reversivelmente à AChE (Jann *et al.*, 2002) o que pode conferir atividade catalítica diferenciada aos grupos.

Neste trabalho, identificamos que:

- a) Ocorre uma diminuição na atividade da BChE nos pacientes com a doença de Alzheimer, porém esta diminuição parece ser decorrente do próprio curso da patologia.
- b) A variante *K* sozinha não foi suficiente para diminuição da atividade da BChE, mas sim em associação com a *1914G*, que pode atuar reduzindo a atividade com ou sem a *K*. Essas variantes estão em desequilíbrio de ligação, e possivelmente esse fato representa um dos fatores de controvérsia e não compreensão do papel desta variante na DA.
- c) A variante rs13086740 do gene *MME* também foi associada à diminuição da atividade da BChE, inclusive conferindo decréscimo na atividade da *K*, porém sem associação direta com a DA.
- d) A variante rs2016846 do gene *MME* foi associado a um efeito protetor contra a DA nos estágios moderado e grave da doença.

- e) Uma das proteínas sugeridas na literatura na modulação da BChE, principalmente na DA é a ApoE. O nosso estudo corrobora com a existência da sinergia entre ApoE e BChE, mas com atuação da atividade da butirilcolinesterase modulando a concentração da ApoE.
- f) A variante *APOE4*, como esperado, foi associada à presença da DA e, à diminuição da concentração da proteína ApoE.

Desta forma, é possível apontar algumas perspectivas: para a hipótese da formação do complexo BA β AC, o que sugerimos é uma investigação, em nível líquido ou anatomopatológico, para o efeito da atividade da BChE funcional sobre este complexo, considerando as variantes *-116A* (associada ao aumento da concentração da ApoE), *1914G* da *BCHE*, e a *APOE4* (associada a redução da concentração da ApoE). Considerar estas variáveis pode auxiliar na compreensão de alguns padrões de interação e regulação da dinâmica colinérgica. Consideramos, ainda, avaliar a direção da regulação AChE vs BChE o que poderá contribuir também com proposições farmacogenéticas de prescrição dos inibidores, pois nossos dados apontam para um mecanismo de compensação da atividade pela AChE, relativa à redução da BChE. Enfatizamos o potencial da variante rs2016846 do gene *MME*, que foi associada a um aumento da atividade da BChE. Avaliar a evolução clínica dos pacientes DA em relação a esta variante e sua interação com as variantes *1914G*, *K* e rs13086740 da *MME* (associadas à redução da atividade da BChE) e *-116A* (associada ao aumento da ApoE), poderá contribuir no esclarecimento da gama de fatores atuantes na atividade da BChE e seu papel na doença de Alzheimer. Por fim, a variante *K* do gene *BCHE* não deve ser avaliada de forma isolada, por identificação da presença ou ausência do alelo para compreensão de sua atuação na doença de Alzheimer. Assim como a *APOE4*, uma variante de forte associação com a DA, não é necessária nem suficiente para o desenvolvimento da demência, a *BCHE-K* depende de uma série de interações, possivelmente genéticas e ambientais, para contribuir como fator de risco ou proteção para o desenvolvimento da Doença de Alzheimer.

REFERÊNCIAS

- ALTAMIRANO C.V, BARTELS C.F, LOCKRIDGE O. The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild type enzyme, *J. Neurochem* 74, 869–877, 2000.
- ALVAREZ-ARCAYA, A., COMBARROS, O., LLORCA, J., SANCHEZ-GUERRA, M., BERCIANO, J., FERNAÁNDEZ-VIADERO, C., PENA, N. The butyrylcholinesterase K variant is a protective factor for sporadic Alzheimer's disease in women. *Acta Neurol. Scand.*, 102, 350-353, 2000.
- ARENDRT. T., BRÜCKNER, M.K, LANGE. M., VIGL, V. Changes in acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development – a study of molecular forms, *Neurochem. Int.* 21, 381– 396, 1992.
- ARUGA J, MIKOSHIBA K. Identification and characterization of Slitrk, a novel neuronal transmembrane protein family controlling neurite outgrowth. *Mol. Cell. Neurosci.*, v. 24, p. 117–129, 2003.
- ARUGA, J., YOKOTAB, N., MIKOSHIBA. K., Human SLITRK family genes: genomic organization and expression profiling in normal brain and brain tumor tissue. *Gene*, v. 315, p.87–94, 2003.
- BABA OGLU, M.O., OCAL, T., BAYAR, B., KAYAALP, S.O., BOZKURT, A Frequency and enzyme activity of the butyrylcholinesterase K-variant in a Turkish population. *Eur J ClinPharmacol* 59, 875-877, 2004.
- BAI, Z., STAMOVA, B., XU, H., ANDER, B.P., WANG, J., JICKLING, G.C., ZHAN, X., LIU, D., HAN, G., et al. Alzheimer Dis Assoc Disord. 2014 Apr 11. Distinctive RNA Expression Profiles in Blood Associated With Alzheimer Disease After Accounting for White Matter Hyperintensities.
- BARTELS, C.F., VAN DER SPEK, A.F., LA DU, B.N. Two polymorphisms in the non-coding 209 regions of the BCHE gene. *Nucleic Acids Res.* 18, 6171, 1990.
- BENYAMIN, B., et al., GWAS of butyrylcholinesterase activity identifies four novel loci, independent effects within BCHE and secondary associations with metabolic risk factors. *Hum. Mol. Genet.* 20, 4504–4514, 2011.
- BERSON, A., KNOBLOCH, M., HANAN, M., DIAMANT, S., SHARONI M, SCHUPPLI D, et al. Changes in readthrough acetylcholinesterase expression modulate amyloid- β pathology. *Brain* 131: 109-119, 2008.
- BOBERG, D. R., BATISTELA, M. S., PECHARKI, M. et al., Copy number variation in ACHE/EPHB4 (7q22) and in BCHE/MME (3q26) genes in sporadic breast cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 1, 344, 2013.

BONO, G.F., Investigação de Associação Entre A Butirilcolinesterase E A Doença De Alzheimer. Dissertação de mestrado em Genética. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

BOYLES J. K., PITAS R. E., WILSON E., MAHLEY R. W. AND TAYLOR J. M. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J. Clin. Invest.* 76, 1501–1513, 1985.

COMBARROS, O., RIANCHO, J.A., AROZAMENA, J., MATEO, I., LLORCA, J., INFANTE, J., SÁNCHEZ-JUAN, P., ZARRABEITIA, M.T., BERCIANO, J. Interaction between estrogen receptor-alpha and butyrylcholinesterase genes modulates Alzheimer's disease risk. *J. Neurol.*, 254, 1290-1292, 2007.

COMBARROS, O., CORTINA-BORJA, M., SMITH, A.D., LEHMANN, D.J. Epistasis in sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.*, 30 (9) 1333-49, 2009.

CORDER, E.H., SAUNDERS, A.M, STRITTMATTER, W.J, SCHMECHEL DE, GASKELL PC, et al.. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921–23, 1993.

COYLE, J.T. PRICE, D.L. DELONG, M.R. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation, *Science* 219 1184–1190, 1983.

DARREH-SHORI T, KADIR A, ALMKVIST O, GRUT M, WALL A, BLOMQUIST G, et al., (2008). Inhibition of acetylcholinesterase in CSF versus brain assessed by 11C-PMP PET in AD patients treated with galantamine. *Neurobiol Aging* 29, 168-184.

DARREH-SHORI T, MEURLING L, PETTERSSON T, HUGOSSON K, HELLSTROM-LINDAHL et al., (2006). Changes in the activity and protein levels of CSF acetylcholinesterases in relation to cognitive function of patients with mild Alzheimer's disease following chronic donepezil treatment. *J Neural Transm* 113, 1791-1801.

DARREH-SHORI T, MODIRI N, BLENNOW K, BAZA S, KAMIL C, AHMED H, et al. The apolipoprotein E epsilon4 allele plays pathological roles in AD through high protein expression and interaction with butyrylcholinesterase. *Neurobiol Aging*, 32:1236–48, 2011.

DARREH-SHORI T, MODIRI N, LAHAUT P, NORDBERG A. Apolipoprotein E and butyrylcholinesterase synergistically promote Ab peptides oligomerization. *Alzheimers Dement*;5:225, 2009.

DARREH-SHORI T, MODIRI N, NORDBERG A. ApoE and amyloid beta deflate the cholinergic neurotransmission by boosting the activity and stability of cholinesterases in the brain. *Alzheimer Dement*, 5:305, 2009.

DARREH-SHORI T, SIAWESH M, MOUSAVI M, ANDREASEN N, NORDBERG A. Apolipoprotein ϵ 4 modulates phenotype of butyrylcholinesterase in CSF of patients with Alzheimer's disease. *J of Alzheimer's Disease* 28, 443–458, 2012.

DARREH-SHORI, T.; ALMKVIST, O.; GUAN, Z.Z. et al. Sustained cholinesterase inhibition in AD patients receiving rivastigmine for 12 months. *Neurology*, v. 59, p. 563- 572, 2002.

DARVESH S., Butyrylcholinesterase radioligands to image Alzheimer's disease brain. *Chem Biol Interact.* 25;203(1), p.354-7, 2013

DARVESH, S. REID, G.A. MARTIN, E. Biochemical and histochemical comparison of cholinesterases in normal and Alzheimer brain tissues, *Curr. Alzheimer Res.* m v.7, p.386-400, 2010.

DARVESH, S., CASH, M.K., REID, G.A., et al., Butyrylcholinesterase is associated with β -amyloid plaques in the transgenic APPSWE/PSEN1dE9 mouse model of Alzheimer disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1 2–14, 2012.

DAVIES, P. MALONEY, A.J. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease, *Lancet* 2 (1976) 1403.

DIAMANT S, PODOLY E, FRIEDLER A, LIGUMSKY H, LIVNAH O, SOREQ H Butyrylcholinesterase attenuates amyloid fibril formation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8628-8633, 2006.

FOLSTEIN MF, FOLSTEIN SE, MCHUGH PR. "Mini-mental state": a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*;12:189-198. 1975

FURTADO-ALLE, L., ANDRADE, F. A., NUNES, K., MIKAMI, L. R., SOUZA, R. L.R., CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Association of variants of the –116 site of the butyrylcholinesterase BCHE gene to enzyme activity and body mass index. *Chemico-Biol. Interactions*, v.175 p.115–118, 2008.

GAHETE M.D.; CORDOBA-CHACON, J.; HERGUETA-REDONDO, M. MARTINEZ-FUENTES, A.J.; KINEMAN, R.D. MORENO-BUENO G., LUQUE,R.M.. CASTANO, J.P. A novel human ghrelin variant (In1-ghrelin) and ghrelin-O-acyltransferase are overexpressed in breast cancer: potential pathophysiological relevance, *PLoS One*. 6 e23302, 2011.

GIACOBINI, E.; SPIEGEL, R.; ENZ, A. et al. Inhibition of acetyl- and butyryl-cholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: correlation with cognitive benefit. *J. Neural Transm.*, v. 109, p. 1053-1065, 2002.

GUPTA, VB, LAWS SM, VILLEMAGNE VL, AMES D, BUSH AI, ELLIS KA, et al. Plasma apolipoprotein E and Alzheimer disease risk: the AIBL study of aging. *22;76(12):1091-8*, 2011

HANIN, G., SOREQ, H. Cholinesterase-targeting microRNAs identified in silico affect specific biological processes. *Front. Mol. Neurosci.* 4, 28, 2011.

HATTERS, D.M., PETERS-LIBEU, C.A., WEISGRABER, K.H. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 31, p.445-454, 2006.

JANN, M.W.; SHIRLEY, K.L.; SMALL, G.W. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cholinesterase Inhibitors. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 41, p. 719-739, 2002.

KIM, K.W., JHOO, J.H., LEE, J.H., LEE, K.U., LEE, D.Y., YOUN, J.C., YOUN, J.Y., WOO, J.I. Neither the butyrylcholinesterase K variant nor transferrin C2 variant confers a risk for Alzheimer's Disease in Koreans. *J. Neural. Transm.*, v.108, p.1159–1166, 2001.

LANE, R., FELDMAN, H.H., MEYER, J., HE, Y., FERRIS, S.H., NORDBERG, A., DARREH-SHORI, T., et al. Synergistic effect of apolipoprotein E epsilon4 and butyrylcholinesterase K-variant on progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Pharmacogenet. Genomics* 18, 289–298, 2008.

LAHIRI, D.K., NURNBERGER, JR., J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies, *Nucleic Acids Res.* 19, 5444, 1991.

LEHMANN, D.J., WILLIAMS, J., MCBROOM, J., SMITH, A.D. Using meta-analysis to explain the diversity of results in genetic studies of late-onset alzheimer's disease and to identify high-risk subgroups. *Neuroscience*, v. 108, p.541-554, 2001.

LIMA JK, LEITE N, TUREK LV, SOUZA RL, DA SILVA TIMOSSI L, OSIECKI AC, OSIECKI R, FURTADO-ALLE L. 1914G variant of BCHE gene associated with enzyme activity, obesity and triglyceride levels. *Gene*. Dec 10;532(1):24-6, 201, 2013.

MAETZLER W, KELLER S, MICHELIS J, KOEHLER N, STRANSKY E, BECKER C, SCHULTE C, MELMS A, GASSER T, BERG, D. No differences of butyrylcholinesterase protein activity and allele frequency in Lewy body diseases. *Neurobiol Dis* 35, 296-301, 2009.

MAYEUX, R.; SANO, M. Treatment of Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 341, p. 1670-1679, 1999.

MCKHANN, G.M., KNOPMAN, D.S., CHERTKOW, H., HYMAN, B.T., JACK, C.R., KAWAS, C.H., et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 7, (3): 263–269, 2011.

MORRIS JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology*; 43:2412-2414, 1993.

PÉREZ-GRACIA, E., TORREJÓN-ESCRIBANO, B., FERRER, I. Dystrophic neurites of senile plaques in Alzheimer's disease are deficient in cytochrome c oxidase. *Acta Neuropathol.*, v.116, p.261-268, 2008.

PERRY E.K, TOMLINSON B.E, BLESSED G, BERGMANN K, GIBSON P.H, et al., Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br Med J* 2, 1457-1459, 1978.

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

PITAS, R.E., BOYLES, J.K., LEE, S.H., FOSS, D., MAHLEY, R.W. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta.* 1, p.148-61, 1987.

PODOLY E, SHALEV DE, SHENHAR-TSARFATY S, BENNETT ER, BEN ASSAYAG ET AL., The butyrylcholinesterase K variant confers structurally derived risks for Alzheimer pathology. *J Biol Chem* 284, 17170-17179, 2009.

R Development Core Team (2008) R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

RAFFAÏ, R.L., DONG, L-M., FARESE, R.V. JR., WEISGRABER, K.H. Introduction of human apolipoprotein E4 “domain interaction” into mouse apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 98, p.11587–11591, 2001.

RAPP, A., GMEINER, B., HUTTINGER, M. Implication of apoE isoforms in cholesterol metabolism by primary rat hippocampal neurons and astrocytes. *Biochimie* 88:473–83, 2006.

RAYGANI, A.V., ZAHRAI, M., SOLTANZADEH, A., DOOSTI, M., JAVADI, E., POURMOTABBED, T. Analysis of association between Butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E genotypes in Alzheimer's Disease. *Neurosc. Lett.*, v.371, p.142–146, 2004.

RIDDELL, D. R., ZHOU, H., ATCHISON, K., WARWICK, H. K., ATKINSON, P.J., JEFFERSON, J., XU, L., ASCHMIES, S., KIRKSEY, Y., HU, Y. et al. Impact of Apolipoprotein E (ApoE) Polymorphism on Brain ApoE Levels. *The Journal of Neurosc.*, v. 28(45), p. 11445-11453, 2008.

RUSSO, R., BORGHI, R., MARKESBERY, W., TABATON, M., PICCINI, A. Nephylisin (sic) decreases uniformly in Alzheimer's disease and in normal aging. *FEBS Lett.* 579: 6027-6030, 2005.

SANO, M., ERNESTO, C., THOMAS, R.G. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer Disease Cooperative Study. *N Engl J Med.*, 336, p.1216-1222, 1997.

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

SIMÃO-SILVA D. P, BERTOLUCCI P.H.F, LABIO R.W, PAYÃO S.L.M, ALLE-FURTADO L, SOUZA R.L.R. Association analysis between K and -116A variants of butyrylcholinesterase and Alzheimer's Disease in a Brazilian population. *Chemico-Biological Interactions*. 203, 358–360, 2013.

SMIT, M., DE KNIJFF, P., FRANTS, R. R., KLASSEN, E. C., HAVEKES, L. M. Familial dysbetalipoproteinemic subjects with the E3/E2 phenotype exhibit an E2 isoform with only one cysteine residue. *Clin. Genet*. 32: 335-341, 1987.

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

TAYLOR P, BROWN JH. Nicotinic receptors. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, editors. *Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects* (Philadelphia): Raven Press; p. 248-54, 1994.

TILLEY, L., MORGAN, K., GRAINGER, J., MARSTERS, P., MORGAN, L., LOWE, J., XUEREB, J., WISCHIK, C., HARRINGTON, C., KALSHEKER, N. Evaluation of polymorphisms in the presenilin-1 gene and the butyrylcholinesterase gene as risk factors in sporadic Alzheimer's disease. *Eur. J. Hum. Genet.*, v.7, p.659–663, 1999.

WANG, C., YU, J.T., WANG, H.F., JIANG, T, TAN C. C, MENG, X. F, SOARES HD. Meta-analysis of peripheral blood apolipoprotein E levels in Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2014.

YAMAMOTO Y, YASUDA M, MORI E, MAEDA K. Failure to confirm a synergistic effect between the K-variant of the butyrylcholinesterase gene and the epsilon4 allele of the apolipoprotein gene in Japanese patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67, 94-96, 1999.

5. DISCUSSÃO GERAL

Das variantes genéticas avaliadas, não encontramos associação entre DA e o polimorfismo *L72M* de *GHRL* (Capítulo 1), *-116A* e *K* da *BCHE* (Capítulo 2) avaliados para duas amostras independentes, sendo uma proveniente do Estado de São Paulo e outra do Paraná. Para a amostra do Paraná, foram avaliadas ainda as variantes *1914G* da *BCHE* nos pacientes com a Doença de Alzheimer, e os polimorfismos rs2016846 e rs13086740 do gene *MME*, os SNPs rs3828419 e rs17449213 do gene *SLITRK3* e a variante *APOE4*. Destes, o único que apresentou associação com a DA foi o alelo *APOE4*. Este alelo é significativamente associado a doença de Alzheimer (Corder *et al.*, 1993; Roses, 1996) e cerca de 40-65% dos pacientes DA tem pelo menos uma cópia do *APOEε4* (Huang, 2006).

Uma das questões levantadas no presente trabalho foi a associação da variante butirilcolinesterase *K* com DA, considerando a controvérsia na literatura sobre a existência de associação entre essa variante e a doença. Inicialmente, com base nos dados de Furtado-Alle *et al.*, (2008) avaliamos a presença do polimorfismo *-116A*, considerando que esta variante estaria associada a diminuição da atividade da BChE, geralmente atribuída à *K*. Porém, nossos resultados não apontaram associação entre DA e as variantes *K* e *-116A*, apesar de observarmos uma tendência neste sentido (Simão-Silva *et al.*, 2013). Com o aumento da amostra, a associação entre estas duas variantes não foi confirmada (Capítulo 3).

Em 2013, Lima *et al.*, verificaram que a variante *1914G* representou significativa redução na atividade da BChE, estando essa variante em desequilíbrio de ligação com a *K* e *-116A*. Investigamos a frequência desta variante apenas nos pacientes, e ela foi associada à redução da atividade da BChE, de forma independente da *K*.

Além de avaliar os genótipos para este gene, analisamos as concentrações e atividade da BChE e a relação entre estas variantes e as alterações no perfil da BChE, AChE e ApoE. Por meio destes dados, demonstrou-se que a diminuição da atividade da BChE plasmática na Doença de Alzheimer é resultado da própria patologia.

Um resultado interessante foi que as variantes do gene *MME* foram associadas a alterações da atividade da BChE. Apesar de uma atuar aumentando (rs2016846) a atividade e outra, diminuindo (rs13086740), ambas denotaram alterações tanto ao nível funcional quanto total da BChE, o que não ocorreu ao comparar as variantes da *BCHE* e a atividade proteica. Essa constatação requer uma ampliação das análises destas variantes e a DA, principalmente a rs2016846, que apresentou diferença na frequência genotípica entre os estágios da demência.

Para a avaliação proteica, a BChE, AChE e ApoE diferiram em padrão de concentração e atividade entre o grupo de pacientes e controle, e assim como relatado na literatura, parecem interagir de forma complexa (Hugles *et al.*, 2001; Darreh-Shori *et al.*, 2011; 2012). Nossos resultados permitem a identificação de um padrão de atividade e concentração destas proteínas para DA no plasma. Isso contribui com o entendimento da dinâmica das colinesterases no organismo como um todo, pois além dos inibidores colinérgicos atuarem também ao nível plasmático, resultando inclusive em efeitos colaterais para os pacientes, a homeostase do organismo deve ser compreendida de forma global.

6. CONCLUSÕES

- a) As variantes: *L72M* do gene *GHRL*, SNPs rs3828419 e rs17449213 do gene *SLITRK3* não foram associadas à doença de Alzheimer, o que não exclui a possibilidade de associação de outras variantes destes genes com a doença de Alzheimer.
- b) A atividade da BChE é diminuída na doença de Alzheimer, com aumento de sua concentração protéica. Essa redução parece ser decorrente do próprio curso da patologia.
- d) A variante *K* sozinha não foi suficiente para diminuição da atividade da BChE, mas sim em associação com a *1914G*, que pode atuar reduzindo a atividade com ou sem a *K*. Essas variantes estão em desequilíbrio de ligação, e possivelmente esse fato representa um dos fatores de controvérsia e não compreensão do papel desta variante na DA.
- e) A variante rs13086740 do gene *MME* também foi associada à diminuição da atividade da BChE, inclusive conferindo decréscimo na atividade da *K*, porém sem associação direta com a DA.
- f) O SNP rs2016846 (*MME*), na forma usual foi associada ao aumento da atividade da BChE e sua distribuição genotípica diferiu entre o estágio leve (CDR1) e os estágios moderado e grave da demência (CDR2 e CDR3), atuando a forma variante, em homizigose, como fator protetivo contra DA.
- g) A concentração da proteína ApoE é aumentada nos pacientes DA e este aumento foi inversamente proporcional a atividade funcional da BChE. O aumento da concentração da ApoE foi correlacionado com aumento de déficit cognitivo.
- h) Nossos resultados foram condizentes com um processo sinérgico entre ApoE e BChE, com atuação da atividade da butirilcolinesterase sob a concentração da ApoE, principalmente na presença da variante *-116A* da BChE.
- i) A variante *APOE4*, como esperado, foi associada à presença da DA e, representou diminuição da concentração da proteína ApoE.

7. REFERÊNCIAS

AARSLAND, D., BALLARD, C., WALKER, Z., BOSTROM, F., ALVES, G., KOSSAKOWSKI, K., LEROI, I., POZO-RODRIGUEZ, F., MINTHON, L. Memantine in patients with Parkinson's disease dementia or dementia with lewy-bodies: a double-blind, placebo-controlled, multicentre trial., v.8, n.7, 618, p.613-2009.

ABELSON, J.F., KWAN, K.Y., O'ROAK, B.J., BAEK, D.Y., STILLMAN, A.A., MORGAN, T.M., MATHEWS, C.A., PAULS, D.L., RASIN, M.R., GUNEL, M., et al. Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette's syndrome. *Science*, v.310, p.317-320, 2005.

AETSINGER, L.S.; CARTER-SU, C.; Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physio. Rev.*, Baltimore, v. 76, p. 1089-1107, 1996.

ALCÂNTARA, V.M. Fenótipos da butirilcolinesterase e suas relações com dados antropométricos, bioquímico-hormonais e pressão arterial em obesos e na população geral de Curitiba, PR. Curitiba, 2000. 230f. Tese de Doutorado em Genética. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ALCÂNTARA, V.M., CIPRIANI, T.R., REA, R., SUPLICY, H., CHAUTARDFREIRE-MAIA, E.A. Formas moleculares da butirilcolinesterase (BChE) e índice de massa corporal (IMC). *Genet. Mol. Biol.*, Ribeirão Preto, v. 22, p. 213, 1999.

ALLES, G.A., HAWES, R.C. Cholinesterases in the blood of man. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 133, p.375-390, 1940.

ALMEIDA, O. P., SHIMOKOMAKI, C. M. Apolipoprotein E4 and Alzheimer's disease in São Paulo - Brazil. *Arq. Neuro-Psiquiatr.*, v. 55, n. 1, 1997 .

ALTAMIRANO, C. V., BARTELS, C. F., LOCKRIDGE, O. The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild ntype enzyme. *J. Neurochem.*, v. 74, p. 869-877, 2000.

ALTAMIRANO, C.V., LOCKRIDGE, O. Association of tetramers of human butyrylcholinesterase is mediated by conserved aromatic residues of the carboxy terminus. *Chem. Biol. Interact.*, 119–120, 53–60, 1999.

ALVAREZ-ARCAYA, A., COMBARROS, O., LLORCA, J., SÁNCHEZ-GUERRA, M., BERCIANO, J., FERNÁNDEZ-VIADERO, C., PENA, N. The butyrylcholinesterase K variant is a protective factor for sporadic Alzheimer's disease in women. *Acta Neurol. Scand.* v.102, p.350–353, 2000.

Alzheimer's Disease International Consortium (2011) AD International, World Alzheimer Report. Alzheimer's disease International, London. Available at <http://www.alz.co.uk/>.

Alzheimer's Disease International. National Alzheimer and Dementia Plans Planned Policies and Activities. [Online] April 2012. <http://www.alz.co.uk/sites/default/files/national-alzheimer-and-dementia-plans.pdf>.

Alzheimer's Society (2007) Dementia UK. Alzheimer's Society. London.

ANDREASEN, N., MINTHON, L., DAVIDSSON, P., VANMECHELEN, E., VANDERSTICHELE, H., WINBLAD, B., BLENNOW, K. Evaluation of CSF-tau and CSF-Abeta42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice. *Arch Neurol.* n.58 p.373–379, 2001.

ANTOPOL, W., TUCHMAN, L., SCHIFRIN, A. Cholinesterase activity of human sera with special reference to hyperthyroidism. *Proc. Soc. Exp.Biol. Med.*, v. 36, p. 4650, 1937.

ARAÚJO, R. S.; PONDÉ, M. P. Eficácia da memantina na Doença de Alzheimer em seus estágios moderado a grave. *Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP). J Bras Psiquiatr*, v. 55, n. 2, p. 148-153, 2006

ARENDRT, 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.*, v.21, p.381–396, 1992.

ARNOLD SE, HYMAN BT, FLORY J, DAMASIO AR, VAN HOESEN GW. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex*, v. 1, p. 103–116, 1991.

ARPAGAUS, M., KOTT, M., VATSIS, K.P., BARTELS, C.F., LA DU BN, LOCKRIDGE, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry*, n.29, v.1, n.124-131, 1990.

ARUGA J, MIKOSHIBA K. Identification and characterization of Slitrk, a novel neuronal transmembrane protein family controlling neurite outgrowth. *Mol. Cell. Neurosci.*, v. 24, p. 117–129, 2003.

ARUGA, J., YOKOTAB, N., MIKOSHIBA. K., Human SLITRK family genes: genomic organization and expression profiling in normal brain and brain tumor tissue. *Gene*, v. 315, p.87–94, 2003.

BALLARD, C., MORRIS, C., KALARIA, R., MCKEITH, I., PERRY, R., PERRY, E. The K variant of the butyrylcholinesterase gene is associated with reduced phosphorylation of tau in dementia patients. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, v.19, p.357-360, 2005.

BAGYINSZKY, E., YOUN Y. C., AN, S. S., KIN, S.Y. The genetics of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging*, n.1, v.9, p.535-351, 2014.

BANG, O.Y., KWAK, Y.T, JOO, I.S., HUH, K. Important link between dementia subtype and apolipoprotein E: a meta-analysis. *Yonsei Med J.*, n.44, v.3, p.401-413, 2013

BARTELS, C.F., JENSEN, F.S., LOCKRIDGE, O., VAN DER SPEK, A.F.L., RUBINSTEIN, H.M., LUBRANO, T., LA DU, B.N. 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.*, Chicago, v. 50, p. 1086-10103, 1992.

BELBIN, O., CARRASQUILLO, M.M., CRUMP, M., et al. Investigation of 15 of the top candidate genes for late-onset Alzheimer's disease. *Hum Genet*, 2010.

BERSON, A., SOREQ, H. It All Starts at the Ends: Multifaceted Involvement of C- and N-Terminally Modified Cholinesterases in Alzheimer's Disease, *RMMJ*, v. 1(2), e. 0014, 2010.

BERTRAM, L, LILL CM, TANZI RE. The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron.*, 68:270–281, 2010.

BERTRAM L, BLACKER D, MULLIN K, KEENEY D, JONES J, BASU S, YHU S, et al. Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science*, n.290, p.2302–3, 2000.

BERTRAM, L., MCQUEEN, M. B., MULLIN, K., BLACKER, D., AND TANZI, R. E. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat. Genet.*, v. 39, p.17-23, 2007.

BERTRAM, L., TANZI, R.E. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: The implications of systematic meta-analyses. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 768–778, 2008.

BETTENS, K., SLEEGERS, K., VAN BROECKHOVEN, C. Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Hum. Mol. Genet.*, v.15, 19(R1), p. R4-R11, 2010.

BIFFI, A., ANDERSON, C.D., DESIKAN, R.S., et al. Genetic variation and neuroimaging measures in Alzheimer disease. *Arch Neurol.*, n.67, p.677–685, 2010.

BIRKS J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. [Cochrane review]. In: *The Cochrane Library*, Issue 1, 2006 [online].

BIRKS, J., GRIMLE, Y., EVANS, J., IAKOVIDOU, V., TSOLAKI, M. Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n.4. CD001191, 2000.

BIZZARRO, A., GUGLIELMI, V., LOMASTRO, R., VALENZA, A., LAURIA, A., MARRA, C., SILVERI, M. C., TIZIANO, F. D., BRAHE, C., MASULLO, C. BuChE K variant is decreased in Alzheimer's disease not in fronto-temporal dementia. *J. Neural Transm.*, v.117, p.377-383, 2010.

BLAND, N. D., PINNEY, J.W., THOMAS, J. E., TURNER, A. J., ISAAC. R. E. Bioinformatic analysis of the neprilysin (M13) family of peptidases reveals complex evolutionary and functional relationships. *BMC Evolutionary Biology*, 8:16, 2008.

BLONG, R. M., BEDOWS, E., LOCKRIDGE, O. Tetramerization domain of human butyrylcholinesterase is at the C-terminus. *Biochem. J.*, v.327, p.747-757, 1997.

BOCHE, D., NICOLL, J. A. R. Are we getting to grips with Alzheimer's disease at last? *Brain*, v. 133(5), p. 1297-1299, 2010.

BON, S., AYON, A., LEROY, J., MASSOULIÉ, J. Trimerization domain of the collagen tail of acetylcholinesterase. *Neurochem. Res.*, v.28, p.523–535, 2003.

BOYLES J. K., PITAS R. E., WILSON E., MAHLEY R. W. AND TAYLOR J. M. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J. Clin. Invest.* 76, 1501–1513, 1985.

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

BRAAK, H., BRAAK, E. & BOHL, J. Staging of Alzheimer-related cortical destruction. *European neurology* v.33, n.6, p.403-408, 1993.

BRADSHAW, E. M., CHIBNIK, L. B. KEENAN, B. T. OTTOBONI, L. RAJ, T. TANG, A. ROSENKRANTZ, L. L. ET AL. 2013. CD33 Alzheimer's disease locus: Altered monocyte function and amyloid biology. *Nature neuroscience*, 16 (7).

BRENNWALD, P., ROSSI, G. Spatial regulation of exocytosis and cell polarity: yeast as a model for animal cells. *FEBS Lett.*, v.581(11), p.2119-24, 2007.

BROSE, K., TESSIER-LAVIGNE, M., Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v.10, p.95-102, 2000.

BU, G., MAKSYMIVITCH, E. A., GEUZE, H., SCHWARTZ, A. L. Subcellular localization and endocytic function of low density lipoprotein receptor-related protein in human glioblastoma cells. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 29874–29882, 1994.

BULLIDO, M. J., ARTIGA, M. J., RECUERO, M., SASTRE, I., GARCIA, M. A., ALDUDO, J., LENDON C., HAN, S. W., MORRIS, J. C., FRANK, A., et al. A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat. Genet.*, v.18, p.69-71, 1998.

CAÇÃO, J. DE C., SOUZA, D.R.S., TOGNOLA, W. A., GODOY, M.R.P.DE, PINHEL, M.A. DE S. Polimorfismo da apolipoproteína e nos familiares em primeiro grau de pacientes com doença de Alzheimer familiar ou esporádica. *Arq. Neuro-Psiquiatr.*, v. 65(2A), p.295-298, 2007.

CAMPION, D., DUMANCHIN, C., HANNEQUIN, D., DUBOIS, B., BELLIARD, S., PUEL, M., et al. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet.*, n.65, p.664–670, 1999.

CARAMELLI, P.; BARBOSA, M.T. Como diagnosticar as quatro causas mais frequentes de demência? *Rev. Bras. Psiquiatr.*, v. 24, p. 7-10, 2002.

CASADEI, V. M., FERRI, C., VEGLIA, F., GAVAZZI, A., SALANI, G., CATTANEO, M., SORBI, S., ANNONI, G., LICASTRO, F., MARIANI, C., et al. APOE491 promoter polymorphism is a risk factor for late-onset Alzheimer's disease. *Neurology*, v.53, p.1888-1889, 1999.

CASEY, D. A., ANTIMISIARIS, D., O'BRIEN, J. Drugs for Alzheimer's Disease: Are They Effective? *PeT*, v.35 n.42010, 2010.

CERBAI, F., GIOVANNINI, M.G., MELANI, C., ENZ, A., PEPEU, G. N1phenethyl-norcymserine, a selective butyrylcholinesterase inhibitor, increases acetylcholine release in rat cerebral cortex: a comparison with donepezil and rivastigmine. *Eur J Pharmacol*, n.572, v.2-3, p.142-150, 2007.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A., PRIMO-PARMO, S.L., PICHETH, G., LOURENÇO, M.A.C., VIEIRA, M.M. The C5 isozyme of serum cholinesterase and adult weight. *Hum. Hered.*, New York, v. 41, p. 330-339, 1991.

CHITLARU, T., KRONMAN, C., VELAN, B. AND SHAFFERMAN, A. Effect of human acetylcholinesterase subunit assembly on its circulatory residence. *Biochem. J.*, v. 354, p. 13–625, 2001.

CHOLLET, C., MEYER K, BECK-SICKINGER AG. Ghrelin--a novel generation of anti-obesity drug: design, pharmacomodulation and biological activity of ghrelin analogues. *J Pept Sci.*, 15(11), p.711-30, 2009.

CITRON, M. Beta-secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease—promise and challenge. *Trends Pharmacol Sci.*, v. 25, p. 92–97, 2004.

CLARIMON, J., MUNOZ, F.J., BOADA, M., TARRAGA, L., SUNYER, J., BERTRANPETIT, J., COMAS, D. Possible increased risk for Alzheimer's disease associated with neprilysin gene. *J. Neural. Transm.*, v.110(6), p. 651-657, 2003.

CLEVELAND DW, HOFFMAN PN. Neuronal and glial cytoskeletons. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v.1, p.346-353, 1991.

COYLE, J. R.; PRICE, D. L.; DELONG, M.R.; Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervations. *Science* 219:1184–1190, 1983.

COMBARROS, O., RIANCHO, J.A., AROZAMENA, J., MATEO, I., LLORCA, J., INFANTE, J., SÁNCHEZ-JUAN, P., ZARRABEITIA, M.T., BERCIANO, J. Interaction between estrogen receptor-alpha and butyrylcholinesterase genes modulates Alzheimer's disease risk. *J. Neurol.*, v.254, p.1290-1292, 2007.

COON, K.D., MYERS, A.J., CRAIG, D.W., WEBSTER, J.A., PEARSON, J.V., LINCE, D.H., ZISMANN, V.L., BEACH, T.G., LEUNG, D., BRYDEN, L. et al. A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *J. Clin. Psychiatry*, 68, 613–618, 2007.

COOPER, J.A., ESCH, F.S., TAYLOR, S.S., HUNTER, T. Phosphorylation sites in enolase and lactate dehydrogenase utilized by tyrosine protein kinases in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.*, v.259, p.7835– 7841, 1984.

CORDER EH, SAUNDERS AM, STRITTMATTER WJ, SCHMECHEL DE, GASKELL PC, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, v.261, p.921–923, 1993.

COWBURN, R. F., FOWLER, C. J., O'NEIL, C. Neurotransmitters, signal transduction and second-messengers in Alzheimer's disease. *Acta. Neurol. Scand.*, v. 165, p. 25-32, 1996.

CRAWFORD, F., FALLIN, D., SUO, Z., ABDULLAH, L., GOLD, M., GAUNTLETT, A., DUARA, R., MULLAN, M. The butyrylcholinesterase gene is neither independently nor synergistically associated with late-onset AD in clinic- and communitybased populations. *Neurosci. Lett.*, v.249, p.115-118, 1998.

CRUTS, M., VAN BROECKHOVEN, C. Presenilin mutations in Alzheimer's disease. *Hum. Mutat.*, v. 11, p.183-190, 1998.

CUCUIANU, M., POPESCU, T. A., HARAGUS, S.T. Pseudocholinesterase in obese and hyperlipemic subjects. *Clin. Chim. Acta*, v. 22, p. 151-155, 1968.

CUCUIANU, M., POPESCU, T.A., OPINCARU, A., HARAGUS, S. Serum pseudocholinesterase and ceruloplasmin in various types of hyperlipoproteinemia. *Clin.Chem.Acta*, v.22, p.19-27, 1975.

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

D'ADAMIO, L., SHIPP, M.A., MASTELLER, E.L., REINHERZ, E.L. Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple miniexons and separate 5' untranslated regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.86, p.7103-7107, 1989.

DANYSZ, W., PARSONS, C.G, MOBIUS, H,J, et al. Neuroprotective and Symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease a unified hypothesis on the mechanism of action. *Neurotoxicity Res.* v.2, p.85-97, 2000.

DANTAS, V. G. FURTADO-ALLE, L. SOUZA, R.L., CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Obesity and variants of the GHRL (ghrelin) and BCHE (butyrylcholinesterase) genes, *Genet Mol Biol.* 34, p. 205-207, 2011.

DARREH-SHORI, T., MODIRI, N., BLENNOW, K., BAZA, S., KAMIL, C., AHMED, H., ANDREASEN, N., NORDBERG, A. The apolipoprotein E varepsilon4 allele plays pathological roles in AD through high protein expression and interaction with butyrylcholinesterase. *Neurobiol. Aging.* (epub ahead of print), 2009.

DARREH-SHORI, T., SIAWESH, M., MOUSAVI, M., ANDREASEN, N., NORDBERG, A. Apolipoprotein ϵ 4 modulates phenotype of butyrylcholinesterase in CSF of patients with Alzheimer's disease. *J of Alzheimer's Disease* v.28, p.443-458, 2012.

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

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

DAS, H. K., MCPHERSON, J., BRUNS, G. A., KARATHANASIS, S. K., BRESLOW, J. L. Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. *J. Biol. Chem.*, v. 260, p.6240–6247, 1985.

DAVIS, K. L.; THAL, L. J.; GAMZU, E. R.; DAVIS, C. S.; WOOLSON, R. F.; GRACON, S. I.; DRACHMAN, D. A, et al. A double-blind, placebo-controlled multicenter study of tacrine for Alzheimer's disease. The Tacrine Collaborative Study Group, *N Engl J Med* 327:1253–1259, 1992.

DE FELICE, F.G., VIEIRA, M.N., SARAIVA, L.M., GARCIA-ABREU, J., CHANG, L., LIU, R., FIGUEROA-VILLAR, J.D., KLEIN, W.L., FERREIRA, S.T. Targeting the neurotoxic species in Alzheimer's disease: Inhibitors of A β oligomerization. *FASEB J.*, v.18, p.1366-1372, 2004.

DE FELICE, F. G., VIEIRAB, M. N. N., BOMFIMB, T. R., DECKERB, H., VELASCOA, P.T., LAMBERTA, M.P., VIOLAA, K.L., ZHAOA, W-Q., FERREIRAB S.T., KLEIN, W.L. Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of A β oligomers. *PNAS*, v. 106, n. 6, p.1971-1976, 2009.

DE VRIESE, C., GREGOIRE, F., LEMA-KISOKA, R., WAELBROECK, M., ROBBERECHT, P., DELPORTE, C. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. *Endocrinology*, v. 145, p. 4997-5005, 2004.

DÉNIZ-NARANJO, M.C., MUNOZ-FERNANDEZ, C., ALEMANY-RODRÍGUEZ, M.J., DEL CARMEN, PÉREZ-VIEITEZ, M., ALADRO-BENITO, Y., IRURITA-LATASA, J., SÁNCHEZ-GARCÍA, F. Butyrylcholinesterase. ApoE and Alzheimer's disease in a population from the Canary Islands (Spain). *Neurosci. Lett.*, v.427, p.34-38, 2007.

DICKSON, D.W., FARLO, J., DAVIES, P., CRYSTAL, H, FULD, P., YEN, S.H. Alzheimer's disease. A double-labeling immunohistochemical study of senile plaques. *Am. J. Pathol.*, v.132, p.86-101, 1988.

DOMINGUEZ, D., TOURNOY, J., HARTMANN, D., HUTH, T., CRYNS, K., DEFORCE, S., SERNEELS, L., CAMACHO, I.E., MARJAUX, E., CRAESSAERTS, K., et al. Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *J. Biol. Chem.*, v.280, p.30797-30806, 2005.

EPELBAUM, J., GUILLOU, J.L., GASTAMBIDE, F., HOYER, D., DURON, E., VIOLLET C Somatostatin, Alzheimer's disease and cognition: An old story coming of age? *Prog Neurobiol*, n.89, p.153-161, 2009.

EWERS, M., BUERGER, K., TEIPEL, S.J., SCHELTENS, P., SCHROEDER, J., ZINKOWSKI, R.P., BOUWMAN, F.H., et al. Multicenter assessment of CSF-phosphorylated tau for the prediction of conversion of MCI. *Neurology*, v. 69, p.2205–2212, 2007.

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

FARLOW, M. R. MILLER, M. L. PEJOVIC, V. Treatment options in Alzheimer's disease: maximizing benefit, managing expectations. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, vol. 25, no. 5, pp. 408–422, 2008.

FARRIS, W., MANSOURIAN, S., CHANG, Y., LINDSLEY, L., ECKMAN, E. A., FROSCH, M. P., ECKMAN, C. B., TANZI, R. E., SELKOE, D. J. GUENETTE, S. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid β -protein, and the β -amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 100, p. 4162–4167, 2003.

FAZEKAS, F., STRASSER-FUCHS, S., KOLLEGER, H., BERGER, T., KRISTOFERITSCH, W., SCHMIDT, H., ENZINGER, C., SCHIEFERMEIER, M., SCHWARZ, C., KORNEK, B., et al. Apolipoprotein E epsilon 4 is associated with rapid progression of multiple sclerosis. *Neurology*, v. 57, p. 853–857, 2001.

FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. *Rev. de Psiquiatria Clín.*, v. 32, n.3, p. 137-148, 2005.

FORLENZA, O. V., DINIZ B. S. GATTAZ, F. W. Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease. *BMC Med.* 8:89, 2010.

FROTA, N.A.F., NITRINI, R., DAMASCENO, B.P., FORLENZA, O.V., DIAS-TOSTA, E., et al. Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer. *Dement. Neuropsych.*, n.5, v.3, p.6-10, 2011.

FUKUMOTO, H., ASAMI-ODAKA, A., SUZUKI, N., IWATSUBO, T. Association of Ab 40-positive senile plaques with microglial cells in the brains of patients with Alzheimer's disease and in non-demented aged individuals. *Neurodegeneration*, v. 5, p.13–17, 1996.

FURTADO-ALLE, L., ANDRADE, F. A., NUNES, K., MIKAMI, L. R., SOUZA, R. L.R., CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Association of variants of the -116 site of the butyrylcholinesterase BCHE gene to enzyme activity and body mass index. *Chemico-Biol. Interactions*, v.175 p.115–118, 2008.

GAHETE, A. RUBIO, M.D., CORDOBA-CHACON, J., GRACIA-NAVARRO, F., KINEMAN, R.D. AVILA, J. LUQUE, R.M., CASTANO, J.P. Expression of the ghrelin and neurotensin systems is altered in the temporal lobe of Alzheimer's disease patients, *J Alzheimers Dis.*, 819-828, 2010.

GATZ, M., REYNOLDS, C.A., FRATIGLIONI, L., JOHANSSON, B., MORTIMER JA, BERG S, FISKE A, PEDERSEN NL. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry*, v.63, p.168–74, 2006.

GATZ M, REYNOLDS CA, FINKEL D, PEDERSEN NL, WALTERS E. Dementia in Swedish twins: Predicting incident cases. *Behavior Genetics*, n.40, p.768-775, 2010.

GAUTHIER, S., JUBY, A. REHEH, B., SCHECTER. Exact: rivastigmine improves the high prevalence of attention deficits and mood and behaviour symptoms in Alzheimer's disease. *Int J Clin Pract*, June, n.61, v.6, p.886-895, 2007.

GHEBREMEDHIN E, THAL DR, SCHULTZ C, BRAAK H Agedependent association between butyrylcholinesterase K-variant and Alzheimer Disease-related neuropathology in human brains. *Neurosci. Lett.*, v. 320, p.25-28, 2001.

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

GIANNAKOPOULO, P.; HERRMANN, F.R.; BUSSIÈRE T, BOURAS C, KOVARI E, PERL DP, MORRISON JH, GOLD G, HOF PR. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* 60:1495–1500, 2003.

GOLOMB, J., KLUGER, A., FERRIS, S. Mild cognitive impairment: identifying and treating the earliest stages of Alzheimer's disease. *Neurosci News*, n.3, p.46–53, 2000.

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

GOMES, A. M.; KOSZUOSKI, R. Evidências atuais do impacto terapêutico dos inibidores da acetilcolinesterase no transtorno cognitivo leve e na demência vascular. *Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre, vol. 27, n. 2, 2005.

GRACE, E. A., RABINER, C. A., BUSCIGLIO, J. Characterization of neuronal dystrophy induced by fibrillar amyloid beta: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience*, v. 114, p. 265–273, 2002.

GREENE L. A., TISCHLER A. Establishment of a nonadrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl Acad. Sci.*, v.73, p.2424-2428, 1976.

GREIG, N. H., UTSUKI, T., INGRAM, D. K., WANG, Y., PEPEU, G., SCALI, C., YU, Q-S., MAMCZARZ, J., HOLLOWAY, H. W., GIORDANO, T. et al. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer amyloid peptide in rodent. *PNAS*, v. 102 (47), p.17213–17218, 2005.

GRUBBER, J.M., SAUNDERS, A.M., CRANE-GATHERUM, A.R. SCOTT, W.K., MARTIN, E.R., HAYNES, C.S., CONNEALLY, P.M., SMALL, G.W., ROSES, A.D., HAINES, J.L., PERICAK-VANCE, M.A. Analysis of association between Alzheimer disease and the K variant of butyrylcholinesterase (BCHE-K). *Neurosci. Lett*, v. 269, p.115-119, 1999.

GUERREIRO, R., WOJTAS, A., BRAS, J., CARRASQUILLO, M., ROGAEVA, E., MAJOUNIE, E. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 10;368(2), p.117-27, 2013

HALLIDAY, G.M., DOUBLE, K.L., MACDONALD, V., KRIL, J.J. Identifying severely atrophic cortical subregions in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.*, v.24(6), p.797-806, 2003.

HAMA H, HARA C, YAMAGUCHI K, MIYAWAKI A. PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact with astrocytes. *Neuron*, v. 41, p.405-415, 2004.

HAMAGUCHI, T., ONO K., YAMADA, M. Anti-amyloidogenic therapies: strategies for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 63, p.1538–1552, 2006.

HAOUAS, H., MORELLO, D., LAVENU, A., BILLARD, M., JASMIN C, BOUCHEIX C. Characterization of the 5' region of the CD10/neutral endopeptidase 24.11 gene. *Biochem Biophys Res Commun.*, n.207, v.3, p.933-942, 1995.

HARDY, J. A Hundred Years of Essay Alzheimer's Disease Research. *Neuron*, v.52, p.3–13, 2006.

HARDY, J., WILLIAMS J. Identification of Alzheimer Risk Factors Through Whole-Genome Analysis. *Arch Neurol.*, v. 67(6), p.663-664, 2010.

HARRIS, H. The principles of human biochemical genetics. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biochemical, 1980.

HARRIS, H., HOPKINSON, D.A E ROBSON, E.B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. *Nature*, London, v. 196, p. 1296-1298, 1962.

HATTERS, D.M., PETERS-LIBEU, C.A., WEISGRABER, K.H. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 31, p.445-454, 2006.

HELISALMI, S., HILTUNEN, M., VEPSALAINEN, S., IIVONEN, S., MANNERMAA, A., LEHTOVIRTA, M., KOIVISTO, A.M., ALAFUZOFF, I., SOININEN, H. Polymorphisms in neprilysin gene affect the risk of Alzheimer's disease in Finnish patients. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, v. 75(12), p.1746-1748, 2004.

HYMAN, B.T., TROJANOWSKI, J.Q. Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute Working Group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer disease. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* n.56, p.1095-1097, 1997.

HÖHMANN, C.F., COYLE, J. T. Long-term effects of basal forebrain lesions on cholinergic, noradrenergic and serotonergic markers in mouse neocortex. *Brain Research Bulletin*, n.21, v.1, p.13-20, 1988.

HUANG, Y. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Neurology*, v. 66, p.S79–S85, 2006.

HUANG, Y., LIU, X. Q., WYSS-CORAY, T., BRECHT, W. J., SANAN, D. A., MAHLEY, R. W. Apolipoprotein E fragments present in Alzheimer's disease brains induce neurofibrillary tangle-like intracellular inclusions in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 98, p.8838–8843, 2001.

HULSE, G.K., LAUTENSCHLAGER, N.T., TAIT, R.J., ALMEIDA, O.P. Dementia associated with alcohol and other drug use. *International Psychogeriatrics* 17 (SUPPL. 1) S109-S127, 2005.

HUGHES, T.F., BORENSTEIN, A.R., SCHOFIELD, E., WU, Y., LARSON, E.B. Association between late-life body mass index and dementia: The Kame Project. *Neurology*, 72(20), p.1741- 1746, 2009.

HUOVILA, A.P.J., TURNER, A.J., PELTO-HUIKKO, M., KARKKAINEN, L., ORTIZ, R.M. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem. Sci.*, v.30, p.413–422, 2005.

INGELSSON M, FUKUMOTO H, NEWELL KL, GROWDON JH, HEDLEY-WHYTE ET, FROSCHEMP, ALBERT MS, HYMAN BT, IRIZARRY MC. Early Ab accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology*, v. 62, p. 925–931, 2004.

IOSHIMOTO, G. L. Estudo da Eletrorretinografia do Camundongo Modelo de Alzheimer (3x Tg-AD). 2010. Dissertação de Mestrado em Ciências, Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

IQBAL, K., DEL C. ALONSO, A., CHEN, S., CHOCHAN, M.O., EL-AKKAD, E., GONG, C.X., KHATOON, S., LI, B., LIU, F., RAHMAN, A., TANIMUKAI, H., GRUNDKE-IQBAL, I. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molec. Basis of Disease*, v. 1739, p. 198-210, 2005.

IWATA, N., TSUBUKI, S., TAKAKI, Y., SHIROTANI, K., LU, B., GERARD, N. P., GERARD, C., HAMA, E., LEE, H. J., SAIDO, T. C. Metabolic regulation of brain Aβ by neprilysin. *Science*, v. 292, p.1550–1552, 2001.

IWATA, N., TSUBUKI, S., TAKAKI, Y., WATANABE, K., SEKIGUCHI, M., HOSOKI, E., KAWASHIMA-MORISHIMA, M., LEE, H. J., HAMA, E., SEKINE-AIZAWA, Y., SAIDO, T. C. Identification of the major Aβ₁₋₄₂-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat. Med.*, v. 6, p.143–150, 2000.

IWATSUBO, T., ODAKA, A., SUZUKI, N., MIZUSAWA, H., NUKINA, N., IHARA, Y. Visualization of Aβ₄₂₍₄₃₎ and Aβ₄₀ in senile plaques with end-specific Aβ monoclonals: evidence that an initially deposited species is Aβ₄₂₍₄₃₎. *Neuron*, v.13(1), p.45-53, 1994.

JACK CR JR, ALBERT MS, KNOPMAN DS, MCKHANN GM, SPERLING RA, CARRILLO MC, et al. Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, v.7, p.257–262, 2011.

JBILLO, O., TOUTANT, J. P., VATSIS, K. P., CHATONNET, A. LOCKRIDGE, O. Promoter and transcription start site of human and rabbit butyrylcholinesterase genes. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 20829-20837, 1994.

JIAJUN, S. ZHANG, S., TANG, M., MA, C., ZHAO, J., LI, T., LIU, X., SUN, Y., GUO, Y., HAN, H., MA, Y., ZHAO Z. Mutation screening and association study of the neprilysin gene in sporadic Alzheimer's disease in Chinese persons. *Journal of Gerontology: Biological Sciences*, v.60A, p.301-306, 2005.

JONES, P.B., ADAMS, K.W., ROZKALNE, A., SPIRES-JONES, T.L., HSHIEH, T.T., HASHIMOTO, T., VON ARMIN, C.A.F., MIELKE, M., BACSKAI, B. J., HYMAN. B.T. Apolipoprotein E: Isoform Specific Differences in Tertiary Structure and Interaction with Amyloid- β in Human Alzheimer Brain. *PLoS One*, v.6(1), e.14586, 2011.

JUN, G., NAJ, A.C., BEECHAM, G.W., et al. Meta-analysis confirms CR1, CLU, and PICALM as Alzheimer disease risk loci and reveals interactions with APOE genotypes. *Arch Neurol.* n.67, p.1473-1484, 2010.

JUUL, P. Human plasma cholinesterase isoenzymes. *Clin. Chem. Acta*, Amsterdam, v. 19, p. 205-208, 1968.

KALOW, W., GRANT, D.M. Pharmacogenetics, in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler K, and Vogelstein B eds) pp 225-255, McGraw Hill, 2001.

KALOW, W., STARON, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human cholinesterase as indicated by dibucaine numbers. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, Ottawa, v. 35, p. 1305-1320, 1957.

KAPLAN, D.R., MILLER, F.D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* v.10, p 381-391, 2000.

KAYED, R. HEAD, E., THOMPSON, J.L., MCINTIRE, T.M., MILTON, S.C., COTMAN, C.W., GLABE, C.G. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, v.300, p.486-489, 2003.

KENNY, A. J., STEPHENSON, S.L. Role of endopeptidase-24.11 in the inactivation of atrial natriuretic peptide. *FEBS Lett*, v.232, p.1-8, 1988

KI, C.S., NA, D.L., KIM, J.W., KIM, H.J., KIM, D.K., YOON, B.K. No association between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset Alzheimer's Disease. *Am. J. Med. Genet.*, v. 88, p. 113-115, 1999.

KIM, K.W., JHOO, J.H., LEE, J.H., LEE, K.U., LEE, D.Y., YOUN, J.C., YOUN, J.Y., WOO, J.I. Neither the butyrylcholinesterase K variant nor transferrin C2 variant confers a risk for Alzheimer's Disease in Koreans. *J. Neural. Transm.*, v.108, p.1159-1166, 2001.

KLUCKEN J, MCLEAN PJ, GOMEZ-TORTOSA E, INGELSSON M, HYMAN BT. Neuritic alterations and neural system dysfunction in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurochem Res.*, v. 28, p.1683-1691, 2003.

KNAPP, M.J., KNOPMAN, D.S., SOLOMON, P.R., et al. A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. *JAMA* n.271, p.985-991, 1994.

KNUSEL, B., GAO, H. Neurotrophins and Alzheimer's disease: beyond the cholinergic neurons. *Life Sci.*, v. 58 (22), p. 2019 – 2027, 1996.

KNOPMAN, D.; BOLAND, L. L.; MOSLEY, T.; HOWARD, G.; LIAO, D., SZKLO, M.; MCGOVERN, P.; FOLSOM AR. Cardiovascular risk factors and cognitive decline in middle-aged adults. *Neurology* n. 56, p. 42–48, 2001.

KOJIMA, M.; HOSODA, H.; DATE, Y.; NAKAZATO M.; MATSUO, H.; KANGAWA, K.; Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, London, v. 402, p. 656-660, 1999.

KOJIMA, M, KANGAWA, K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev.* 85(2), p.495-522. 2005.

KOO, E.H., SISODIA, S.S., ARCHER, D.R., MARTIN, L.J., WEIDEMANN, A., BEYREUTHER, K., FISCHER, P., MASTERS, C.L., AND PRICE, D.L. Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 87, p.1561–1565, 1990.

KOON, H.W., KIM, Y.S., XU, H., KUMAR, A., ZHAO, D., KARAGIANNIDES, I., DOBNER, P.R., POTHOUKAKIS, C. Neurotensin induces IL6 secretion in mouse preadipocytes and adipose tissues during 2,4,6, trinitrobenzenesulphonic acid induced colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 87668771, 2009.

KORBONITS, M.; GROSSMAN, A.B.; Ghrelin: update on a novel hormone system. *Eur. J. Endocrinol.*, Oslo, v. 151, suppl. 2, p. S67-S70, 2004.

KOTILINEK, L.A., BACSKAI, B., WESTERMAN, M., KAWARABAYASHI, T., YOUNKIN, L., HYMAN, B.T., et al. Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, v.22, p.6331–6335, 2002.

KUTTY, K.M., REDHEENDRAN, R., MURPHY, D. Serum cholinesterase: function in lipoprotein metabolism. *Experientia*, v.15, p.420-422, 1977.

LACOR, P. N., BUNIEL, M.C., FURLOW, P.W., CLEMENTE, A.S., VELASCO, P.T., WOOD, M., VIOLA, K.L., KLEIN, W.L. Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neuroscience*, v. 27(4), p.796-807, 2007.

LAGO, F., GONZALEZ-JUANATEY, J.R, CASANUEVA, F.F., GOMEZ-REINO, J., DIEGUEZ, C., et al. Ghrelin, the same peptide for different functions: player or bystander? *Vitam Horm*, n. 71, p. 405–32, 2005.

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

LAI, M.K., TSANG, S.W., GARCIA-ALLOZA, M., MINGER, S.L., NICOLL, J.A., ESIRI, M.M., WONG, P.T., CHEN, C.P., RAMIREZ, M.J., FRANCIS, P.T. Selective effects of the APOE epsilon4 allele on presynaptic cholinergic markers in the neocortex of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.*, v. 22, p.555–561, 2006.

LAMBERT, J. C., BERR, C., PASQUIER, F., DELACOURTE, A., FRIGARD, B., COTTEL, D., EREZ-TUR, J., MOUROUX, V., MOHR, M., CECYRE, D., et al. Pronounced impact of Th1/E47cs mutation compared with -491 AT mutation on neural APOE gene expression and risk of developing Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.*, v.7, p.1511-1516, 1998.

LAMBERT, J. C., BERR, C., PASQUIER, F., DELACOURTE, A., FRIGARD, B., COTTEL, D., PEREZ-TUR, J., MOUROUX, V., MOHR, M., CECYRE, D., et al. Pronounced impact of Th1/E47cs mutation compared with -491 AT mutation on neural APOE gene expression and risk of developing Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.*, v.7, p.1511-1516, 1998.

LANCTÔT, K.L., HERRMANN, N., YAU, K.K., KHAN, L.R., LIU, B.A., LOULOU, M.M., EINARSON, T.R. Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease: a meta-analysis. *CMAJ*, n.169, v.6, p.557-564, 2003.

LAWRENCE, S.H., MELNICK, P.J. Enzymatic activity related to human serum betalipoprotein: histochemical immunoelectrophoretic and quantitative studies. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, v.107, p.998-1001, 1961.

LAWS, S. M., HONE, E., GANDY, S., MARTINS, R. N. 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. *Journal of neurochemistry*, v.84, p.1215-1236, 2003.

LAWS, S.M., TADDEI, K., FISHER, C. SMALL, D., CLARNETTE, R., HALLMAYER, J., BROOKS, W.S., KWOK, J.B.J., SCHOFIELD, P.R., GANDY, S.E., MARTINS, R.N. Evidence that the butyrylcholinesterase K variant can protect against lateonset Alzheimer's disease. *Alzheimer's Reports*, v.2, p.219-223, 1999.

LAYER, P.G. Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*, Oxford, v.28, n.5-6, p.491-495, 1996.

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

LEE, D.W., LIU, H.C., CHI, C.W., HONG, C.J. No association between butyrylcholinesterase K-variant and Alzheimer Disease in Chinese. *Am. J. Med. Genet.*, v. 96, p.167–169, 2000.

LEHMANN, D.J., JOHNSTON, C., SMITH, A.D. Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.*, v.6, p.1933–1936, 1997.

LEHMANN, D.J., WILLIAMS, J., MCBROOM, J., SMITH, A.D. Using meta-analysis to explain the diversity of results in genetic studies of late-onset Alzheimer's disease and to identify high-risk subgroups. *Neuroscience*, v. 108, p.541-554, 2001.

LEMERE, C.A., SPOONER, E.T., LAFRANCOIS, J., MALESTER, B., MORI, C., LEVERONE, J.F., MATSUOKA Y, DEMATTOS, R.B., HOLTZMAN, D.M., CLEMENTS, J.D., SELKOE, D.J., DUFF, K.E. Evidence for peripheral clearance of cerebral Ab protein following chronic, active Ab immunization in PSAPP mice. *Neurobiol. Dis.*, v. 14, p. 10–18, 2003.

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

LI, H., SCHOPFER, L. M., MASSON, P., LOCKRIDGE, O. Lamellipodin proline rich peptides associated with native plasma butyrylcholinesterase tetramers. *Biochem. J.*, v. 411, p.425–432, 2008.

LOCKRIDGE, O., MASSON, P. Pesticides and susceptible populations: People with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. *Neurotoxicology*, v. 21, p. 113–126, 2000.

LOVESTONE, S., ANDERTON, B. H., HARTLEY, K., JENSEN, T. G., JORGENSEN, A. L. The intracellular fate of apolipoprotein E is tau dependent and ApoE allele-specific. *NeuroReport*, v.7, p.1005-1008, 1996.

MAGARIAN, E.O., DIETZ, A.J. Correlation of cholinesterases with serum lipids and lipoproteins. *J.Clin.Pharmacol.*, v.27, p.819-820, 1987.

MAHLEY R.W., INNERARITY T. L., RALL S. C. JR WEISGRABER K. H. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid Res.*, v. 25, p.1277–1294, 1984.

MAHLEY, R. W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, v. 240, p.622–630, 1988.

MAHLEY, R. W., RALL, S. C. Jr. in *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., Eds.) 7th ed., pp 1953-1980, McGraw-Hill, New York, 1995.

MAHLEY, R.W., HUANG, Y. Apolipoprotein (apo) E4 and Alzheimer's disease: unique conformational and biophysical properties of ApoE4 can modulate neuropathology. *Acta Neurol. Scand. Suppl.*, v.185, p. 8–14, 2006.

MAHLEY, R.W., RALL, S.C. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu. Rev. Gen. Hum. Genet.*, v. 01, p.507–37, 2000.

MAHLEY, R.W., WEISGRABER, K.H., HUANG, Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad. Sci.*, v.103, p.5644–5651, 2006.

MALFROY, B., KUANG, W.J., SEEBURG, P.H., MASON, A.J., SCHOFIELD, P.R. Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). *FEBS Lett*, v.229, p.206-210, 1988.

MALITO, E. HULSEB, R. E. TANG, W.-J. Amyloid b-degrading cryptidases: insulin degrading enzyme, presequence peptidase, and neprilysin *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 65, p. 2574-2585, 2008.

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

MARTINS, R.N., CLARNETTE, R., FISHER, C. BROE, G.A., BROOKS, W.S., MONTGOMERY, P., GANDY, S.E. ApoE genotypes in Australia: roles in early and late onset Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Neuroreport.*, v. 6, p. 1513-1516, 1995.

MARUYAMA, M., HIGUCHI, M., TAKAKI, Y., MATSUBA, Y., TANJI, H., NEMOTO, M., TOMITA, N., MATSUI, T., IWATA, N., MIZUKAMI, H., et al. Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, v.57, p.832–842, 2005.

MASSON, P, XIE, W, FROMENT, M.T E LOCKRIDGE, O. Effects of mutations of active site residues and amino acids interacting with the 6 loop on substrate activation of butyrylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1544, p. 166-176, 2001.

MATEO, I., LLORCA, J., INFANTE, J., RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, E., BERCIANO, J., COMBARROS, O. Gene-gene interaction between 14-3-3 zeta and butyrylcholinesterase modulates Alzheimer's disease risk. *Eur. J. Neurol.*, v.15, p.219-222, 2008.

MATSAS, R., FULCHER, I.S., KENNY, A.J., TURNER, A.J. Substance P and [Leu]enkephalin are hydrolysed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.80, p.3111-3115, 1983.

MATTSON, M. P., FURUKAWA, K. Programmed cell life: anti-apoptotic signaling and therapeutic strategies for neurodegenerative disorders. *Res. Neurol. Neurosci.*, v. 9, p. 191-205, 1996.

MCGEHEE, D.S., KRASOWSKI, M.D., FUNG, D.L., WILSON, B., GRONERT, G.A., MOSS, J. Cholinesterase inhibition by potato glycoalkaloids slows mivacurium metabolism. *Anesthesiology*, v. 93, p. 510–519, 2000.

MCGUIRE, M. C., NOGUEIRA, C. P., BARTELS, C. F., LIGHTSTONE, H., HAJRA, A., VAN DER SPEK, A. F. L., LOCKRIDGE, O. LA DU, B. N. Identification of the structural

mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 86, p. 953-57, 1989.

MCILROY, S.P., CRAWFORD, V.L., DYNAN, K.B., MCGLEENON, B.M., VAHIDASSR, M.D., LAWSON, J.T., PASSMORE, A.P. Butyrylcholinesterase K variant is genetically associated with late onset Alzheimer's disease in Northern Ireland. *J. Med. Genet.*, v.37, p.182-185, 2000.

MCKHANN, G., DRACHMAN, D., FOLSTEIN, M., KATZMAN, R., PRICE, D., STADLAN, E.M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS/ADRDA workgroup under the auspices of the department of Health and Human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology*, v. 34, p. 939-944, 1984.

MCKHANN, G.M., KNOPMAN, D.S., CHERTKOW, H., HYMAN, B.T., JACK, C.R., KAWAS, C.H., et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, v.7, n. 3, p. 263-269, 2011.

MCLEAN, J. W., ELSHOURBAGY, N. A., CHANG, D. J., MAHLEY, R. W. TAYLOR, J. M. Human apolipoprotein E mRNA. cDNA cloning and nucleotide sequencing of a new variant. *J. Biol. Chem.*, v.259, p.6498-6504, 1984.

MESULAM, M-M., GUILLOZET, A., SHAW, P., LEVEY, A., DUYSEN, E.G., LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*, v.110, p. 627-639, 2002.

MIKAMI, L. R., WIESELER S, SOUZA R. L.R., SCHOPFER L. M., NACHON F., LOCKRIDGE, O., CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Five new naturally occurring mutations of the BCHE gene and frequencies of 12 butyrylcholinesterase alleles in a Brazilian population. *Pharmacogenetics and Genomics*, v.18 (3), p 213-218, 2008.

MILLARD CB, BROOMFIELD CA. A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase. *Biochem Biophys Res Commun*. n.189, v.3, p.1280-1286, 1992.

MIRRA, S.S. The CERAD neuropathology protocol and consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease: a commentary. *Neurobiol Aging* v.18, S91-S94. 1997.

MOESTRUP, S. K., GLIEMANN, J., PALLESEN, G. Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res.*, v. 269, p.375-382, 1992.

MOHAJERI, M.H., WOLLMER, M.A., NITSCH, R.M. Abeta 42-induced increase in neprilysin is associated with prevention of amyloid plaque formation in vivo. *J Biol Chem*, v.277, p.35460-35465, 2002.

MOOLMAN, D.L., VITOLO, O.V., VONSATTEL, J.P., SHELANSKI, M.L. Dendrite and dendritic spine alterations in Alzheimer models. *J. Neurocytol.*, v. 33, p.377–387, 2004.

MORGAN, D., DIAMOND, D.M., GOTTSCHALL, P.E., UGEN, K.E., DICKEY, C., HARDY, J., DUFF, K., JANTZEN, P., DICARLO, G., WILCOCK, D., CONNOR, K., HATCHER, J., HOPE, C., GORDON, M., ARENDA, S.H., et al. Ab peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*, v.408, p. 982–985, 2000.

MORRIS, J.C., RUBIN, E.H., Clinical diagnosis and course of Alzheimer's disease. *Psychiatr. Clin. North. Am.*, v.14(2), p. 223-36, 1991.

NARAHASHI T.; MORIGUCHI S.; ZHAO X.; MARSZALEC W.; YEH J.Z. Mechanisms of action of cognitive enhancers on neuroreceptors. *Biol Pharm Bull*, v.27, n.11, p.1701-1706, 2004;

NATHAN, B. P., BELLOSTA, S., SANAN, D. A., WEISGRABER, K. H., MAHLEY, R. W., PITAS, R., E. Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science*, v. 264, p.850–852, 1994.

NATHAN, B. P., CHANG, K.-C., BELLOSTA, S., BRISCH, E., GE, N., MAHLEY, R. W., PITAS, R. E. J. The inhibitory effect of apolipoprotein E4 on neurite outgrowth is associated with microtubule depolymerization. *Biol. Chem.* 270, 19791–19799, 1995.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?Db=genecmd=retrieveopt=full_reportelist_uids=590. Acessado em 28/01/2011.

NGAMELUE, M. N., HOMMA K., LOCKRIDGE O., ASOJO O. A. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, v.63, p.723–727. 2007

NICOLL JA, BARTON E, BOCHE D, NEAL JW, FERRER I, THOMPSON P., VLACHOULI, C., WILKINSON, D., BAYER, A., GAMES, D., SEUBERT, P., SCHENK, D., HOLMES, C. Abeta Species Removal After Abeta42 Immunization. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006, 65: 1040–8.

NITRINI, R., BOTTINO, C.M. C., ALBALA, C., CAPUÑAY, N. S. C., KETZOIAN, C., RODRÍGUEZ, J. J. L., MAESTRE, G. E., RAMOS-CERQUEIRA, A. T. A., CARAMELLI, P. Prevalence of dementia in Latin America: a collaborative study of population-based cohorts, *Inter. Psychogeriatrics*, v. 21, p.622-630, 2009.

NOVAK, U. ADAM proteins in the brain. *J. Clin. Neurosci.*, v.11, p.227–235, 2004.

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

OGANE, N., GIACOBINI, E., STRUBLE, R. Differential inhibition of acetylcholinesterase molecular forms in normal and Alzheimer disease brain. *Brain Res.* n.589, v.2, n.307–312, 1992.

OSLON, L., BÄCKMAN, L., EBENDAL, T., JÖNHAGEN, M. E., HOFFER, B., HUMPEL, C., FREEDMAN, R., GRACOBINI, M., MEYERSON, B., NORDBERG, A., et al. Role of growth factors in degeneration and regeneration in the central nervous system, clinical experiences with NGF in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J. Neurol.*, v. 241, p. 12-15, 1994.

OSTERGAARD, D., VIBY-MOGENSEN, J., HANEL, H. K. AND SKOVGAARD, L. T. Half-life of plasma cholinesterase. *Acta Anaesthesiol. Scand.*, v. 32, p. 266–269, 1988.

PAIK Y. K., CHANG D. J., REARDON C. A., WALKER M. D., TAXMAN E., TAYLOR J. M. Identification and characterization of transcriptional regulatory regions associated with expression of the human apolipoprotein E gene. *J. Biol. Chem.*, v. 263, p.13340-13349, 1988.

PAIK, Y. K., CHANG, D. J., REARDON, C. A., DAVIES, G. E., MAHLEY, R. W., TAYLOR, J. M. Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.82, p.3445–3449, 1985.

PANEGYRES, P.K., MAMOTTE, C.D., VASIKARAN, S.D., WILTON, S., FABIAN, V., KAKULAS, B.A. Butyrylcholinesterase K variant and Alzheimer's disease. *J. Neurol.*, v.246, p.369–370, 1999.

PANKRATZ, N., BYDER, L., HALTER, C., RUDOLPH, A., SHULTSC, W., CONNEALLY, P.M., FOROUD, T., NICHOLS, W.C. Presence of an APOE4 allele results in significantly earlier onset of Parkinson's disease and a higher risk with dementia. *Mov. Disord.*, v. 21, p.45– 49, 2006.

PATAPOUTIAN, A., REICHARDT, L.F. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v.11, p.272-280, 2001.

PEPEU G., GIOVANNINI, M. G. Cholinesterase inhibitors and beyond, *Curr. Alzheimer Res.* v.6 p.86-96, 2009.

PÉREZ-GRACIA, E., TORREJÓN-ESCRIBANO, B., FERRER, I. Dystrophic neurites of senile plaques in Alzheimer's disease are deficient in cytochrome c oxidase. *Acta Neuropathol.*, v.116, p.261-268, 2008.

PERRIER, A.L., MASSOULIÉ, J., KREJCI, E. PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron*, v. 33, p.275–285, 2002.

PERRY, E., PERRY, R., BLESSED, G., TOMLINSON, B. Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, v.4, p.273-277, 1978.

PERSSON, C. M., WALLIN, A. K., LEVANDER S., MINTHON, L. Changes in cognitive domains during three years in patients with Alzheimer's disease treated with donepezil, *BMC. Neurol.* v.9 p.7, 2009.

PETERSEN, R.C. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J. Intern. Med.*, v.256, p. 183–194, 2004.

PHU, M.J., HAWBECKER, S.K., NARAYANASWAMI, V. Fluorescence resonance energy transfer analysis of apolipoprotein E C-terminal domain and amyloid beta peptide (1-42) interaction. *J. Neurosci. Res.*, v.80, p. 877–886, 2005.

PIKE, C. J., BURDICK, D., WALENCEWICZ, A. J., GLABE, C. G., COTMAN, C. W. Neurodegeneration induced by betaamyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J. Neurosci*, v. 13, p.1676–1687, 1993.

PODOLY, E., BRUCK, T., DIAMANT, S., MELAMED-BOOK, N., WEISS, A., HUANG, Y., LIVNAH, O., LANGERMANN, S., WILGUS, H., SOREQ, H. *Neurodegener. Dis.*, v. 5, p.232-236, 2008.

PODOLY, E., HANIN, G., SOREQ, H. Alanine-to-threonine substitutions and amyloid diseases: Butyrylcholinesterase as a case study. *Chem. Biol. Interact.*,v.187, p.64–71, 2010.

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

PODUSLO, S. E. CURRAN, G.L., KUMAR, A., FRANGIONE, B., SOTO, C. A familial case of Alzheimer's disease without tau pathology may be linked with chromosome 3 markers. *Human Genetics*, v.105, p.32–37, 1999.

POIRIER, J., DAVIGNON, J., BOUTHILLIER, D., KOGAN, S., BERTRAND, P., GAUTHIER, S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet.*, v. 342(8873), p.697-699, 1993.

POIRIER, J., HESS, M., MAY, P. C., FINCH, C. E. Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, v.11,p. 97–106, 1991.

PRICE, J.L., MCKEEL DW JR, BUCKLES VD, ROE CM, XIONG C, GRUNDMAN M, HANSEN LA, PETERSEN RC, PARISI JE, DICKSON DW, et al. Neuropathology of nondemented aging: Presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*. v.30, p.1026–1036. 2009.

PROTO, C., ROMUALDI, D., CENTO, R.M., SPADA, R.S., DI MENTO, G., FERRI, R., LANZONE, A. Plasma levels of neuropeptides in Alzheimer's disease. *Gynecol Endocrinol* 22, 213218, 2006.

PULA, G., KRAUSE, M. Role of Ena/VASP proteins in homeostasis and disease. *Handb Exp. Pharmacol.*, v.186, p.39–65, 2008.

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

RAFFAÏ, R.L., DONG, L-M., FARESE, R.V. JR., WEISGRABER, K.H. Introduction of human apolipoprotein E4 “domain interaction” into mouse apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 98, p.11587–11591, 2001.

RALL, S. C. JR, WEISGRABER, K. H., MAHLEY, R. W. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.*, v.257, p.4171-4178, 1982.

RAMASWAMY, G., XU, Q., HUANG, Y., WEISGRABER, K.H. Effect of Domain Interaction on Apolipoprotein E Levels in Mouse Brain. *J. Neurosci.*, v.25(46), p.10658-10663, 2005.

RAYGANI, A.V., ZAHRAI, M., SOLTANZADEH, A., DOOSTI, M., JAVADI, E., POURMOTABBED, T. Analysis of association between Butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E genotypes in Alzheimer’s Disease. *Neurosc. Lett.*, v.371, p.142–146, 2004.

RASCHETTI, R., MAGGINI, M., SORRENTINO, G.C., et al. A cohort study of effectiveness of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer’s disease. *Eur J Clin Pharmacol.* v.61, p.361–368, 2005.

REBECK, G. W., REITER, J. S., STRICKLAND, D. K., HYMAN, B. T., Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer’s disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron*, v. 11, p. 575–580, 1993.

REITZ C, BRAYNE C, MAYEUX R, MEDSCAPE. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, Mar,v.7(3), p.137-52, 2011

RIDDELL, D. R., ZHOU, H., ATCHISON, K., WARWICK, H. K., ATKINSON, P.J., JEFFERSON, J., XU, L., ASCHMIES, S., KIRKSEY, Y., HU, Y. et al. Impact of Apolipoprotein E (ApoE) Polymorphism on Brain ApoE Levels. *The Journal of Neurosci.*, v. 28(45), p. 11445-11453, 2008.

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

ROMBOUTS SA, BARKHOF F, WITTER MP, SCHELTENS P. Unbiased whole-brain analysis of gray matter loss in Alzheimer’s disease. *Neurosci Lett.* v.285, n.3, p.231–233, 2000.

ROQUES, B.P., NOBLE, F., DAUGÉ, V., FOURNIEÉ-ZALUSKI, M-C., BEAUMONT, A. Neutral endopeptidase 24.11. Structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev*, v.45, p.87-146, 1993.

ROSES, A.D. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer’s disease. *Annu. Rev. Med.* V. 47P. 387–400, 1996.

RUBINSTEIN, H. M., DIETZ, A. A., LUBRANO, T. E1K, another quantitative variant at cholinesterase locus 1. *J. Med. Genet.*, v. 15, p. 27-29, 1978.

RYHÄNEN, R.J., JAUHIANEN, M.S., LAITINEN, M.V., PUHAKAINEN, E.V. The relationship between humn serum pseudocholinesterase, lipoproteins, and apolipoproteins (APOHDL). *Biochem.Med.*, v.28, p.241-245, 1982.

SAIDO, T.C., NAKAHARA, H. Proteolytic Degradation of A β by Neprilysin and Other Peptidases. *Madame Curie Bioscience Database*. Austin (TX): Landes Bioscience, 2000.

SAKAI, A., UJIKE, H., NAKATA, K., TAKEHISA, Y., IMAMURA, T., UCHIDA, N., KANZAKI, A., YAMAMOTO, M., FUJISAWA, Y., OKUMURA, K., et al. Association of the Neprilysin gene with susceptibility to late-onset Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, v. 17(3), p.164-169, 2004.

SAXENA, A., ASHANI, Y., RAVEH, L., STEVENSON, D., PATEL, T., DOCTOR, B. P. Role of oligosaccharides in the pharmacokinetics of tissue-derived and genetically engineered cholinesterases. *Mol. Pharmacol.*, v. 53, p.112–122, 1998.

SCHENK D, BARBOUR R, WHITNEY D, GORDON G, GRAJEDA H, GUIDO T, HU, K., HUANG, J., JOHNSON-WOOD, K., KHAN, K. et al. Immunization with amyloid-b attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, V. 400, P. 173–177, 1999.

SELKOE, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, 741766, 2001.

SERRANO-POZO, A., FROSCH, M.P., MASLIAH, E., HYMAN, B.T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* v.3, n.8 :a006189, 2011.

SESHADRI, S., FITZPATRICK, A.L., IKRAM, M.A., et al. Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA*, n.303, p.1832–1840, 2010.

SHAFFERMAN, A., KRONMAN, C., FLASHNER, Y., LEITNER, M., GORSFELD, H., ORDENTLICH, A., GOZES, Y., COHEN, S., ARIEL, N., BARAK, D., HAREL, M., SILMAN, I., SUSSMAN, J.L., VELAN, B. Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 267, p. 17640-17648, 1992.

SHI, J., ZHANG, S., TANG, M., MA, C., ZHAO, J., LI, T., LIU, X., SUN, Y., GUO, Y., HAN, H., et al. Mutation screening and association study of the neprilysin gene in sporadic Alzheimer's disease in Chinese persons. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, v.60(3), p.301-306, 2005.

SHIPP, M.A, TARR, G.E., CHEN, C.Y., SWITZER, S.N., HERSH, L.B., STEIN, H., et al. CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA.*, v.88(23), p.10662-6. 1991.

SHOJI, M., HIRAI, S., YAMAGUCHI, H., HARIGAYA, Y., KAWARABAYASHI, T. Amyloid b-protein precursor accumulates in dystrophic neurites of senile plaques in Alzheimer-type dementia. *Brain Res.*, v. 512, p. 164–168, 1990.

SIEST, G., PILLOT, T., RÉGIS-BAILLY, A., LEININGER-MÜLLER, B., STEINMETZ, J., GALTEAU, M.M., VISVIKIS, S. Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine *Clin. Chem.*, v.41, p. 1068-1086, 1995.

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

SILVERMAN DH. Brain 18F-FDG PET in the diagnosis of neurodegenerative dementias: Comparison with perfusion SPECT and with clinical evaluations lacking nuclear imaging. *J Nucl Med.*;45:594-607, 2004.

SIMAO-SILVA, D.P., BERTOLUCCI, P.H., DE LABIO, R.W., PAYAO, S.L., FURTADO-ALLE, L., SOUZA, R.L. Association analysis between K and -116A variants of butyrylcholinesterase and Alzheimer's disease in a Brazilian population, *Chem Biol Interact.* 203, p.358-360, 2013.

SINGLETON, A.B., SMITH, G., GIBSON, A.M., WOODWARD, R., PERRY, R.H., INCE, P.G., EDWARDSON, J.A., MORRIS, C.M. No association between the K variant of the butyrylcholinesterase gene and pathologically confirmed Alzheimer's Disease. *Hum. Mol. Genet.*, v. 7, p. 937-939, 1998.

SMITH, D. L., POZUETA, J., GONG, B., ARANCIO, O., SHELANSKI, M. Reversal of long-term dendritic spine alterations in Alzheimer disease models. *PNAS*, v. 106(39), p.16877-16882, 2009.

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

SMALL, S.A., DUFF, K. Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron*, n.60, p.534-542, 2008.

SHOJI, M., HIRAI, S., YAMAGUCHI, H. et al. Amyloid β -protein precursor accumulates in dystrophic neurites of senile plaques in Alzheimer-type dementia. *Brain. Res.* n.512, p.164-168. 1990.

SONGYANG, Z., SHOELSON, S.E., CHAUDHURI, M., GISH, G., PAWSON, T., HASER, W.G., KING, F., ROBERTS, T., RATNOFSKY, S., LECHLEIDER, et al. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*, v.72, p.767-778, 1993.

SOREQ, H., SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.*, v.2, p.294-302, 2001.

SOUZA, R. L. R, MIKAMI, L. R., MAEGAWA, R. O. B., CHAUTARD-FREIRE- MAIA, E. A. Four new mutations in the BCHE gene of butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. *Mol. Genet. Metab.*, v. 84, p. 349-353, 2005.

SOUZA, R.L.R, CASTRO, R.M.V., PEREIRA, L., FREUND, A.A., CULPI, L. CHAUTARD-FREIRE-MAIA. Frequencies of the butyrylcholinesterase K mutation in the

Brazilian population of European and African origin. *Hum. Biol.*, Detroit, v. 70, p. 965-970, 1998.

SOUZA, R.L.R. Variação fenotípica e genotípica da butirilcolinesterase humana e sua relação com altura e índice de massa corporal. Curitiba, Tese de Doutorado em Genética) Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2001.

STEPHENS, R.M., LOEB, D.M., COPELAND, T.D., PAWSON, T., GREENE, L.A., KAPLAN, D.R. Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC- γ 1 to mediate NGF responses. *Neuron*, v.12, p.691–705, 1994.

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

STRITTMATTER, W. J., WEISGRABER, K. H., GOEDERT, M., SAUNDERS, A. M., HUANG, D., CORDER, E. H., DONG, L.-M., JAKES, R., ALBERTS, M. J., GILBERT, J. R., et al. Hypothesis: microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype. *Exp. Neurol.*, v.125, p. 163-171, 1994.

STRITTMATTER, W.J., SAUNDERS, A.M., SCHMECHEL, D., PERICAK-VANCE, M., ENGHILD, J., SALVESEN, G.S., ROSES, A.D. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 90(5), p.1977-1981, 1993.

STURM, A., WOGRAM, J., SEGNER, H., LIESS, M. Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from threespined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 19, p. 1607-1615, 2000.

SUSSMAN, J.L., HAREL, M., FROLOW, F., OEFNER, C., GOLDMAN, A., TOKER, L., SILMAN, I. A. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, Washington, v.253, p. 872-878, 1991.

SUZUKI, T., ARAKI, Y., YAMAMOTO, T., NAKAYA, T. Trafficking of Alzheimer's Disease-Related Membrane Proteins and Its Participation in Disease Pathogenesis. *J. Biochem.*, v.139, p.949-955, 2006.

TABATON, M., MANDYBUR, T.I., PERRY, G., ONORATO, M., AUTILIO-GAMBETTI, L., GAMBETTI, P., The widespread alteration of neurites in Alzheimer's disease may be unrelated to amyloid deposition. *Annals of Neurology*, v. 26(6), p.771-778, 1989. Article first published online: 2004.

TABATON, M., TAMAGNO, E. The molecular link between beta- and gamma-secretase activity on the amyloid beta precursor protein. *Cell Mol Life Sci*, n.64, p.2211–2218, 2007.

TAKASUGI, N., TOMITA, T., HAYASHI, I., TSURUOKA, M., NIIMURA, M., TAKAHASHI, Y., THINAKARAN, G., IWATSUBO, T. The role of presenilin cofactors in the γ -secretase complex. *Nature*, v.422, p.438–441, 2003.

TAMAMIZU-KATO S, COHEN JK, DRAKE CB, KOSARAJU MG, DRURY J, et al. Interaction with amyloid beta peptide compromises the lipid binding function of apolipoprotein E. *Biochemistry*, v. 47, p. 5225–5234, 2008.

TANG, B.L. Protein trafficking mechanisms associated with neurite outgrowth and polarized sorting in neurons. *J. Neurochem.*, v. 79, p.923-930, 2001.

TANZI, R.E., BERTRAM, L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*. n.120, v.4, p.545-55, 2005.

TAYLOR, P., RADIC, Z. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu Rev Pharmacol. Toxicol.*, v.34, p.281-320, 1994.

TEIPEL, S.J., STAHL R, DIETRICH O, SCHOENBERG SO, PERNECZKY R, BOKDE AL, REISER MF, MOLLER HJ, HAMPEL H. Multivariate network analysis of fiber tract integrity in Alzheimer's disease. *Neuroimage*, v.34, p.985–995, 2007.

TERRY, R.D.; MASLIAH, E.; SALMON, D.P; BUTTERS, N.; DETERESA, R.; HILL, R.; HANSEN, L.A.; KATZMAN, R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol.*, v.30, p.572–580, 1991.

TILLEY, L., MORGAN, K., GRAINGER, J., MARSTERS, P., MORGAN, L., LOWE, J., XUEREB, J., WISCHIK, C., HARRINGTON, C., KALSHEKER, N. Evaluation of polymorphisms in the presenilin-1 gene and the butyrylcholinesterase gene as risk factors in sporadic Alzheimer's disease. *Eur. J. Hum. Genet.*, v.7, p.659–663, 1999.

TOURTELLOTTE, W.G., VAN HOESEN, G.W. The axonal origin of a subpopulation of dystrophic neurites in Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*, v.129(1), p.11-16, 1991.

TUNEK, A., LEVIN, E., SVENSSON, L.A. Hydrolysis of 3H-bambuterol, a carbamate prodrug of terbutaline, in blood from humans and laboratory animals in vitro. *Biochem. Pharmacol.*, v.37, p. 3867-3876, 1988.

UKKOLA, O., RAVUSSIN, E., JACOBSON, P., SNYDER, E.E., CHAGNON, M., SJÖSTRÖM, L., BOUCHARD, C. **Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in humans.** *J Clin Endocrinol Metab.*, **86(8)**, p.3996-9, 2001.

WANG, J. C., KWON, J. M., SHAH, P., MORRIS, J. C., GOATE, A. Effect of APOE genotype and promoter polymorphism on risk of Alzheimer's disease. *Neurology*, v.55, p.1644–1649, 2000.

WEGGEN, S., ERIKSEN, J.L., DAS, P., SAGI, S.A., WANG, R., PIETRZIK, C.U., FINDLAY, K.A., SMITH, T.E., MURPHY, M.P., BULTER, T., et al. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature*, v. 414, p. 212–216, 2001.

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

WHO, World Health Organization and Alzheimer's Disease International. Dementia: a public health priority, World Alzheimer Report, 2012. Disponível em: http://www.who.int/mental_health/publications/dementia_report_2012/en/

WHITTAKER, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. *Anaesthesia*, v. 35, p. 174-197, 1980.

WIEBUSCH, H., POIRIER, J., SEVIGNY, P., SCHAPPERT, K. Further evidence for a synergistic association between APOE e4 and BCHE-K in confirmed Alzheimer's Disease. *Human. Genet.*, v. 104, p.158–163, 1999.

WILTFANG, J., ESSELMANN, H., CUPERS, P., NEUMANN, M., KRETZSCHMAR, H., BEYERMANN, M., SCHLEUDER, et al. Elevation of b-amyloid peptide 2-42 in sporadic and familial Alzheimer's disease and its generation in PS1 knockout cells. *J Biol Chem*, v. 276(46), p.42645-57, 2001.

WINBLAD, B., PORITIS, N. Memantine in severe dementia: results of the M-Best Study (Benefit and Efficacy in Severely Demented Patients During Treatment With Memantine). *Int J Geriatr Psychiatry*, v.14, p.135–146, 1999.

WISNIEWSKI T, FRANGIONE B. Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci. Lett.*, v.135(2), p.235–238, 1992.

WOOD, L.S., PICKERING, E.H., MCHALE, D., DECHAIRO, B.M. Association between neprilysin polymorphisms and sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, v.427(2), p.103-106, 2007.

XU, P. T., GILBERT, J. R., QIU, H. L., ROTHROCK-CHRISTIAN, T., SETTLES, D. L., ROSES, A. D., SCHMECHEL, D. E. Regionally specific neuronal expression of human APOE gene in transgenic mice. *Neurosci. Lett.*, v. 246, p.65-68, 1998.

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.*, v.129, p.56-61, 1995.

YAMAGATA, K., URAKAMI, K., IKEDA, K., JI, Y., ADACHI, Y., ARAI, H., SASAKI, H., SATO, K., NAKASHIMA, K. High expression of apolipoprotein E mRNA in the brains with sporadic Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, v.12, p.57-62, 2001.

YAMAMOTO, Y., YASUDA, M., MORI, E., MAEDA, K. Failure to confirm a synergistic effect between the K-variant of the butyrylcholinesterase gene and the e4 allele of the apolipoprotein gene in Japanese patients with Alzheimer's Disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, v.67, p.94–96, 1999.

YASOJIMA, K., MCGEER, E. G. AND MCGEER, P. L. Relationship between β -amyloid peptide generating molecules and neprilysin in Alzheimer disease and normal brain. *Brain Res.*, v.919, p.115–121, 2001.

YE, S., HUANG, Y., MÜLLENDORFF, K., DONG, L., GIEDT, G., MENG, E.C., COHEN, F.E., KUNTZ, I.D., WEISGRABER, K.H., MAHLEY, R.W. Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid - peptide production in cultured neuronal cells: ApoE structure as a potential therapeutic target. *Proc Natl. Acad Sci USA*, v. 102, p.18700–18705, 2005.

ZHANG, J.V., REN, P.G., AVSIAN-KRETCHMER, O., LUO, C.W., RAUCH, R., KLEIN, C., HSUEH, A.J. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science (Washington)*, v. 310: p. 996–999, 2005.

ZAROW C., VICTOROFF J. Increased apolipoprotein E mRNA in the hippocampus in Alzheimer disease and in rats after entorhinal cortex lesioning. *Exp. Neurol.*, v.149, p.79-86, 1998.

ZHAO, Q., TANG, X.C. Effects of huperzine A on acetylcholinesterase isoforms in vitro: comparison with tacrine, donepezil, rivastigmine and physostigmine. *Eur. J. Pharmacol.* v.455, p.101–107, 2002.

ZHONG, N., RAMASWAMY, G., WEISGRABER, K.H. Apolipoprotein E4 domain interaction induces endoplasmic reticulum stress and impairs astrocyte function. *J. Biol. Chem.*, v.284(40), p.27273-27280, 2009.

ZHONG, N., SCEARCE-LEVIE, K., RAMASWAMY, G., WEISGRABER, K.H. Apolipoprotein E4 domain interaction results in synaptic deficits and cognitive impairment in mice. *Alzheimers Dement.* In press., 2010.

ZHOU, X.H., XING, S.F., LUO, X.M. Association of the neprilysin and apolipoprotein E gene polymorphisms with Alzheimer's disease in Xinjiang Uygur population. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, v.27(2), p.176-9, 2010.

ZHOU, Y., STOECKLI, E., CHEN, H., TESSIER-LAVIGNE, M. Squeezing axons out of the gray matter: a role for Slit and Semaphorin proteins from midline and ventral spinal cord. *Cell*, v.102, p.363-375, 2000.

APÊNDICE 1

Materiais e Métodos

Amostras

Foram avaliadas duas amostras, uma com 80 pacientes com doença de Alzheimer do Estado de São Paulo, fornecida pelo Ambulatório de Neurologia do Comportamento UNIFESP/EPM, e outra amostra do Estado do Paraná com 112 pacientes provenientes do ambulatório de Disfunção Cognitiva do setor de Neurologia de Hospital das Clínicas da UFPR (HC-UFPR) e do Ambulatório de Desordens da Memória e do Comportamento do Instituto Neurológico de Curitiba (INC).

Amostra do Estado de São Paulo.

Os pacientes com DA são de ambos os sexos que apresentaram no mínimo 3 anos de evolução da doença de Alzheimer e caracterizados pelos CDRs (coeficiente de demência) (Morris, 1993). O critério de diagnóstico utilizado foi NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's disease and Related Disorders Association*) (Mckhann et al., 1984; Howard et al., 2008). Tal critério foi estabelecido com base no DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), com adaptações para o diagnóstico PROVÁVEL de doença de Alzheimer.

Nesta amostra o grupo controle é proveniente de 80 idosos do Ambulatório de Geriatria da FAMEMA, amostras cedidas pelo Prof. Dr. Spencer Luiz Marques Payão.

Para estas amostras o DNA foi extraído de sangue total periférico obtido por meio de punção venosa, utilizando o kit QIAamp DNA Blood Midi Kit® - 51185 (QIAGEN), seguindo instruções do fornecedor.

Amostras do Estado do Paraná

Os pacientes do HC-UFPR e do INC são de ambos os sexos, caracterizados pelos CDRs (coeficiente de demência). O critério de diagnóstico é de acordo com o NINCDS-ADRDA com base no DSM-IV, com adaptações para o diagnóstico PROVÁVEL de doença de Alzheimer, diferindo dos critérios utilizados para a amostra 1 apenas em relação ao tempo de curso da doença, não havendo exclusão dos casos com menos de 3 anos de evolução.

Para os controles foram considerados os mesmos critérios da amostra de São Paulo, alterando apenas o índice de atividade de vida diária, o de Katz pelo PFEFFER. Os idosos controle são acompanhantes dos pacientes e idosos voluntários também avaliados segundo os critérios estabelecidos.

Genotipagem das variantes alélicas

A genotipagem foi realizada por PCR em tempo real para as variantes *-116A* (rs1803274; alelos, A/G), *539T* (rs1126680; alelos G/A: usual e variante K) do gene *BCHE*, do gene *APOE* (rs429358 alelos T/C e rs7412 alelos C/T sendo TT = *APOε2*, TC = *APOε3* e CC = *APOε4*), *GHRL (L72M)*, (rs696217), *MME* (rs13086740; alelos A/G e rs2016846; alelos G/T, ambos de região intrônica), e *SLITRK3*(rs3828419; alelos A/G e rs17449213; alelos A/G), utilizando Kits de Genotipagem TaqMan SNP (Applied Biosystems). Os kits consistem de 2 iniciadores não marcados e duas sondas (uma para cada alelo) marcadas com fluorescência VIC imitando coloração vermelha e FAM como a coloração verde.

Para a análise de cada um dos SNPs foi preparado um mix de reação para cada amostra, composto por 5,0 uL de TaqMan Universal PCR Master Mix, uma alíquota de 0,5 uL do Kit de Genotipagem TaqMan SNP específico e 2,5 uL de água ultra-pura. A este volume de mix para a reação é acrescentado 1 uL de DNA extraído por Salting-Out (Nonidet P-40 modificado por Lahiri e Numberger Jr., 1991). Os ciclos de amplificação foram determinados conforme os SNPs.

A escolha dos SNPs para os genes *MME* e *SLITRK3* foi realizada com auxílio dos programas HAPMAP e HAPLOVIEW buscando tags SNPs que englobam considerável parte da região gênica e com frequência superior a 5% em populações caucasóides.

Mensuração das concentrações protéicas

Os níveis da proteína ApoE no plasma das amostras de pacientes e controles foi medido por ELISA (*sandwich enzyme linked immunosorbent assay*) como descrito por Darreh-Shori *et al.*, (2009), utilizando o anticorpo de captura MAB A1.4Ab (Mouse anti-ApoE, monoclonal Ab, Sigma) e GAB947 Ab (Goatanti-ApoE, polyclonal, AB947, Chemincon Int.) após incubação das amostras de plasma diluídas 500X em tampão TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 0.9% NaCl; 0.05% Tween 20; todos da Sigma). O controle positivo utilizado foi ApoE humana purificada (ALP70-50UG, Merck).

O padrão de atividade e concentração protéica da AChE foram mensurados por ELISA Sanduíche seguindo a metodologia descrita por Darreh-Shori *et al*, (2008) com alteração apenas dos anticorpos utilizados para detecção de AChE à nível plasmático (não em líquido) diluídas 20X em tampão TBS-T^{0,2%}, conforme protocolo 1. Foram utilizados os anticorpos HR2 Ab (ABR) Mouse anti-AChE, monoclonal e C16 Ab, Goat anti-AChE, policlonal sc6430, seguindo as recomendações de diluição do fabricante (SCBT).

O nível total de proteína BChE no plasma foi medido por ELISA sanduíche, com modificações do protocolo descrito por Darreh-Shori *et al*, (2006). As amostras foram diluídas em 400X em tampão TBS-T^{0,2%} e como padrão para quantificação proteica foi utilizado Butirilcolinesterase parcialmente purificada do soro humano (c-9971, Sigma). Para quantificação do padrão protéico foram utilizados dois anticorpos seletivos para BChE humana: para captura o anticorpo monoclonal 3E8 Ab17246 (Mouse anti-BChE, Abcam) e pós incubação com antígeno o anticorpo policlonal Ab82307 (Rabbit anti-BChE, Abcam) conforme protocolo 2.

Protocolo 1.

Sandwich AChE ELISA - Protocol by Taher

1. **Coating of HR2 Ab (ABR) (Mouse anti-AChE, monoclonal Ab)** as capturing *Ab* (Dilution Factor, DF= 1/500), inmL Coating buffer (CB, Carbonate buf, pH 9.5).
2. Add 75µL/well and incubate **ON at 4°C** (kl:.....- kl:.....)
3. Wash 3x5min with TBS (w1....., w2....., w3.....)
4. **Blocking** by adding 125µL/well of a ^{5%}BSA–Coating buffer and Incubate at **RT for 1 hr** (kl:.....- kl:.....).
5. **Wash 3x5min** with TBS-T^{0.05%} (100µL/Well), (w1....., w2....., w3.....)
6. **Incubate with the Ag** (50µL/Well) i.e. the standards (S1-S8,: S1= pool plasma) and the diluted Plasma samples (20x in NDB) ~**2 hrs at RT** (kl:.....- kl:.....).
7. **Incubate with MMA** (25uL/well) and Read Kinetic the plate at 405 nm. The reading intervals should be 1/2min.

MMA

	Stock conc	Conc in Mix 3x	Volume
ATC	50mM (14.46mg/mL)	1.5mM	
DTNB	10mM (3.96mg/mL)	1.2mM	
EPP (BChE inhibitor)	10mM	0.3mM	
Nak-phosphate			
Total			

8. Incubate **ON at 4°C** (kl:.....- kl:.....)
9. **Wash 2x5min** with TBS-T^{0.05%} (100µL/Well), (w1....., w2.....)
10. **Incubate with C16 Ab (Goat anti-AChE, polyclonal, sc6430; St. Cruz biotec.) 1/300** in ^{0.5%}BSA-TBS-T^{0.05%}) **75 µl/well for 1 hr at RT** (kl:.....- kl:.....).
11. **Wash 3x5min** with TBS-T^{0.05%} (or PBS-T). (w1....., w2....., w3.....)
12. **Incubation with Anti-goat-AP (sc-2353):** DiluteµL of AP-Ab (DF= 1:1000) inmL ^{0.5%}BSA-TBS-T^{0.05%} buffer. Add 75 µL/Well and incubate at **RT for 1 hr** (kl:.....-kl:.....).
13. **Wash 2x5min** with TBS-T^{0.05%} (w1....., w2.....) and **1x** with **DEA** buffer. w3.....).
14. **Substrate Incubation** at **RT** for hrs (kl:.....- kl:.....) **75µL/Wells:**

Make a fresh solution by dissolvingmg of p-Nitrophenyl- $\text{Na}_2\text{-6H}_2\text{O}$ (**10mM**; **Mw=371.12**) inmL **DEA** (Diethanolamine; 1.0 M, pH 9.8) i.e. **3.7 mg/mL** of **DEA Buffer**.

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

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

17. **Wash 1x5min** with TBS- $\text{T}^{0.05\%}$ (100 μL /Well)

18. **Incubate with MMA** (75uL/well) and Read Kinetic the plate at 412 nm. The reading intervals should be 1/2min.

MMA

	Stock conc	Conc in Mix 1x	Volume
ATC	50mM (14.46mg/mL)	0.5mM	
DTNB	10mM (3.96mg/mL)	0.4mM	
Nak-phosphate			
Total			

Protocolo 2

Sandwich BChE ELISA Protocol

- Coating of 3E8 Ab17246 (Mouse anti-BChE, monoclonal; abcam)** as capturing *Ab* (Dilution Factor, DF= **1/1000**), by adding μ L inmL Coating buffer (CB, Carbonate buf, pH 9.5). (**Obs! If glycerol not added to stock Ab, it can be used as 1/2000**)
- Add 75 μ L/well and incubate **ON at 4°C** (kl:.....- kl:.....)
- Wash 3x5min with TBS (w1....., w2....., w3.....)
- Blocking** by adding 125 μ L/well of a 5% BSA–Coating buffer and Incubate at **RT** for **1 hr** (kl:.....- kl:.....).
- Wash 3x5min** with TBS-T^{0.05%} (100 μ L/Well), (w1....., w2....., w3.....)
- Incubate with the Ag** (50 μ L/Well) i.e. the standards (S1-S8;: S1= pool plasma) and the diluted Plasma samples (400x in NDB) **~2 hrs at RT** (kl:.....- kl:.....).
- ADD MMB1** (25uL/well) and Read Kinetic the plate at 405 nm. The reading intervals should be 1min.

MMB1

	Stock conc	Conc in Mix 3X	Volume
BTC	50mM; 15,87mg/mL	15mM	
DTNB	10mM; 3,96mg/mL	1.2mM	
BW (AChE inhibitor)	1mM	0.003mM	
Na K phosphate			
Total			

- Incubate ON at 4°C**
- Wash 3x5min** with TBS-T^{0.05%} (125 μ L/Well), (w1....., w2....., w3.....)
- Incubate with Ab82307 (Rabbit anti-BChE, polyclonal; abcam) 1/1000** in 0.5% BSA-TBS-T^{0.05%} **75 μ L/well for 1 hr at RT** (kl:.....- kl:.....). (**Obs! We diluted the stock with glycerol for 1.5X (200 μ L Gly to 400 μ L Ab stock), thus if glycerol not added to stock Ab, it can be used at 1/1500 dilution)**)
- Wash 3x5min** with TBS-T^{0.05%}. (w1....., w2....., w3.....)
- Incubation with Anti-Rabbit-AP (sc-2376)** dilute μ L of AP-Ab (DF= 1:1000) inmL 0.5% BSA-TBS-T^{0.05%} buffer. Add 75 μ L/Well and incubate at **RT for 1 hr** or **ON at 4 C** (kl:.....-kl:.....).

13. **Wash 2x5min** with **TBS-T^{0.05%}** (w1....., w2.....) and **1x** with **Tris Buffer**. w3.....).
14. **Substrate Incubation** at **RT** for hrs (kl.....- kl.....) **75µL/Wells:**
 Make a fresh solution by dissolvingmg of p-Nitrophenyl-Na₂-6H₂O (**10mM; Mw=371.12**) inmL **Tris Buffer** (15.76mg Tris in 500mL H₂O; 250 uL of MgCl₂.6 H₂O (1M); 100uL of NaN₃ 20% pH 9.0) i.e. **3.7 mg/mL of Tris Buffer**.
15. **Read Kinetic the plate at 405 nm:** Then read the plate by **Endpoint** immediately.
16. **Wash 2x5min** with TBS-T^{0.05%} (100µL/Well), (w1....., w2.....), put in refrigerator ON.
17. **Wash 1x5min** with TBS-T^{0.05%} (100µL/Well)
18. **Incubate with MMA** (75uL/well) and Read Kinetic the plate at 405 nm. The reading intervals should be 1/2min.

MMB2

	Stock conc	Conc in Mix 1X	Volume
BTC	50mM; 15,87mg/mL	5mM	
DTNB	10mM; 3,96mg/mL	0.4mM	
Na K phosphate			
Total			