Giselle Izzo

Avaliação de polimorfismos de DNA em genes
candidatos de pacientes com comprometimento
cognitivo leve e doença de Alzheimer.

Evaluation of DNA polymorphisms in candidate genes of
mild cognitive impairment and Alzheimer's disease
patients.

São Paulo

2010

Giselle Izzo

**Avaliação de polimorfismos de DNA em genes
candidatos de pacientes com comprometimento
cognitivo leve e doença de Alzheimer.**

**Evaluation of DNA polymorphisms in candidate genes of
mild cognitive impairment and Alzheimer's disease
patients.**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Mestre em
Ciências, na Área de Biologia (Genética).

Orientadora: Elida Paula Benquique Ojopi

**São Paulo
2010**

Ficha Catalográfica

Izzo, Giselle
Avaliação de polimorfismos de DNA em genes
candidatos de pacientes com
comprometimento cognitivo leve e doença de
Alzheimer
101 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

1. Doença de Alzheimer 2. Genética 3.
Polimorfismos de DNA
Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).

Orientador(a)

Dedicatória

À memória de
Maria Cecília Bernard.

Agradecimentos

Muitas pessoas me ajudaram a realizar este trabalho, e a elas tenho muito a agradecer.

Primeiramente agradeço à minha orientadora Elida, não apenas pela oportunidade de desenvolver parte de uma linha de pesquisa em seu grupo, mas por tudo que ela me ensinou – e foi muita coisa!

À minha família pelo apoio e incentivo, especialmente aos meus pais, Nazareth e Marcelo e ao meu irmão.

Ao meu namorado Roberto que me ajudou de tantas formas que seria difícil relatar todas. Agradeço pelo apoio, pelo carinho e pela pessoa linda que é.

Ao grupo do Dr. Paulo Bertolucci da UNIFESP pela colaboração com as amostras de DNA de pacientes de DA que nos foram concedidas.

Ao Professor Wagner Gattaz por ceder espaço em seu laboratório onde eu pude desenvolver o meu projeto e ao Professor Orestes Forlenza por abrir tão gentilmente as portas do seu ambulatório.

À todos os amigos do LIM 27 que me ajudaram não só com palavras nos momentos difíceis, mas até mesmo “pondo a mão na massa”! Sempre é complicado citar os nomes de todos, mas agradeço muito à querida dona Edivani, ao grupo de Neuroquímica - Leda, Helena, Carol, Patrícia, Vanessa, Aline, Nádia e Evelin – ao grupo clínico – Mariana, Luciana, Mônica, Paula, Ivan e Breno – e em especial ao grupo de Genética – Fábio, Helô, Johana, Camila Kukita e Taís (que já deixaram nosso laboratório), e um obrigada muito especial a Carol Prado, Julien e Maria Carolina.

Agradeço também à Maria Cecília, que não está mais conosco e deixou não só muita saudade, mas uma grande lição de vida.

Agradeço também aos órgãos financiadores: CNPq pela minha bolsa e pelo subsídio ao laboratório, assim como à FAPESP e ABADHS.

Índice

Introdução	(9)
A doença de Alzheimer	(9)
Comprometimento cognitivo leve	(9)
Genética e doença de Alzheimer	(10)
Estudos de associação	(11)
<i>Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)</i>	(12)
Seleção de genes candidatos	(13)
<i>O AlzGene Database</i>	(13)
Genes candidatos estudados	(14)
<i>APOE</i>	(14)
<i>ACE</i>	(16)
<i>APP</i>	(17)
<i>BDNF</i>	(18)
<i>CALHM1</i>	(19)
<i>CST3</i>	(19)
<i>GAB2</i>	(20)
<i>GAPDH</i>	(21)
<i>GSK3B</i>	(22)
<i>GSTP1</i>	(23)
<i>IL1A e IL1B</i>	(23)
<i>SORL1</i>	(24)
Justificativa	(26)

Objetivos	(26)
Material e Métodos	(27)
Casuística	(27)
Critério de seleção de genes candidatos	(28)
Critério de seleção de SNPs escolhidos	(28)
Extração de DNA de leucócitos de sangue periférico	(29)
Genotipagem por PCR em tempo real (ensaio <i>TaqMan</i> ®)	(30)
Genotipagem por seqüenciamento	(36)
Genotipagem por PCR direta	(40)
Análise estatística	(41)
Resultados	(43)
Genes e polimorfismos selecionados para análise	(43)
Resultados das análises de Equilíbrio de Hardy-Weinberg	(46)
Resultados das genotipagens realizadas	(48)
<i>APOE</i>	(48)
<i>ACE</i>	(49)
<i>APP</i>	(50)
<i>BDNF</i>	(51)
<i>CALHM1</i>	(52)
<i>CST3</i>	(53)
<i>GAB2</i>	(55)
<i>GAPDH</i>	(55)
<i>GSK3B</i>	(57)
<i>GSTP1</i>	(59)
<i>IL1A</i>	(61)

<i>IL1B</i>	(62)
<i>SORL1</i>	(64)
<i>APOE</i>	(68)
<i>GAB2</i>	(70)
<i>GSK3B</i>	(70)
<i>SORL1</i>	(71)
Discussão	(73)
Conclusões	(80)
Resumo	(81)
<i>Abstract</i>	(82)
Trabalhos Apresentados em Congressos	(83)
Apêndice: Lista de abreviações	(86)
Referências Bibliográficas	(88)

Introdução

A doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) (OMIM #104300) é a forma mais comum de demência na população com idade superior a 65 anos (Katzman, 1986). Com prevalência estimada em 7% na população brasileira (Herrera *et al.*, 1998, 2002), trata-se de uma doença neurodegenerativa de etiologia multifatorial, originada por uma soma de componentes genéticos e ambientais. Tem como característica fenotípica central, a perda severa e progressiva de funções cognitivas como memória, linguagem, localização espacial, atenção, dentre outras. Do ponto de vista anatomopatológico, a doença caracteriza-se por atrofia do córtex cerebral (resultante da acentuada morte de células neuronais) e drástica degeneração sináptica, sobretudo nas porções mediais dos lobos temporais e no córtex parietal.

Clinicamente, o diagnóstico da DA é feito a partir da caracterização do declínio cognitivo do paciente e da exclusão de outros fatores etiológicos. A análise de uma extensa bateria de testes neurocognitivos pode fornecer o diagnóstico daquilo que em vida é clinicamente considerado como um quadro “provável” ou “possível” de doença de Alzheimer, critério definido por exclusão de quaisquer outras formas de demência. O diagnóstico definitivo, porém, só pode ser feito *post-mortem*. O exame histológico revela a ocorrência de placas senis, formadas pela deposição excessiva do peptídeo tóxico beta amilóide e de emaranhados neurofibrilares, originados pela hiperfosforilação da proteína TAU nos tecidos acometidos, que compreendem particularmente a formação hipocampal e o neocórtex associativo.

Comprometimento Cognitivo Leve

A DA não costuma ter manifestação súbita nos pacientes. Antes que isso ocorra, é possível diagnosticar aquilo que alguns autores consideram ser um “estágio pré-clínico” da DA, denotado por “Comprometimento Cognitivo Leve” (CCL), do inglês, *Mild Cognitive Impairment (MCI)*, sendo uma condição caracterizada basicamente por queixas de memória corroboradas por um informante confiável e comprometimento demonstrável da memória ou outra função cognitiva. O paciente, porém, possui desempenho normal em suas atividades

cotidianas, tem funcionamento cognitivo global preservado e ausência de demência (Hansson *et al.*, 2006 de Leon & Klunk, 2006, Petersen *et al.*, 1999).

Os pacientes portadores de CCL constituem um grupo bastante heterogêneo e de certa forma, instável. Existem várias funções cognitivas diferentes que podem estar alteradas nos pacientes. Alguns indivíduos têm apenas a memória afetada, ao passo que outros podem apresentar comprometimento de outras funções como a linguagem e/ou localização espacial, por exemplo.

A prevalência de CCL em indivíduos com 60 anos ou mais é de 5%, mas eleva-se para 15% entre os idosos com idade maior ou igual a 75 anos. Assim como para as demências, a prevalência do CCL também aumenta com a idade e parece diminuir quanto mais elevada for a escolaridade. Os poucos estudos de incidência apontam para 15 casos novos anuais por 1.000 pessoas, para indivíduos com 65 anos ou mais e 54 casos novos por 1.000 pessoas acima dos 75 anos de idade (Manly *et al.*, 2008, Petersen *et al.*, 1999). Cerca de 80% dos pacientes portadores desse comprometimento cognitivo vêm a demenciar em algum momento de suas vidas (em geral, dentro de cinco a dez anos após o diagnóstico), muito embora alguns indivíduos possam voltar a serem considerados como controles em momento posterior, ou ainda, podem acabar nunca desenvolvendo uma demência propriamente dita, sendo este o motivo pelo qual alguns clínicos não concordam com a designação “estágio pré-clínico” para definir o termo CCL (Arnáiz & Almkvist, 2003).

Genética e doença de Alzheimer

Dentre os principais fatores de risco para doença de Alzheimer, podemos listar idade acima de 65 anos e sexo feminino (Farrer *et al.*, 1997). Além disso, sabemos que estudos com gêmeos sugerem a presença de fatores genéticos responsáveis pela DA (Gatz *et al.*, 2006), e estimam que a herdabilidade da doença seja de cerca de 75%. Sabemos também que existe uma forte correlação entre mutações autossômicas dominantes nos genes da proteína precursora do amiloide (*APP*) e presenilinas 1 e 2 (*PSEN1*; *PSEN2*) atuando de forma mendeliana em casos de DA familiar de início precoce, ao redor de 40 anos de idade. Entretanto a maior parte dos relatos literários informa que a percentagem global dos casos de DA familiar é de cerca de 1% apenas.

Para os casos esporádicos da doença, que são aqueles que por definição têm início após os 65 anos de idade (doença de Alzheimer de início tardio, ou LOAD – *Late Onset Alzheimer's Disease*), e que representam a vasta maioria dos casos, temos diversos estudos independentes que apontam apenas o gene da apolipoproteína E (APOE) como fator de risco para o desenvolvimento de DA em indivíduos portadores de sua variante alélica épsilon 4 (APOE*E4 – também denotada $\epsilon 4$). Ainda assim, cerca de 50% dos idosos portadores do alelo *E4 não desenvolvem a demência, fato que incentiva a busca por mais fatores genéticos de risco. Mais adiante no texto serão discutidas algumas das funções biológicas da apolipoproteína E, além de suas possíveis implicações para DA.

Muitos autores defendem a história familiar como sendo de extrema importância para o risco de desenvolvimento de DA, e é fato que a compreensão da genética envolvida na DA levou ao aumento no entendimento dessa neuropatologia em suas bases moleculares (Bertram & Tanzi, 2001, Myers & Goate, 2001, Selkoe & Podlinsky, 2002). A busca por fatores genéticos que influenciem na patogênese dessa doença levou à identificação de uma série de variações em determinados genes, comumente presentes na população em geral, mas que por muitas vezes podem não atuar diretamente como fatores etiológicos, mas sim como modificadores da suscetibilidade para determinada doença. Esses polimorfismos alterariam o risco para desenvolvimento da DA, mas não seriam necessários, nem mesmo suficientes para causar a doença (Seripa *et al.*, 2005).

Estudos de Associação

Classicamente, num estudo de associação comparam-se dois grupos fundamentalmente distintos (homens vs. mulheres, pacientes vs. controles, crianças vs. adultos, etc.), avaliando se determinadas variantes gênicas são mais freqüentes em um determinado grupo em detrimento de outro; os estudos caso/controle consistem no tipo mais amplo de estudos de associação, buscando caracterizar as contribuições genéticas para uma doença (Cardon & Bell, 2001). Presume-se que os alelos que predispuerem à doença deverão aparecer mais freqüentemente em pacientes comparados com controles, da mesma maneira que alelos que possam oferecer proteção contra o desenvolvimento de uma doença deverão aparecer com freqüência mais elevada em indivíduos controles em comparação a pacientes.

Mesmo existindo sistemas de genotipagem capazes de analisar milhares de marcadores genéticos de uma só vez, como é o caso daqueles baseados em *microarrays*, são muito comuns os estudos de associação que avaliam um número pequeno de polimorfismos, os quais se acreditam poder estar de alguma maneira associados com a doença em questão, seja por estarem presentes especificamente no gene responsável, por exemplo, em um promotor gênico, ou ainda num sítio crítico de *splicing*, etc. Ainda assim, apesar de um grande número de trabalhos independentes ter tentado encontrar associações em centenas e até milhares de pacientes, há um número relativamente pequeno de marcadores encontrados para doenças complexas até o momento (revisão em Weiner *et al.*, 2007), incluindo a doença de Alzheimer.

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

Polimorfismos são variações na sequência da molécula de DNA, podendo ser resumidamente, trocas, repetições, inserções ou deleções de uma ou mais bases nitrogenadas. A variação mais abundante no DNA é aquela que altera um único nucleotídeo, que é conhecida como variante do tipo SNP (sigla do inglês para *Single Nucleotide Polymorphism*). Os SNPs podem existir em qualquer região do genoma: introns, exons, regiões promotoras, intergênicas, etc., e sua presença pode levar ou não a alteração dos aminoácidos de uma proteína, a depender da posição onde ele se encontrar. Entretanto, sabe-se que por razões evolutivas os SNPs não estão distribuídos aleatoriamente ao longo do genoma (Kim *et al.*, 2007); em geral, eles ocorrem muito menos frequentemente em regiões codificadoras, do que em regiões não-codificadoras, (Li & Sadler, 1991, Nickerson *et al.*, 1998).

Até o mês de janeiro de 2010 foram reportados quase dezoito milhões de polimorfismos em genes humanos no *SNP database* (dbSNP) – um banco de dados curado, que foi incorporado ao NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) – dentre os quais, mais de nove milhões foram validados. Cada SNP depositado no dbSNP tem um registro particular indicado como “rs” (refSNP) seguido de um número que é designado de acordo com a ordem de deposição no banco. Por exemplo: o polimorfismo de registro “rs1005” foi o milésimo quinto a ser depositado nesse banco.

Para a DA, assim como para muitas outras doenças neuropsiquiátricas igualmente complexas, acredita-se que ocorra a interação de uma série de

variantes genéticas em locos distintos, principalmente as variantes do tipo SNP – que individualmente podem não ser deletérias, mas geram risco ao interagirem com outras variantes e também com fatores não genéticos (Hunter *et al.*, 2008; Hyman, 2008).

Seleção de genes candidatos

Fizemos uma revisão extensiva da literatura a respeito de genes de suscetibilidade para DA e selecionamos aqueles que possuíam variantes associadas com DA e que aparentemente desenvolvessem um papel importante em algumas das vias moleculares da DA, de acordo com resultados de trabalhos realizados por outros grupos de pesquisa, com impacto de destaque na literatura, e também aqueles relacionados com funções biológicas sabidamente alteradas na doença como, por exemplo, envolvimento na deposição do amiloide, hiperfosforilação da TAU, aumento do stress oxidativo, apoptose neuronal, etc. No início do planejamento deste trabalho foi realizada uma vasta revisão de artigos na área, o que nos levou a considerar se determinados genes que revelaram-se positivamente associados com a DA em populações de diferentes regiões globais, demonstrariam igualmente associação com a nossa população em estudo. Mais adiante, com a disponibilização de um banco de dados de meta-análise de estudos de associação em DA, denominado *AlzGene*, pareceu interessante considerar o conteúdo fornecido nesse banco para a escolha de novos genes candidatos.

O AlzGene Database

O *AlzGene* é um banco de dados criado em 2007 por pesquisadores da Universidade de Harvard com a intenção de reunir por meio de meta-análises, o maior número possível de resultados publicados em literatura indexada que contenham informações a respeito de associações entre polimorfismos de DNA e a doença de Alzheimer. Sendo parte de um projeto maior, denominado *Alzheimer Research Forum (AlzForum)*, é um banco atualizado semanalmente, que está disponível para acesso público no seguinte endereço eletrônico: <http://www.alzgene.org/>. O banco fornece uma listagem dos os genes mais fortemente associados com DA de início tardio de acordo com o risco relativo, ou *odds ratio* (RR ou OR) que os polimorfismos oferecem para a DA, dado esse

fornecido nos trabalhos analisados. Os dados apresentados no banco resumem as características-chave das coortes investigadas, assim como as distribuições genotípicas de casos e controles (Bertram *et al.*, 2007). Até o mês de dezembro de 2008, quando fizemos nossas buscas, haviam sido incluídos no *AlzGene* 59.129 trabalhos e 551 genes.

Genes candidatos estudados

A seguir listamos os genes selecionados para inclusão no presente trabalho e seus respectivos possíveis papéis biológicos na DA. Será dada ênfase maior àqueles genes cujas funções e papéis estão melhor estabelecidos e que conseqüentemente possuem maior número de trabalhos relacionados.

APOE

A apolipoproteína E é uma proteína multifuncional relacionada ao metabolismo e redistribuição de lipoproteínas e colesterol (revisão em Raber, 2008). Muito se conhece a respeito dos papéis biológicos de APOE. No encéfalo, essa proteína já foi implicada em diversos processos, como desenvolvimento, regeneração e proteção neuronal, mielinização e crescimento de neuritos (Mahley, 1988; Huang, 2006), de modo que a expressão desse gene parece aumentar quando algum desses processos é requerido (Ignatius *et al.*, 1986).

O gene *APOE* possui três principais isoformas que são codificadas por diferentes alelos: *E2, *E3 e *E4 (ou $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$), denotados como APOE*E2, APOE*E3 e APOE*E4, possibilitando a formação de seis genótipos distintos: E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4 e E4/E4. Cada proteína difere de acordo com os aminoácidos cisteína (Cys) ou arginina (Arg) nas posições 112 e 158 da proteína, o que confere diferenças metabólicas entre cada isoforma (Mahley & Huang, 1999).

O alelo *APOE**E3 codifica a forma ancestral da proteína; possui o códon 5'-TGC-3' na posição 112, que corresponde ao aminoácido cisteína (Cys), e o códon 5'-CGC-3' na posição 158 correspondendo ao aminoácido arginina (Arg). Uma troca de C por T na posição 158 da proteína faz a *APOE**E2 diferir de *E3 por codificar uma cisteína. Uma troca de T por C é responsável pela diferença entre as formas *E4 e *E3, por acrescentar Arg na posição 112 (Figura 1). Em diferentes

populações é possível observar uma freqüência elevada pra o alelo *E3, que varia de 48 a 89%, seguido pelo *E4 que aparece em 24 a 40% das populações estudadas, enquanto *E2 representa a forma mais rara encontrada. (revisão em Ojopi *et al.*, 2004). Os polimorfismos cadastrados no dbSNP correspondentes à essas alterações são respectivamente, rs429358 (C471T), e rs7412 (T609C).

Em diversos estudos realizados independentemente, notou-se que o alelo *E4 da APOE aparecia em freqüência elevada nos indivíduos portadores de DA, sendo que indivíduos com o alelo *E4 em homozigose têm um risco ainda maior para DA do que indivíduos com apenas um alelo *E4. Foi constatado que os indivíduos com genótipo E4/E4 desenvolvem os sintomas mais precocemente e têm um quadro clínico mais severo da doença (Corder *et al.*, 1993). Uma das explicações seria de que esse alelo facilitaria o aumento de deposição do peptídeo beta amilóide (A β), cujo acúmulo acarreta na formação de placas senis, além de estar relacionado com perda de plasticidade sináptica (Cedazo-Minguez & Cowburn, 2001). Além de diversas situações de prejuízo para as células neuronais como diminuição do crescimento de neuritos (Corder *et al.*, 1993). Experimentos in vivo demonstraram que camundongos mutantes portadores da variante APOE*E4 humana possuem pior desempenho cognitivo, o que é refletido por comprometimento na memória espacial dos animais (Raber *et al.*, 2000).

Por outro lado, o alelo *E2 parece exercer um efeito protetor contra o desenvolvimento de DA, por aparecer em frequências mais elevadas nos grupos controles em detrimento aos pacientes em diversos estudos (Benjamin *et al.*, 1994, Federoff, 2005, Smith *et al.*, 1994). Muitos pesquisadores, porém, acreditam que tal associação pode não ser tão sólida, visto que o alelo APOE*E2 é o mais raro dentre os três alelos de APOE e suas frequências são sempre pequenas, nas mais variadas populações. Dessa forma, alguns autores sugerem que a veracidade dessa informação pode estar comprometida devido ao baixo número amostral, levando a erros durante as análises estatísticas.

O alelo *E3 por sua vez, tem distribuição mais homogênea entre controles e pacientes, e parece desempenhar o papel *default* esperado para a proteína, não estando associado nem como fator de risco, nem de proteção para DA.

ACE

A enzima conversora da angiotensina I (angiotensin I converting enzyme – ACE) é por definição bioquímica, uma zinco-metalopeptidase. Algumas de suas funções conhecidas são conversão de angiotensina I em angiotensina II, um peptídeo vasoativo e estimulador de aldosterona, além de inativar a bradiquinina (peptídeo responsável pela diminuição de pressão arterial) (Erdös & Skidgel, 1987), tendo papel fundamental no sistema renina-angiotensina. Acredita-se que essa enzima possua muitas outras funções fisiológicas devido à sua ampla distribuição e especificidade enzimática (Ehlers & Riordan, 1989). A proteína ACE encontra-se ligada à membrana de células endoteliais, neuro-epiteliais e também circulando em fluidos biológicos como plasma e sêmen, por exemplo.

Diversos estudos associaram a presença ou ausência de um elemento *Alu* de 287pb no intron 16 desse gene com os níveis de enzima circulante e também com algumas patofisiologias, principalmente doenças cardiovasculares. O alelo de inserção desse polimorfismo foi associado com doença de Alzheimer em populações de origens europeia e asiática (Cheng *et al.*, 2002, Kehoe *et al.*, 1999, Kölsch *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2006). Aparentemente, indivíduos homozigotos para o alelo de inserção (genótipo I/I) possuem quantias menores de RNAm e também menos enzima no sangue do que indivíduos homozigotos para a deleção (genótipo D/D) (Rigat *et al.*, 1990, Suehiro *et al.*, 2004).

APP

Uma das primeiras características biológicas notadas em estudos histológicos com tecido cerebral de pacientes diagnosticados com DA foi a presença de placas senis estruturas, que são formadas pelo acúmulo de deposição do peptídeo A β , que por sua vez é produzido pela clivagem da proteína precursora do amiloide (APP – do inglês *amyloid precursor protein*) (Selkoe, 1991).

Figura 2: Clivagem proteolítica de APP e as vias amiloidogênica e não-amiloidogênica.

A proteólise da APP ocorre em duas vias distintas. A via não-amiloidogênica inclui hidrólise catalisada pela α -secretase, resultando na liberação de α -APPs solúveis, e a proteólise catalisada pela γ -secretase gera peptídeos P3 e P7. A segunda via, amiloidogênica, envolve a atividade de β -secretase que libera β -APPs e peptídeos P7 e A β após clivagem do fragmento C-terminal pela γ -secretase. (extraído de Nawrot, 2004).

O processamento desta proteína ocorre *in vivo* em duas vias distintas: a via convencional (*default*) não-amiloidogênica (observada com frequência em indivíduos cognitivamente saudáveis), e a via patológica amiloidogênica (Figura 2). Na primeira via, a APP é clivada pelas enzimas alfa e gama secretase, o que resulta na liberação de três moléculas menores: a proteína α -APP, solúvel e não-tóxica, e dois pequenos peptídeos (P3 e P7). A via amiloidogênica, por outro

lado, é caracterizada pelo processamento da APP pelas enzimas beta e gama secretase, produzindo β -APP, e os peptídeos P7 e beta-amilóide, sendo este uma molécula tóxica e insolúvel (Haass & Selkoe, 1993).

No início dos anos 90 surgiram os primeiros relatos de mutações no gene da APP fortemente associadas com casos de DA familiar (Goate *et al.*, 1991, Murrell *et al.*, 1991). Mais tarde, alguns trabalhos verificaram mutações na região promotora desse gene que possivelmente aumentam o risco para DA esporádica (Athán *et al.*, 2002, Guyant-Maréchal *et al.*, 2007, Lv *et al.*, 2008) incentivando-nos a incluir a análise de um polimorfismo de APP (rs463946) em nossa amostra.

BDNF

O gene *BDNF* (*brain-derived neurotrophic factor*) codifica uma proteína membro da família de fatores de crescimento de células nervosas. Induzido por neurônios corticais, ele é necessário para a sobrevivência de neurônios estriatais, e está envolvido com o desenvolvimento neuronal, manutenção e plasticidade sináptica (Huang & Reichardt, 2001). É expresso abundantemente no sistema nervoso central, especialmente no hipocampo, córtex cerebral e amígdalas (Ernfors *et al.*, 1991).

Diversos estudos mostraram alteração em sua expressão (redução, na maioria dos casos) em pacientes portadores dos mais diversos transtornos neuropsiquiátricos como: depressão, transtorno bipolar, esquizofrenia, doenças de Parkinson, Huntington e Alzheimer, dentre outros (Phillips *et al.*, 1991; Murer *et al.*, 2001; Gratacòs *et al.*, 2007); níveis elevados de BDNF costumam estar associados com melhor desempenho neuropsicológico (Laske *et al.*, 2006; Gunstad *et al.*, 2008).

O polimorfismo o qual mais freqüentemente são encontradas associações, e que tem o potencial de ser um dos responsáveis pelas variações dos níveis de expressão observados nos estudos é o rs6265 (Val66Met), e que foi escolhido para inclusão em nossas análises. Existem diversos relatos literários que mostram associação desse SNP com as diversas doenças psiquiátricas listadas acima (Guerini *et al.*, 2009, McIntosh *et al.*, 2007), incluindo casos de depressão relacionados à DA (Borrioni, *et al.*, 2009).

CALHM1

O gene *CALHM1* (calcium homeostasis modulator 1) codifica um glicoproteína transmembrana que controla as concentrações citosólicas de Ca^{2+} e também o processamento de beta-amilóide (Dreses-Werringloer *et al.*, 2008). Por ter sido recém descrito, ainda existem poucas informações a respeito das funções biológicas desenvolvidas por esse gene. Em meados de 2008, foi relatada uma associação significativa entre o SNP rs2986017 desse gene com o risco para doença de Alzheimer. Os autores do artigo (Dreses-Werringloer *et al.*, 2008) desenvolveram um trabalho extenso e bastante elaborado com pacientes caucasianos de origem europeia e norte-americana, no qual buscaram identificar possíveis associações de risco em genes expressos predominantemente nas regiões do SNC mais comumente afetadas nos pacientes de demência. Nesse caso, o hipocampo foi escolhido como região alvo e como resultado, um marcador no gene *CALHM1* demonstrou associação positiva com a doença, incitando-nos a investigá-lo em nossa amostra.

Devido ao grande impacto desse trabalho, durante os meses subseqüentes, outros grupos de pesquisa investigaram o poder de associação desse marcador em suas amostras, que apesar de grandes, não apresentaram associação positiva nas respectivas populações avaliadas (Beecham *et al.*, 2009, Minster *et al.*, 2009, Sleegers *et al.*, 2009, Tan *et al.*, 2009).

CST3

A proteína codificada pelo gene *CST3*, denominada Cistatina C (cystatin C) é uma inibidora proteinase de cisteínas (como, por exemplo, as catepsinas), sendo sintetizada no encéfalo por neurônios e astrócitos, e de distribuição somática virtualmente generalizada. Assim como outras inibidoras de cisteína-proteinases como as stefinas e quinínogênios (Vincent *et al.*, 2008), pertence a uma família gênica localizada no cromossomo 20, que abrange diversas seqüências semelhantes entre as cistatinas.

Níveis plasmáticos elevados de cistatina C são observados em resposta a determinadas lesões, cirurgias e isquemias. Em pacientes portadores de falha renal, é possível observar aumento da concentração dessa proteína, o que a tornou um biomarcador para doença renal. Além disso, a cistatina C encontra-se co-localizada a peptídeos A β nos depósitos de amilóide de pacientes com DA, e

também nas paredes de vasos sangüíneos. Uma mutação nesse gene causa uma angiopatia encefálica amiloidogênica, doença na qual o paciente sofre de hemorragias cerebrais recorrentes, resultando em morte precoce. Por esse motivo, a cistatina C também é considerada uma proteína amiloidogênica (Vattemi *et al.*, 2003).

Pacientes portadores de DA possuem níveis plasmáticos de cistatina mais baixos que controles (Chuo *et al.*, 2007) e aparentemente o contrário também é válido: pessoas com níveis elevados de cistatina parecem desenvolver alguma proteção contra Alzheimer. Sundelöf (2008) e colaboradores sugeriram que exames de medição dos níveis de CST3 possam vir a ter um papel como biomarcadores para a DA. Na última década, vários pesquisadores têm tentado encontrar associações entre polimorfismos de CST3 como fator de risco para DA, e um possível candidato seria o rs1064039 (Beyer *et al.*, 2001, Cathcart *et al.*, 2005, Crawford *et al.*, 2000, Chuo *et al.*, 2007).

GAB2

Até o presente momento, não se tem informações abundantes a respeito das funções de *GRB-associated Binding Protein 2* (GAB2). Sabemos que é uma proteína de suporte (*scaffolding*) em várias vias de sinalização de crescimento e sinalização celular, que junto com outras proteínas (incluindo proteínas da via patológica de DA como APP e PSEN1) é responsável pela fosforilação de algumas quinases como PI3K (*phosphoinositide-3-kinase*), MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), AKT (ou PKB – *protein kinase B*) e da GSK3B (*glycogen synthase kinase 3 beta*), enzima diretamente ligada ao processo de fosforilação da proteína TAU associada a microtúbulos que, em estado hiperfosforilado, produz a formação dos emaranhados neurofibrilares comumente encontrados em neurônios de pacientes com DA (Russo *et al.*, 2002; Nizzari *et al.*, 2007; Reiman *et al.*, 2007; Sleegers *et al.*, 2008). A redução da expressão de GAB2 com siRNA (small interfering RNA) *in vitro* demonstrou aumento da fosforilação da TAU (Reiman *et al.*, 2007), esclarecendo um possível papel desse gene em DA.

O trabalho publicado por Reiman *et al.* em 2007 foi o primeiro a demonstrar a associação de um SNP em GAB2 (rs2373115) com a DA em uma população holandesa e outra americana, com risco relativo aumentado quando combinado ao APOE*E4. Devido à alta repercussão desse trabalho, muitos outros grupos de pesquisa buscaram replicar independentemente esses resultados. Até o

presente momento, a maioria dos trabalhos encontrou associações com SNPs pertencentes ao mesmo bloco haplotípico que rs2373115, o que sugere que GAB2 seja um forte candidato como fator de risco para DA, principalmente em atuação sinérgica com o alelo APOE*E4 (Chapuis *et al.*, 2008, Ikram *et al.*, 2009, Nacmias *et al.*, 2009, Sleegers *et al.*, 2008, Schjeide *et al.*, 2009).

GAPDH

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH ou G3PDH) é uma enzima catalisadora da reação de glicólise que participa do processo celular de geração de energia, o que a torna indispensável para o funcionamento regular de todas as células somáticas. Por esse motivo, muitas vezes o gene GAPDH é escolhido como controle endógeno em trabalhos de quantificação relativa.

Além de seu papel metabólico, são atribuídas a ela importantes funções biológicas como transporte e fusão de membranas, reparo e replicação do DNA, manutenção e/ou proteção de telômeros, exportação do RNA nuclear e desencadeamento do processo apoptótico (Sirover *et al.*, 1999; Sundararaj *et al.*, 2004; Tarze *et al.*, 2007), além de ligar-se à APP (Schulze *et al.*, 1993), e ao peptídeo A β (Oyama *et al.*, 2000). Nos pacientes com DA e também em modelos animais para a doença, foi relatada diminuição de sua atividade glicolítica, o que poderia influenciar a progressão da patologia (Mazzola & Sirover, 2001; Shalova *et al.*, 2007). Alguns autores, porém, argumentam que os efeitos de *GAPDH* no desencadear da DA se de fato existirem, devem ser limitados (Lin *et al.*, 2006)

Dois polimorfismos em *GAPDH* foram designados como possíveis fatores de risco para DA: rs1060621 e rs3741916, sendo este último correlacionado ao grupo de indivíduos APOE*E4 negativos; por estas razões, esses polimorfismos foram incluídos em nossa análise.

GSK3B

As quinases da família GSK3 trabalham como mediadoras de uma série de vias de sinalização intracelular, e são agentes de fosforilação de uma série de proteínas, incluindo algumas de reconhecida relevância para DA como APP e TAU (Stambolic *et al.*, 1996).

O gene *GSK3* (Glycogen synthase kinase-3) apresenta duas isoformas principais codificadoras das variantes alfa (*GSK3A*) e beta (*GSK3B*), que apresentam pequenas diferenças biológicas relacionadas principalmente à função e localização celular (Hoshi *et al.*, 1996). Um evento de splicing alternativo com remoção do exon nove desse gene é responsável pela diferença entre as duas proteínas.

Apenas a isoforma *GSK3B* aparece associada com os mecanismos neuropatológicos observados em DA: sua forma ativa (não-fosforilada, ao contrário da maioria das proteínas) ajuda a desencadear a via de fosforilação da proteína TAU. Há evidências de taxas de expressão elevadas de *GSK3B* em pacientes com DA e em modelos animais para a doença (Hye *et al.*, 2005). Nosso grupo demonstrou recentemente que o íon lítio reduz a expressão de RNA mensageiro de *GSK3B*, o que o torna potencialmente capaz de se tornar agente de tratamento ou prevenção contra a DA (Mendes *et al.*, 2008).

Nos últimos três anos surgiram relatos de associações com SNPs em regiões intrônicas e promotoras de *GSK3B*, como fatores de risco para as doenças de Alzheimer e Parkinson (Kwok *et al.*, 2005; Mateo, 2006; Schaffer *et al.*, 2008). O SNP rs6438552 regula a seleção de sítios aceptores de splicing in vitro, e seu alelo T está associado com níveis elevados de transcritos de *GSK3B* por perderem os exons nove e onze. Essa condição está correlacionada com o aumento de fosforilação da proteína TAU (Mukai *et al.*, 2002), justificando sua escolha para ser avaliado como possível fator de risco para DA nesse trabalho.

GSTP1

As GSTs (*glutathione s-transferases*) são enzimas metabólicas que catalisam reações consideradas como detoxificantes, servindo para proteger as macromoléculas celulares contra danos em geral (revisão em Watson *et al.*, 1998). A enzima *GSTP1* (*glutathione s-transferase pi 1*) faz parte de um subgrupo de GSTs e apresenta capacidade de se ligar aos compostos eletrofílicos e produtos de estresse oxidativo e possivelmente metabolizá-los. Adicionalmente sabe-se que o cérebro é o órgão no qual *GSTP1* é mais frequentemente produzida, em particular na barreira hemato-encefálica, onde pode ser moduladora de potenciais neurotoxinas e produtos gerados pelo estresse oxidativo (Hayes & Strange, 2000).

Há relatos de atividade reduzida das GSTs em várias regiões cerebrais e no fluido ventricular de pacientes com DA (Lovell *et al.*, 1998). Altas taxas de expressão desse gene, por outro lado, mostraram-se envolvidas em diversos tipos de tumores.

Uma associação significativa foi encontrada por um grupo de pesquisadores italianos, com os polimorfismos rs1695 e rs1138272 conferindo risco elevado para DA (Bernardini *et al.*, 2005), e o polimorfismo rs1695 de *GSTP1* também mostrou associação significativa em um trabalho realizado por pesquisadores da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP (Pinhel *et al.*, 2008). Ambos os grupos observaram que o risco torna-se significativamente maior para os pacientes portadores do alelo *APOE**E4.

IL1A e IL1B

As interleucinas 1-alfa (*IL1A*) e 1-beta (*IL1B*) são citocinas consideradas mediadoras chave em processos inflamatórios, e pertencem à família das interleucinas 1 (*IL1*). São parcialmente homólogas, mas produzidas por genes diferentes que estão presentes num mesmo agrupamento gênico (*cluster*). Aparecem implicadas em processos como: inflamação, imunoregulação, neurodegeneração e neuro-regulação (Dinarello, 1996, Patel *et al.*, 2005; Rothwell & Luheshi, 2000).

É bem estabelecido que mecanismos relacionados à resposta inflamatória estejam associados com DA e podem ter envolvimento na patogênese da doença (Rogers *et al.*, 1996). Quanto a esse respeito, estudos epidemiológicos fornecem evidências indiretas, mostrando que o uso de medicamentos antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) está associado com início mais tardio e/ou progressão mais lenta dessa doença (Breitner *et al.*, 1994; Stewart *et al.*, 1997) Esses dados, no entanto, ainda são muito discutidos entre pesquisadores da área, de forma que não existe um consenso a respeito dos possíveis benefícios que os AINES poderiam exercer para a progressão da DA.

Nos últimos dez anos muitos autores têm reportado associações estatisticamente significativas entre polimorfismos em *IL1A* e *IL1B* com DA (Du *et al.*, 2000; Bosco *et al.*, 2004), tornando pertinente a inclusão da análise de SNPs desses genes em nosso trabalho, mesmo sabendo que alguns desses

polimorfismos tenham sido encontrados associados apenas com DA de início precoce (Grimaldi *et al.*, 2000; Rebeck, 2000).

SORL1

SORL1 [*sortilin-related receptor, L (DLR class) A repeats-containing*] é um gene acentuadamente expresso no cérebro, que codifica um receptor de seleção neuronal que dentre outras funções, protege a APP do processamento em A β , o principal componente das placas senis (Andersen *et al.*, 2005).

Foi proposto que a redução da expressão de *SORL1* notada em pacientes com DA pudesse ter um efeito causal na patogênese da doença (Scherzer *et al.*, 2004). Há evidências de que *SORL1* atue como fator de retenção da APP em compartimentos golgianos (Schmidt *et al.*, 2007), e que a redução de expressão desse gene em tecido cerebral deva ser responsável pelo direcionamento da APP para vias do endossomo tardio, o que a tornaria sujeita à clivagem pelas enzimas β e γ -secretase, culminando na formação do peptídeo A β (Rogaeva *et al.*, 2007).

No início de 2007 foi descrita pela primeira vez uma relação entre cinco SNPs de *SORL1*, distribuídos em dois blocos haplotípicos distintos desse mesmo gene, e o aumento do risco para DA em populações americanas, israelenses, caribenhas e do norte europeu (Rogaeva *et al.*, 2007); posteriormente foram encontradas replicações dessas associações por quatro outros grupos de pesquisa. É interessante observar que esses trabalhos testaram diferentes populações, incluindo caucasianos americanos, britânicos e belgas, hispânicos, chineses e afro-descendentes (Lee *et al.*, 2007; Li *et al.* 2007; Tan *et al.*, 2007; Bettens *et al.*, 2008). A figura 3 a seguir mostra um esquema da localização desses polimorfismos no gene *SORL1*

Figura 3: Mapa genômico de SORL1 mostrando a localização de alguns SNPs de SORL1 que foram estudados pelo grupo de Rogaeva *et al.*, 2007. As circunferências indicam os SNPs que foram incluídos para investigação em nosso trabalho. As barras verticais pretas representam os 48 exons desse gene. Esse gene pode ser dividido em dois blocos haplotípicos: um deles na porção mais próxima à extremidade 5' do gene, que se estende até a região próxima ao SNP 13 (rs2298813), e outra, mais próxima à extremidade 3', indo da região próxima ao SNP 14 (rs11600231) em diante. Extraído de: Rogaeva *et al.*, 2007

Justificativa

Tendo em vista a complexidade da doença de Alzheimer, a função importante de determinados genes em processos neuronais, a necessidade crescente de descoberta de possíveis fatores de risco para o desenvolvimento dessa neuropatologia, o papel dos SNPs na suscetibilidade a doenças complexas, e a escassez de estudos de associação para DA na população brasileira, justifica-se esse estudo.

Objetivos

Nesse estudo propusemos avaliar associações entre determinados polimorfismos de DNA em genes previamente relacionados como possíveis fatores de risco para DA em diferentes populações.

Caso fosse encontrada alguma associação positiva, propusemos também, incluir amostras de indivíduos portadores de CCL nas análises para aquelas variantes a fim de verificar se haveria aumento na taxa de conversão para DA nos indivíduos portadores da variação.

Objetivos específicos:

- Estudar as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos selecionados nos genes *APOE*, *ACE*, *APP*, *BDNF*, *CALHM1*, *CST3*, *GAB2*, *GAPDH*, *GSK3B*, *GSTP1*, *IL1A*, *IL1B*, *SORL1*, em pacientes com DA e controles idosos;
- Avaliar a possível associação entre os polimorfismos estudados e a DA.
- Investigar se a presença do alelo *APOE**E4 somada com os demais genótipos estudados modifica de alguma maneira o risco para DA;

Material e Métodos

Casuística

Utilizamos amostras de DNA genômico, obtidas a partir de leucócitos do sangue periférico de pacientes com DA, CCL e controles idosos, coletadas no Ambulatório de Geriatria Psiquiátrica do Instituto de Psiquiatria (IPq), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), ativo desde 2002, coordenado pelo Dr. Orestes Vicente Forlenza, pesquisador de nosso laboratório. Os pacientes ou seus responsáveis e os indivíduos do grupo controle foram informados sobre o protocolo de estudo, previamente aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (processo 1053/02 aprovado em 19/dez/2002) e somente participaram aqueles que concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Nossa amostra contou com 136 pacientes portadores de DA, sendo 44 homens e 92 mulheres (67,6%), 49 pacientes portadores de comprometimento cognitivo leve, com 14 homens e 35 mulheres (71,4%) e 84 controles idosos, dos quais 16 são homens e 68, mulheres (80,9%), representativa de uma amostra da população brasileira majoritariamente do estado de São Paulo. A média de idade foi $72 \pm 8,7$ (DP mínimo 63,2 / máximo 80,5) anos para pacientes de DA, $70 \pm 7,1$ (DP mínimo 62,9 / máximo 77,3) anos para pacientes portadores de CCL e $70,8 \pm 5,3$ (DP mínimo 65,5 / máximo 76,1) anos para os controles (Tabela 1). Os indivíduos participantes do projeto estão em segmento há muitos meses – alguns deles freqüentam nosso ambulatório há mais de cinco anos, sendo o tempo médio de acompanhamento próximo de quatro anos.

Tabela 1 - Médias de idade (anos) da amostra de 269 pacientes e controles.

	n	Média	DP	Mínimo	Máximo
Controles					
Feminino	68	70,4	4,7	65,7	75,1
Masculino	16	72,7	7,2	65,5	79,9
Pacientes DA					
Feminino	92	72	9,1	62,9	81,1
Masculino	44	71	8	63	79
Pacientes CCL					
Feminino	35	69,5	5,5	64	75
Masculino	14	71,7	10,4	61,3	81,5
Total	269				

Legenda: DP - desvio-padrão

O diagnóstico para DA foi feito de acordo com os critérios do NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*) (McKhann *et al.*, 1984). Os controles idosos ("controle-idoso") saudáveis foram recrutados junto a grupos específicos (ex. Universidade da Terceira Idade) ou acompanhantes não aparentados dos pacientes após avaliação neuropsicológica para garantir que não apresentassem evidências clínicas ou neuropsicológicas de comprometimento cognitivo, tanto primário como secundário a condições médicas ou psiquiátricas comórbidas, e que não apresentassem também, quaisquer anormalidades no desempenho de suas atividades diárias.

Crítérios de exclusão para participação foram: analfabetismo, disfunções auditivas graves e outras condições de saúde relevantes que pudessem afetar a cognição ou omitir a administração de testes neuropsicológicos. Pacientes com quadro grave de demência, doenças psiquiátricas concomitantes e evidências clínicas de doença cerebrovascular, foram igualmente excluídos.

Crítério de seleção dos genes candidatos

Em nosso trabalho, estabelecemos dois critérios de escolha de SNPs para estudo. Numa primeira etapa, revisamos trabalhos publicados em revistas com seletiva política editorial, e escolhemos genes que apontaram fortes evidências de associação de com DA, com riscos relativos para a doença maiores que 1,2 (intervalo de confiança de 95%) e valores de *p* preferencialmente menores que 0,01. Demos preferência a estudos que incluíram a análise dos polimorfismos de

APOE, e que observaram se havia risco aumentado de algum dos genótipos em função do alelo *APOE**E4

Posteriormente foram incluídas as meta-análises depositadas no banco de dados *AlzGene*, o que nos permitiu aumentar o número de genes (e conseqüentemente de SNPs) que viriam a ser analisados em nosso trabalho.

Critério de seleção dos SNPs escolhidos

Dentre as inúmeras associações positivas descritas pelo *AlzGene Database*, utilizamos os seguintes critérios de seleção para a inclusão de SNPs: iniciamos pela listagem dos 30 genes mais fortemente associados com DA em agosto de 2008 (lembrar que essa lista é atualizada semanalmente). Desses 30 genes, verificamos quantos grupos independentes de pesquisa encontraram associação positiva com DA, e consideramos incluir apenas os SNPs em genes que mostraram associação por pelo menos dois grupos de pesquisa diferentes e levando em consideração também a relação entre trabalhos que encontraram associações negativas vs. trabalhos que encontraram associações positivas – nos casos em que cerca de 70% ou mais dos trabalhos relatassem ausência de associação entre determinado gene e DA, este mesmo gene foi desconsiderado para inclusão em nosso estudo.

Outros critérios relevantes foram: o número amostral usado nos trabalhos originais; trabalhos com menos de 100 amostras foram desconsiderados; trabalhos publicados em revistas indexadas e com seletiva política editorial e o RR oferecido por aquele polimorfismo – também consideramos apenas SNPs com $RR > 1,2$ (I.C. 95%). De modo geral, utilizamos critérios semelhantes aos de seleção de variantes a partir da literatura revisada.

Extração de DNA de leucócitos de sangue periférico (a partir de sangue total)

Para a extração de DNA obtivemos 10 mL de sangue periférico de cada indivíduo e o armazenamos em tubo estéril com EDTA. O sangue foi tratado com bloodlysisbuffer e com nucleolysisbuffer, de acordo com protocolo já estabelecido em nosso laboratório. A seguir, adicionamos ao lisado celular 1% de SDS e 10 µg de proteinase K e o incubamos a 37°C por 12 horas. Adicionamos então 1mL de NaCl (6M) e, após etapas de centrifugação, adicionamos 2

volumes de etanol absoluto. O DNA foi isolado e diluído em TE -4 e quantificado com o uso de espectrofotômetro e sua qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% com tratamento com brometo de etídeo e visualização do gel em transluminador.

Genotipagem por PCR em tempo real (Ensaio TaqMan®)

A maior parte de nossas análises de genótipo foi feita pelo método de discriminação alélica no equipamento de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real, com a utilização de ensaios do tipo *TaqMan® SNP genotyping assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA). A técnica permite a análise de dois alelos variantes de um SNP em um determinado segmento de DNA.

Os ensaios (ou *assays*) consistem em um “mix” – um produto que dentre outros reagentes, contém um par de oligonucleotídeos e um par de sondas marcadas com fluoróforos específicos para cada alelo investigado. Os oligonucleotídeos são desenhados especialmente para a região próxima do polimorfismo a ser analisado e se hibridam à região complementar do DNA. Paralelamente as sondas hibridam de acordo com o alelo, e posteriormente sofrem clivagem como resultado da ação exonucleásica de enzima *Taq* polimerase durante o período de extensão, o que libera a fluorescência. A visualização gráfica dos resultados é dada pelo programa *ABI 7500 System SDS Software* que faz a correlação entre a fluorescência emitida com cada alelo em específico. Se a mesma fluorescência é liberada por ambas as fitas de DNA, o indivíduo é denominado homozigoto para o alelo X ou Y (a depender da fluorescência correspondente). A emissão simultânea de fluorescências diferentes implica indivíduo heterozigoto. Em nosso laboratório, utilizamos o equipamento *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA; Figura 4) para realizarmos as reações de PCR em tempo real.

Essa metodologia é relativamente simples, rápida e oferece resultados confiáveis e de especificidade elevada. Para os SNPs que foram selecionados para análise, buscamos ensaios *TaqMan®* que já foram funcionalmente testados por oferecerem melhor desempenho de resultados e custo mais acessível. Quando não encontramos ensaios dessa categoria para nossos SNPs, escolhemos por realizar as genotipagens pelo método de seqüenciamento. Analisamos por PCR em tempo real todos os polimorfismos de *APOE*, *GAB2*, *GAPDH*, *GSK3B*, *GSTP1*, *IL1A*, *IL1B* e *SORL1*, totalizando 16 SNPs.

Figura 4: Esquema ilustrando o mecanismo de hibridação das sondas do sistema TaqMan®. Cada sonda emite uma determinada fluorescência (VIC ou FAM), de acordo com o alelo identificado. A discriminação alélica é obtida por meio da hibridação seletiva das sondas. Adaptado de Product Bulletin TaqMan Genotyping Assays, 2008.

A seguir listamos as condições de reação e ciclagem utilizadas na genotipagem dos polimorfismos. Para cada um dos *assays*, ambas as condições foram bastante semelhantes, porém houve pequenas variações. Às condições de reação padrão, denominamos “Condição 1”, e para sua variantes, “Condição 2” e “Condição 3”. As condições padrão de ciclagem denominam-se “Condição A” e sua variante recebeu o nome de “Condição B”. No quadro 1 abaixo estão descritos os protocolos de cada condição, e em seguida, quais desses foram escolhidos ao final do processo de padronização do referido *assay*.

Condições de reação:

Condição 1	Condição 2
<ul style="list-style-type: none"> ✓ 1X <i>TaqMan</i>® SNP Genotyping Assay ✓ 1X <i>TaqMan</i>® Universal PCR Mastermix ✓ 5ng/μL DNA genômico ✓ H₂O q.s.p. 5μL (Volume total de reação = 5μL)	<ul style="list-style-type: none"> 1X <i>TaqMan</i>® SNP Genotyping Assay 1X <i>TaqMan</i>® Universal PCR Mastermix 10ng/μL DNA genômico H₂O q.s.p. 5μL (Volume total de reação = 5μL)

Condição 3
<ul style="list-style-type: none"> ✓ 1,6X <i>TaqMan</i>® SNP Genotyping Assay ✓ 1X <i>TaqMan</i>® Universal PCR Mastermix ✓ 5ng/μL DNA genômico ✓ 0,3M Betaína ✓ H₂O q.s.p. 5μL (Volume total de reação = 5μL)

Condições de ciclagem:

Condição A		Pre-read	Amplificação Passo 1	Amplificação Passo 2	Post-read
	Temperatura (°C)	60	95	92 60	60
	Tempo	30 segundos	10 minutos	15 segundos 1 minuto	30 segundos
	Número de ciclos	-	-	40	-
Condição B		Pre-read	Amplificação Passo 1	Amplificação Passo 2	Post-read
	Temperatura (°C)	60	95	92 58	60
	Tempo	30 segundos	10 minutos	15 segundos 1 minuto	30 segundos
	Número de ciclos	-	-	45	-

Quadro 1: Detalhamento e condições utilizadas para cada assay

Gene	refSNP/ SNPID	Código Assay (Assay ID)	Tipo do assay	Disponibilidade	Condição Reação	Condição Ciclagem
APOE	rs429358	C__3084793_20	Testado funcionalmente	<i>Made to order</i>	1	A
	rs7412	C__904973_10	Validado	<i>Made to order</i>	1	A
GAB2	rs2373115	C__12033202_10	Testado funcionalmente	<i>Made to order</i>	2	B

GAPDH	rs1060621	C___8921288_10	Testado funcionalmente	<i>Made to order</i>	1	A
	rs3741916	C___2655167_1_	Validado	<i>Made to order</i>	1	A
GSK3B	rs6438552	C___506087_10	Testado funcionalmente	<i>Made to order</i>	2	A
	rs334558	C___905680_10	Testado funcionalmente	<i>Made to order</i>	2	B
GSTP1	rs1138272	C___1049615_20	DME (Drug Metabolism Assay)	<i>Inventoried</i>	3	B
	rs1695	C___3237198_20	DME (Drug Metabolism Assay)	<i>Inventoried</i>	1	A
IL1A	rs1800587	C___9546481_20	Testado funcionalmente	<i>Made to order</i>	2	A
IL1B	rs3087258	C___15793122_10	Testado funcionalmente	<i>Made to order</i>	2	A
	rs1143634	C___9546517_10	Validado	<i>Made to order</i>	2	B
SORL1	rs689021	C___1379954_10	Validado	<i>Made to order</i>	2	B
	rs641120	C___1379945_10	Testado funcionalmente	<i>Made to order</i>	2	B
	rs2070045	C___25634796_10	Testado funcionalmente	<i>Made to order</i>	2	A
	rs3824968	C___25473831_10	Testado funcionalmente	<i>Made to order</i>	2	A

Tipo do assay – Validado: assay testado em quatro populações étnicas diferentes, com 45 indivíduos em cada população. As menores frequências alélicas são determinadas e publicadas, sendo que para validar o assay é necessário que a frequência do alelo raro deve ser de no mínimo 5% em uma população. **Testado Funcionalmente:** Os assays para estudos com humanos são testados funcionalmente. Esse teste consiste de 10 ou 20 amostras únicas de DNA, compreendendo uma população étnica mista com representação feminina e masculina. Os dados deste teste servem para garantir que os assays enviados atinjam apenas os critérios mínimos para funcionalidade. A frequência do alelo raro não é calculada devido à amostra utilizada ser pequena e mista. **Drug Metabolism Assay (DME):** Estes assays são testados e, quatro populações étnicas diferentes, com 45 indivíduos em cada população. Os dados de validação para populações Caucásicas e Afro-Americanas foram realizados em replicatas.

Disponibilidade – Inventoried: Assays previamente manufaturados que passaram pelas especificações de controle de qualidade e estão armazenados em inventário. **Made to order:** Esses assays são manufaturados no momento da encomenda. São despachados apenas os assays que passam pelas especificações de controle de qualidade.

Ao final do processo, para a determinação do genótipo de cada amostra, o software emite um gráfico no qual estão distribuídas as amostras em correspondência com a fluorescência emitida e lida pelo aparelho (Figura 6). Assim, de acordo com a posição da amostra no gráfico, é possível saber seu genótipo. Outra maneira de atribuímos o genótipo, é avaliando diretamente o padrão de fluorescência emitido durante a reação, como mostram as figuras 5 (a), (b) e (c). Cada alelo vem marcado de fábrica com um fluoróforo específico,

que é conhecido por nós. Dessa maneira, também é possível fazer a discriminação alélica de uma amostra observando as fluorescências emitidas.

Figura 5: Gráfico de discriminação alélica exibido pelo programa 7500 System Software. Inicialmente informamos ao software qual sonda é complementar a cada alelo polimórfico. No exemplo da figura acima, a sonda marcada com o fluoróforo FAM poderá hibridar apenas com o alelo G, ao passo que a sonda marcada com o fluoróforo VIC pode ser hibridada apenas com o alelo A do gene em questão. Dessa maneira, se o genótipo de um indivíduo for homozigoto GG, ocorrerá hibridação apenas da sonda marcada com FAM, e nesse gráfico, a amostra deverá posicionar-se mais proximamente ao eixo das ordenadas, pois este foi ajustado para interpretar comprimentos de onda correspondentes a tal fluoróforo. O mesmo é válido para o indivíduo homozigoto AA, porém nesse caso, apenas a sonda marcada com VIC deverá ser hibridada, e a amostra ficara posicionada mais próxima ao eixo das abscissas. Como podemos inferir, amostras de indivíduos heterozigotos AG serão hibridadas por ambas as sondas e no gráfico aparecerão posicionadas entre os dois eixos, na região central do gráfico.

(a)

Figura 6: Os gráficos acima ilustram a emissão de fluorescência por ciclo de amplificação individualmente para cada amostra. Por meio destes gráficos também é possível estabelecer o genótipo, fazendo a correspondência do alelo com a fluorescência. Nas três imagens, a linha vermelha representa o fluoróforo FAM, a verde, VIC, e a azul, o ROX, que funciona como medida basal de fluorescência, a partir da qual pode-se estabelecer relações comparativas. (a) Padrão gráfico de emissão de fluorescência para amostras de indivíduos heterozigotos: podemos observar que ambas as fluorescências foram emitidas, o que significa que houve hibridação concomitante das duas sondas, com conseqüente liberação de fluorescência durante o processo de extensão da enzima Taq ao longo dos ciclos de amplificação. Em (b) houve apenas emissão da fluorescência VIC, o que indica padrão de homozigose para o alelo complementar à sonda em questão. Como sabemos que essa sonda somente pode se ligar apenas ao alelo A, esse indivíduo possui genótipo AA, ao passo que em (c), o indivíduo é homozigoto GG por ter emitido durante o processo de amplificação apenas a fluorescência FAM, correlacionada ao alelo G.

Genotipagem por seqüenciamento

A técnica de seqüenciamento é de alta confiabilidade para análise de trocas de um par de bases. Consiste na realização de uma PCR cujos produtos terão incorporação gradual de nucleotídeos marcados com fluorescência, gerando fragmentos de tamanhos variados que posteriormente são lidos por um aparelho seqüenciador, o qual organiza os fragmentos por ordem crescente de tamanho. Em nosso laboratório utilizamos o aparelho *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems), que mede a fluorescência emitida por cada fragmento. Um programa próprio faz a correlação com a base nitrogenada correspondente à fluorescência medida pelo aparelho, e a organiza em forma de uma seqüência que é lida num gráfico denominado eletroferograma.

Essa metodologia apesar de levar mais tempo para emitir o resultado final do que o PCR em tempo real, e ser composta por muitas etapas, o que pode aumentar a dificuldade de padronização das reações para alguns SNPs, oferece custo mais acessível que a PCR em tempo real e apresenta especificidade elevada, sendo a melhor escolha na análise de SNPs novos. Foram genotipados por seqüenciamento os SNPs de *APP*, *BDNF*, *CALHM1* e *CST3*.

O processo de análise de genótipo por seqüenciamento envolve cinco passos principais, e as condições padronizadas para cada um deles foram:

Reação de PCR – Tampão 1x para PCR livre de magnésio, 2,25 mM de Cloreto de Magnésio, 0,125 mM de dinucleotídeos tri-fosfatados (dNTP), 0,2uM de oligonucleotídeo *forward*, 0,2uM de oligonucleotídeo *reverse*, 5% de DMSO (Dimethyl sulfoxide), 0,1uL de enzima Taq DNA polimerase 5U, e 5ng/uL de DNA genômico. O Volume final de reação foi de 10uL, completado com H₂O ultrapura. As reações foram levadas ao termociclador PTC-200 (MJ Research) obedecendo às seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial do DNA a 94°C por 5 minutos, seguido por 37 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos a 61°C por 40 segundos, elongação da Taq DNA polimerase a 72°C por 30 segundos. As etapas finais são 72°C por 5 minutos para alongamento final da Taq, e resfriamento da reação a 4 graus por tempo indeterminado.

As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR para genotipagem estão listadas na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2: Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados nas genotipagens por seqüenciamento

Gene	Forward	Reverse
APP	5'-GCAGCAGTCAGAGCACACTT-3'	5'-TCCTTGTATCCCCAGTGACC-3'
BDNF	5'-AAACATCCGAGGACAAGGTG-3'	5'-AGAAGAGGAGGCTCCAAAGG-3'
CALHM1	5'-AGTTCCTGCAGTCCAACCAG-3'	5'-AGGCACAGAGGAAGCATTTG-3'
CST3	5'-GCAGCGGGTCCTCTCTATC-3'	5'-GACGGCAAAGTCCAGTGC-3'

A fim de conferir se houve amplificação, os produtos obtidos são visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, e visualizados num aparelho transluminador (gabinete *ChemiiimagerTM 4000*, *Alpha Innotech*) emissor de radiação ultravioleta.

Reação de seqüenciamento – 1µL de BigDye® Terminator versão 3.1, 2µL de tampão (200mM de Tris-HCl pH 9.0; 5mM MgCl₂), 0,32µM de oligonucleotídeo forward ou reverse, 5% de DMSO, 1µL de produto de PCR, completando com H₂O ultrapura para um volume final de reação igual a 10µL.

Precipitação – as amostras produzidas no passo 2 passam por um processo de remoção de dideoxinucleotídeos inicialmente não incorporados e de precipitação de fragmentos de DNA com álcool isopropílico 75%, seguido por álcool etílico 70%. Depois, a amostra é ressuspensa em formamida, desnaturada a 95°C por 2 minutos e então colocada no gelo por 1 minuto, sofrendo choque térmico. A partir daqui as amostras encontram-se prontas para serem lidas pelo aparelho seqüenciador.

Eletroforese – realizamos as eletroforeses no equipamento *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) (Figura 4.A)

Análise dos eletroferogramas – realizada com auxílio dos softwares *Sequence Analysis Software* (*Blue Tractor Software, Inc.*), e *Finch TV* (*Geospiza, Inc.*). Nas figuras 7, 8, 9 e 10 abaixo temos ilustrações dos eletroferogramas obtidos para cada um dos polimorfismos analisados, para homozigotos e heterozigotos.

APP

(a)

BDNF

CALHM1

(a)

CST3

Genotipagem por PCR (Polymerase Chain Reaction) direta

De todos os polimorfismos avaliados nesse estudo, o rs1799752 do gene *ACE*, é o único que não representa um SNP propriamente dito, mas sim uma inserção ou deleção de elemento repetitivo do tipo Alu de 287 pares de bases. Dessa forma, optamos por fazer as genotipagens referentes a esse polimorfismo diretamente por PCR seguida de visualização em gel de agarose 2%. O protocolo da reação de PCR que foi utilizado é uma adaptação daquele estabelecido por Evans *et al.*, 1994 e modificado por Kölsch *et al.*, 2005. Para realizar a determinação dos genótipos, primeiramente, é necessário amplificar o fragmento de interesse. Para isso foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos: 5'-GAGAGCCACTCCCATCCTTTC-3' (*forward*) e 5'-GTGGCCATCACATTTCGTCAGA-3' (*reverse*). Também foi utilizado um oligonucleotídeo adicional que se liga especificamente ao fragmento de inserção, que dá origem a um produto específico 5'-GGATGGTCTCGATCTCCTGAC-3' (*forward*). Dessa maneira, o produto amplificado de indivíduos homozigotos para a deleção consiste num fragmento de 185pb; já indivíduos homozigotos para a inserção apresentam dois fragmentos: um com 210pb e outro com 475pb. Para indivíduos heterozigotos podemos esperar a formação dos três fragmentos.

Para a reação foram utilizadas as seguintes condições: tampão para PCR sem magnésio 1X, 0,125mM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 7% de dimetilsulfóxido (DMSO), 1,5mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 0,2μM de cada um dos três oligonucleotídeos, 0,05U/μL de enzima Taq Polimerase *Platinum (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia)*, 5ng/μL de DNA genômico, e H₂O q.s.p. 10μL (sendo o volume final de reação igual a 10μL).

As reações tiveram as seguintes condições de ciclagem: Etapa inicial de desnaturação das fitas de DNA a 94°C durante três minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridação dos oligonucleotídeos a 65°C por 20 segundos, e extensão de enzima a 72°C durante 30 segundos. A etapa final consiste em extensão da enzima a 72°C por 5 minutos, e após esse processo a reação permanece refrigerada em temperatura igual a 4°C. Os produtos amplificados podem, a partir desse momento, ser analisados em gel de agarose 2% corado com 3x10⁻⁷ mg/mL de brometo de etídio. A visualização dos fragmentos amplificados foi obtida com auxílio do aparelho transluminador *Multimage™ Light Cabinet* e do programa *Chemilmager v5.5 (Alpha Innotech Corporation, ambos)*. A seguir temos a imagem de um gel de agarose 2%, no qual é possível observar os padrões de

banda relativos aos três genótipos possíveis para o polimorfismo rs1799752 (Figura 11).

Análise estatística

Para análise estatística de nossos resultados, adotamos que os grupos avaliados (pacientes *versus* controles) são independentes. Os itens de cada grupo foram selecionados aleatoriamente, as observações são dadas em freqüências ou contagens e cada observação pertence a uma e somente uma categoria. Para estabelecer se existem diferenças entre os grupos controle idoso (controle), e doença de Alzheimer (paciente), optamos por utilizar o teste do qui-quadrado, para tabelas que compreendessem mais de cinco amostras em cada célula. Simbolizado por χ^2 , o teste tem por princípio básico a comparação de proporções, permitindo afirmar se há divergências entre as freqüências observadas e esperadas para certo evento.

Evidentemente, pode-se dizer que dois grupos se comportam de forma semelhante se as diferenças entre as freqüências observadas e as esperadas em cada categoria forem muito pequenas, próximas à zero. Quanto menor a diferença entre os grupos, mais próximo de 1 será o valor de p, gerado no teste. Consideramos como estatisticamente significativos, valores de p menores que 0,05.

Utilizamos o teste qui-quadrado de Pearson para casos em que nenhuma das freqüências esperadas apresentasse valor menor que 5. Quando as freqüências

esperadas mostraram-se menores que 5, utilizamos o teste exato de Fisher para tabelas 2x2 e correção de continuidade para tabelas maiores que 2x2. Para o cálculo de risco relativo (RR) em tabelas maiores que 2x2, utilizamos partição do teste qui-quadrado com correção de Bonferroni, a fim de verificar quais as freqüências genotípicas responsáveis pelos riscos observados (quando aplicável). Os cálculos foram realizados com auxílio dos programas SPSS 14.0 (2010 SPSS Inc., an IBM Company. Chicago, Illinois, EUA) e Microsoft Office Excel 2007 (2007 Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EUA)

Para determinar o equilíbrio de Hardy-Weinberg em nossa população, realizamos este teste para cada um dos grupos e cada um dos genes, utilizando-se o teste χ^2 do programa The R Project for Statistical Computing (Viena, Austria, 2009).

Resultados

Genes e polimorfismos selecionados para análise

De acordo com os critérios estabelecidos para a escolha dos genes incluídos no trabalho, nossa busca resultou na seleção de 13 genes (Quadro 2) e 21 polimorfismos (Quadro 3), sendo: 1 em *ACE*, 2 em *APOE*, 1 em *APP*, 1 em *BDNF*, 1 em *CALHM1*, 1 em *CST3*, 1 em *GAB2*, 2 em *GAPDH*, 2 em *GSK3B*, 2 em *GSTP1*, 1 em *IL1A*, 2 em *IL1B*, e 4 em *SORL1*. A tabela 1 mostra informações descritivas dos genes selecionados, tais como: nome oficial, números de acesso, resumo das suas características e funções principais.

O número de pacientes portadores de DA analisado foi maior que o proposto no momento inicial do trabalho (100 indivíduos), porém não conseguimos atingir a meta proposta para amostras de controles idosos não demenciados (também de 100 indivíduos).

Quadro 2: Genes selecionados como potencialmente associados com DA.				
Gene	Nome Oficial	Números de acesso	Resumo	Funções (Ontologia gênica)
<i>ACE</i>	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1	GeneID: 1636 NM_000789.2 Localização: 17q23.3	Codifica uma enzima envolvida na conversão de angiotensina I na forma ativa angiotensina II.	Ligação com íons cloreto Ligação com drogas Ligação com íons metálicos Atividade peptidase
<i>APOE</i>	apolipoprotein E	GeneID: 348 NM_000041.2 Localização: 19q13.2	Essencial para o catabolismo normal de lipoproteínas ricas em triglicerídeos.	Atividade antioxidante Ligação com receptores Ligação com Aβ Transporte de colesterol Ligação com fosfolípidos Ligação com a Tau
<i>APP</i>	amyloid precursor protein	GeneID: 351 NM_000484.2 Localização: 21q21.2; 21q21.3	Esse gene codifica um receptor de superfície celular e uma proteína precursora transmembrânica que é clivada por secretases formando uma série de peptídeos.	Ligação com receptor de acetilcolina Ligação com metálicos Ligação com heparina
<i>BDNF</i>	brain-derived neurotrophic factor	GeneID: 627	Membro da família proteica de crescimento	Atividade de fator de crescimento

		NM_001709.3 Localização: 11p13	de nervos, é necessário para a sobrevivência de neurônios estriatais.	
CALHM1	calcium homeostasis modulator 1	GeneID: 255022 NM_001001412.3 Localização: 10q24.33	Canal cerebral de cálcio que controla o processamento de APP.	Atividade de canal de cálcio Ligação com íons cálcio Ligação com proteínas idênticas
CST3	cystatin C	GeneID: 1471 NM_000099.2 Localização: 20p11.21	Codifica o inibidor de cisteína-proteases extracelular mais abundante.	Ligação com Aβ Atividade inibitória de cisteína-protease Ligação com proteases
GAB2	GRB2-associated binding protein 2	GeneID: 9846 NM_012296.2 Localização: 11q14.1	Atua como adaptador para a transmissão de vários sinais em resposta a estímulo por citocinas e receptores de fatores de crescimento.	Dados não disponíveis
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GeneID:2597 NM_002046.3 Localização: 12p13	Catalisadora da reação de fosforilação oxidativa.	Ligação com o NAD Atividade Catalítica Atividade oxidoreductase Ligação com proteínas
GSK3B	glycogen synthase kinase 3 beta	GeneID: 2932 NM_002093.2 Localização: 3q13.3	Está envolvida no metabolismo energético, desenvolvimento neuronal e formação de padrões corpóreos.	Ligação com ATP Ligação com nucleotídeos Ligação com p53 Atividade Transferase Atividade de quinase da Tau
GSTP1	glutathione S-transferase pi 1	GeneID: 2950 NM_000852.3 Localização: 11q13	Papel importante na detoxificação celular.	Ligação com proteínas Atividade transferase
IL1A	interleukin 1, alpha	GeneID: 3552 NM_000575.3 Localização: 2q14	Citocina pleiotrópica envolvida com várias respostas imunes, processos inflamatórios e hematopoese.	Ligação com o receptor IL1 Ligação com proteínas Atividade de transdução de sinais
IL1B	interleukin 1, beta	GeneID: 3553 NM_000576.2	Envolvida em uma vasta gama de processos celulares incluindo	Ligação com o receptor IL1 Ligação com

		Localização: 2q14	proliferação e diferenciação celular e apoptose.	proteínas e Atividade de transdução de sinais
SORL1	sortilin-related receptor, class A repeats-containing	GeneID: 6653 NM_003105.4 Localização: 11q23.2-q24.2	Gene altamente expresso no SNC	Ligação a íons cobre Atividade carreadora de elétrons Atividade transportadora de lipídeos Ligação com LDL Atividade de receptor transmembrana

No Quadro 3, temos os dados de identificação dos SNPs no dbSNP, designação dos alelos polimórficos e aminoácidos modificados (quando aplicável).

Quadro 3: Informações sobre os polimorfismos selecionados no estudo.			
Gene	rs# (dbSNP)	Alteração alélica	Aminoácido modificado
ACE	1799752	Inserção ou deleção de elemento Alu de 287pb	Não se aplica (íntron)
APOE	429358	C471T	Arg130Cys
APOE	7412	C609T	Arg176Cys
APP	463946	-3102 G/C	Não se aplica (promotor)
BDNF	6265	G483A	Val66Met
CALHM1	2986017	C394T	Pro86Leu
CST3	1064039	A148G	Ala25Thr
GAB2	2373115	G/A	Não se aplica (íntron)
GAPDH	1060621	A/C	Não se aplica (íntron)
GAPDH	3741916	C944G	Ser140Ter
GSK3B	334558	A/G	Não se aplica (promotor)
GSK3B	6438552	A/G	Não se aplica (íntron)
GSTP1	1138272	C370T	Ala114Val
GSTP1	1695	A342G	Ile105Val
IL1A	1800587	C/T	Não se aplica (5'UTR)
IL1B	3087258	C/T	Não se aplica (promotor)
IL1B	1143634	T402C	Phe402Phe
SORL1	689021	C/T	Não se aplica (íntron)
SORL1	641120	C/T	Não se aplica (íntron)
SORL1	2070045	G3682T	Ser3641Ser
SORL1	3824968	A4873T	Ala4832Ala

Resultados das análises de Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Após analisarmos cada um dos grupos para cada um dos polimorfismos estudados, obtivemos os resultados que serão exibidos a seguir. Valores de $p > 0,05$ obtidos no teste qui-quadrado indicam que determinado grupo encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE)

Encontram-se em HWE os grupos:

-Controle e DA para o polimorfismo *ACE* rs1799752 ($p=0,268$ e $0,395$, respectivamente)

-Controle e DA para o polimorfismo *BDNF* rs6265 ($p=0,178$ e $p=0,439$, respectivamente)

-Controle e DA para o polimorfismo *CALHM1* rs2986017 ($p=0,157$ e $p=0,383$, respectivamente)

-Controle e DA para o polimorfismo *CST3* rs1064039 ($p=0,058$ e $p=0,248$, respectivamente)

-CCL, Controle e DA para o polimorfismo *GAB2* rs2373115 ($p=0,771$, $p=0,057$ e $p=0,278$, respectivamente)

-Controle e DA para o polimorfismo *GAPDH* rs1060621 ($p=0,952$ e $p=0,862$, respectivamente)

-Controle e DA para o polimorfismo *GAPDH* rs3741916 ($p=0,826$ e $p=0,260$, respectivamente)

-Controle para o polimorfismo *GSK3B* rs334558 ($p=0,467$)

-CCL e DA para o polimorfismo *GSK3B* rs6438552 ($p=0,132$ e $p=0,398$, respectivamente)

-Controle e DA para o polimorfismo *GSTP1* rs1138272 ($p=0,227$ e $p=0,923$, respectivamente)

-Controle e DA para o polimorfismo *GSTP1* rs1695 ($p=0,671$ e $p=0,807$, respectivamente)

-Controle e DA para o polimorfismo *IL1B* rs1143634 ($p=0,932$ e $p=0,160$, respectivamente)

-DA para o polimorfismo *SORL1* rs641120 ($p=0,211$)

-Controle e DA para o polimorfismo *SORL1* rs689021 ($p=0,502$ e $p=0,157$, respectivamente)

-Controle para o polimorfismo *SORL1* rs2070045 ($p=0,796$)

-Controle para o polimorfismo *SORL1* rs3824968 ($p=0,221$)

Não encontram-se em HWE os grupos:

-CCL para o polimorfismo *BDNF* rs6265 ($p=0,016$)

-DA para o polimorfismo *GSK3B* rs334558 ($p=0,032$)

-Controle para o polimorfismo *GSK3B* rs6438552 ($p=0,031$)

-Controle e DA para o polimorfismo *IL1A* rs1800587 ($p<0,01$ para ambos os grupos)

-Controle para o polimorfismo *SORL1* rs641120 ($p=0,028$)

-DA para o polimorfismo *SORL1* rs2070045 ($p=0,037$)

-DA para o polimorfismo *SORL1* rs3824968 ($p=0,022$)

Resultados das genotipagens realizadas

No total, foram realizadas 4273 reações de genotipagem, sendo que destas, 2562 foram em indivíduos portadores de DA, 1537 em indivíduos controles e 174 em portadores de CCL, totalizando análise de 21 polimorfismos.

A seguir, listamos os detalhes das frequências alélicas e genotípicas obtidas e que foram agrupadas de acordo com os genes. Primeiramente serão descritos os resultados obtidos para as análises de associação direta para risco de DA. Ou seja, investigamos se algum dos genótipos de cada um dos polimorfismos incluídos poderia ser considerado fator de risco ou de proteção para DA de acordo com o valor de p obtido no teste qui-quadrado. Logo em seguida, serão apresentados os resultados das análises que foram realizadas mesmo para os polimorfismos que apresentaram resultados negativos nos cálculos de associação de risco para a doença, de modo a investigar se algum dos genótipos

poderia aumentar o risco para DA, caso o indivíduo já seja portador de ao menos um alelo APOE*E4, ou então se algum dos genótipos poderia oferecer proteção contra a doença, caso o indivíduo não possua cópias deste alelo.

APOE

Genotipamos 83 controles idosos e 135 pacientes com DA para os dois polimorfismos de *APOE*. A Tabela 2 exibe informações detalhadas a respeito das freqüências genotípicas obtidas. Nossos resultados mostraram diferenças significativas quando comparamos essas freqüências entre os dois grupos ($p < 0,0001$).

A freqüência do alelo APOE*E2 foi mais alta no grupo controle em relação ao grupo DA, o que condiz com outros dados literários. Ao observarmos a freqüência do alelo APOE*E4, é possível notar uma diferença substancial na comparação DAs *versus* controles: este alelo aparece em 11% dos controles e em 29% dos pacientes com DA, ou seja, o alelo é quase 3 vezes mais freqüente em DAs do que em controles, corroborando inúmeros outros dados literários que apontam esse alelo como fator genético de risco, sendo que dentre os 83 indivíduos controles testados, apenas um deles apresentou o genótipo E4/E4.

Por fim, temos o alelo APOE*E3 com freqüências predominantes em nossa população, assim como na maioria das demais populações já avaliadas. Podemos dizer que ele distribuiu-se de forma mais homogênea entre os dois grupos. Na Tabela 3 abaixo estão sendo exibidos os resultados de freqüências genotípicas obtidas para *APOE* (constituído dos polimorfismos rs429358 e rs7412), e na Tabela 4, as freqüências dos alelos APOE*E2, E3 e E4 entre os dois grupos testados, além de uma exibição gráfica dessas freqüências.

Tabela 3: Freqüências genotípicas observadas para APOE

	Genótipos <i>APOE</i>
--	------------------------------

Grupo	E2/E2	E2/E3	E2/E4	E3/E3	E3/E4	E4/E4	Total
Controle	0	11 13%	0	54 65%	17 21%	1 1%	83 100%
DA	2 1,5%	2 1,5%	3 2%	66 49%	49 36%	13 10%	135 100%
Total	2	13	3	120	66	14	218

Resultados obtidos para as genotipagens de APOE em amostras de controles idosos e pacientes. Distribuição dos genótipos das amostras e percentagens para cada genótipo para os polimorfismos rs429358 e rs7412 de APOE ($p < 0,0001$).

Tabela 4: Frequências alélicas obtidas para APOE

Grupo	Alelos APOE			Total
	E2	E3	E4	
Controle	11 7%	136 82%	19 11%	166 100%
DA	9 3%	183 68%	78 29%	270 100%
Total	20	319	97	436

A tabela lista os valores de frequências alélicas obtidas para APOE em nossa casuística. Na coluna da esquerda temos uma visualização gráfica com as percentagens dos alelos e sua distribuição entre os grupos controle e DA. Observar a frequência elevada do alelo APOE*E4 no grupo DA.

Legenda: *** $p < 0,0001$.

ACE

Analizamos 133 pacientes e 80 controles e seus genótipos para a variante rs1799752 do gene *ACE* e não pudemos inferir que nenhum dos genótipos estivesse diretamente associado como fator de risco para DA ($p = 0,135$). As frequências genotípicas obtidas estão listadas na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5: Frequências genotípicas obtidas para ACE

Grupo	Genótipos ACE rs1799752 (In/Del)	Total
		60

	D/D	I/D	I/I	
Controle	24 30,0%	35 43,8%	21 26,3%	80 100%
DA	30 22,6%	77 57,9%	26 19,5%	133 100%
Total	54	112	47	213

Valores e visualização gráfica das freqüências genotípicas encontrados para o polimorfismo rs1799752 de *ACE*. Não houve diferenças significativas na comparação das freqüências entre os dois grupos ($p=0,135$).

Apesar de nenhum dos genótipos da variante rs1799752 de *ACE* poder ter sido considerado fator de risco para DA, o genótipo heterozigoto I/D em ação sinérgica com ao menos um alelo APOE*E4 eleva o risco para DA em 3,1 vezes ($RR=3,123$; IC 95% 1,295-7,53; $p=0,013$). O detalhamento deste resultado encontra-se listado na Tabela 6 abaixo.

Tabela 6: Avaliação de suscetibilidade ou proteção para doença de Alzheimer na presença (+) de ao menos um alelo APOE*E4 ou na ausência (-) deste alelo para a variante rs1799752

ACE

SNP	Genótipo	APOE*E4	Controles (%)	Pacientes (%)	Valor de p	RR (IC 95%)
rs1799752	D/D	(-)	19 (54)	16 (46)	0,084	X
		(+)	5 (26)	14 (74)		
	I/D	(-)	26 (41)	37 (59)	0,013	3,123 (1,3 – 7,5)
		(+)	9 (18)	40 (82)		
	I/I	(-)	16 (52)	15 (48)	0,202	X
		(+)	4 (29)	10 (71)		

As análises estatísticas nos permitiram inferir que o genótipo I/D transforma-se significativamente num fator de risco para a DA quando na presença de ao menos um alelo APOE*E4.

Legenda: X - condição não se aplica.

APP

Realizamos 22 reações de genotipagem em controles idosos e 69 em pacientes para o polimorfismo rs463946 na região promotora do gene *APP*. Resultados preliminares indicaram ausência de associação com a doença ($p=0,706$). Por este motivo, analisamos apenas cerca de 50% das amostras. A tabela com as distribuições genotípicas obtidas entre os grupos é exibida em seqüência (Tabela 7).

Tabela 7: Freqüências genotípicas obtidas para *APP*

Grupo	Genótipos <i>APP</i> rs463946	Total	100
-------	----------------------------------	-------	-----

	CC	CG	GG	
Controle	0	3 13,6%	19 86,4%	22 100%
DA	2 2,9%	8 11,6%	59 85,5%	69 100%
Total	2	11	78	91

Resultados obtidos para as genotipagens de *APP* em amostras de controles idosos e pacientes. A distribuição dos genótipos não divergiu significativamente entre os grupos testados ($P=0,706$). À esquerda temos o gráfico no qual é possível visualizar as distribuições genotípicas.

Para a variante rs463946 na região promotora do gene *APP*, a análise estatística sugere que aqueles indivíduos que possuam ao menos uma cópia de alelo APOE*E4 e ao mesmo tempo sejam portadores do genótipo GG, apresentem risco substancialmente aumentado para a doença ($RR=9,411$; IC 95% 1,994-44,414; $p=0,001$). A Tabela 8 a seguir apresenta o detalhamento desses resultados.

Tabela 8: Avaliação de suscetibilidade ou proteção para doença de Alzheimer na presença (+) de ao menos um alelo APOE*E4 ou na ausência (-) deste alelo para a variante rs463946

<i>APP</i>						
SNP	Genótipo	APOE*E4	Controles (%)	Pacientes (%)	Valor de p	RR (IC 95%)
rs463946	CC	(-)	0	1 (100)	#	X
		(+)	0	1 (100)		
	CG	(-)	1 (17)	5 (83)	0,545	X
		(+)	2 (40)	3 (60)		
	GG	(-)	17 (38)	28 (62)	0,001	9,411 (1,9 – 44,4)
		(+)	2 (6)	31 (94)		

O genótipo homozigoto GG aqui aparece como fator de risco para DA para aqueles indivíduos que possuem ao menos uma cópia do alelo APOE*E4.

Legenda: # - Número amostral insuficiente para cálculo estatístico;

X - condição não se aplica.

BDNF

As 73 genotipagens de controles idosos e 127 de pacientes não evidenciaram diferenças significativas após a realização do teste qui-quadrado ($p=0,241$), o que indica que o polimorfismo rs6265 isoladamente não representa fator de risco para nossa população. Na tabela a seguir é possível observar a distribuição genotípica entre os grupos (Tabela 9).

Tabela 9: Frequências genotípicas obtidas para *BDNF*

Grupo	Genótipos <i>BDNF</i>	Total	
-------	-----------------------	-------	--

	rs6265			
	AA	AG	GG	
Controle	4 5,5%	18 24,7%	51 69,9%	73 100%
DA	6 4,7%	46 36,2%	75 59,1%	127 100%
Total	10	64	126	200

Freqüências genotípicas de *BDNF* obtidas em amostras de controles idosos e pacientes. A distribuição dos genótipos não divergiu significativamente entre os grupos testados ($P=0,241$). À esquerda temos o gráfico no qual é possível visualizar as distribuições genotípicas.

A presença de ao menos um alelo APOE*E4 ofereceu aumento para o risco de DA para os portadores dos genótipos AG (RR: 4,225; IC 95%: 1,195–14,943; $p=0,025$) e GG (RR: 2,29; IC 95%: 1,035-5,064; $p=0,029$; Tabela 10).

Tabela 10: Avaliação de suscetibilidade ou proteção para doença de Alzheimer na presença (+) ou ausência (-) de ao menos um alelo APOE*E4 para a variante rs6438552

BDNF

SNP	Genótipo	APOE*E4	Controles (%)	Pacientes (%)	Valor de p	RR (IC 95%)
rs6265	AA	(-)	3 (50)	3 (50)	0,571	X
		(+)	1 (25)	3 (75)		
	AG	(-)	13 (39)	20 (61)	0,025	4,225 (1,2 – 14,9)
		(+)	4 (13)	26 (87)		
	GG	(-)	39 (47)	44 (53)	0,029	2,29 (1,04 – 5,1)
		(+)	12 (28)	31 (72)		

A presença de ao menos um alelo APOE*E4 modifica o risco de DA para portadores dos genótipos AG e GG.

Legenda: X - condição não se aplica.

CALHM1

No total, foram avaliadas 81 amostras de controles idosos e 125 amostras de pacientes com DA para o polimorfismo rs2986017 de *CALHM1*. A análise estatística acusou não haver diferenças significativas de freqüências alélicas entre os dois grupos ($p=0,149$). Detalhes podem ser conferidos na tabela 11.

Tabela 11: Freqüências genotípicas obtidas para *CALHM1*

Grupo	Genótipos <i>CALHM1</i> rs2986017			Total
	AA	AG	GG

Controle	3 3,7%	36 44,4%	42 51,9%	81 100,0%
DA	2 1,6%	42 33,6%	81 64,8%	125 100,0%
Total	5	78	123	206

Resultados obtidos para as genotipagens de *CALHM1* em amostras de controles idosos e pacientes. A distribuição dos genótipos não divergiu significativamente entre os grupos testados ($P=0,149$). À esquerda temos o gráfico no qual é possível visualizar as distribuições genotípicas.

A análise de efeitos somatórios com o alelo APOE*E4 revelou que os indivíduos portadores dos genótipos AG e GG que possuem ao menos uma cópia do alelo APOE*E4 parecem ter risco aumentado para o desenvolvimento de DA. Genótipo AG RR=2,739; IC 95%: 1,09-7,438; $p=0,038$. Genótipo GG RR=3,644; IC 95%: 1,545-8,597; $p=0,003$ (Tabela 12).

Tabela 12: Avaliação de suscetibilidade ou proteção para doença de Alzheimer na presença (+) ou ausência (-) de ao menos um alelo APOE*E4 para a variante rs2986017 *CALHM1*

SNP	Genótipo	APOE*E4	Controles (%)	Pacientes (%)	Valor de p	RR (IC 95%)
rs2986017	AA	(-)	2 (67)	1 (33)	1	X
		(+)	1 (50)	1 (50)		
	AG	(-)	28 (55)	23 (45)	0,038	2,739 (1,1-7,44)
		(+)	8 (31)	18 (69)		
	GG	(-)	32 (44)	40 (56)	0,003	3,644 (1,55-8,6)
		(+)	9 (18)	41 (82)		

Os genótipos heterozigoto AG e homozigoto GG mostraram ser fatores de risco para DA para indivíduos que possuem ao menos uma cópia do alelo APOE*E4.

Legenda: X - condição não se aplica.

CST3

A análise estatística feita sobre as 59 amostras de controles e 57 pacientes revelou não haver diferenças significantes entre as freqüências alélicas do polimorfismo rs1064039 do gene *CST3*, indicando que nenhum alelo deste polimorfismo pode ser considerado diretamente nem como fator de risco nem de proteção para DA em nossa população ($p=0,426$). Os valores de distribuição genotípica encontram-se listados na tabela 13 abaixo.

Tabela 13: Freqüências genotípicas obtidas para *CST3*

Grupo	Genótipos <i>CST3</i> rs1064039			Total
	AA	AG	GG		

Controle	2 3,4%	10 16,9%	47 79,7%	59 100%
DA	1 1,8%	15 26,3%	41 71,9%	57 100%
Total	3	25	88	116

Resultados obtidos para as genotipagens de *CST3* em amostras de controles idosos e pacientes. A distribuição dos genótipos não divergiu significativamente entre os grupos testados ($p=0,426$). À esquerda temos o gráfico no qual é possível visualizar as distribuições genotípicas.

Nossas análises também indicam que nenhum genótipo do polimorfismo rs1064039 demonstrou aumentar ou mesmo diminuir o risco para a doença a depender do alelo APOE*E4. O detalhamento dessa análise encontra-se na Tabela 14 abaixo.

Tabela 14: Avaliação de suscetibilidade ou proteção para doença de Alzheimer na presença (+) ou ausência (-) de ao menos um alelo APOE*E4 para a variante rs1064039 *CST3*

SNP	Genótipo	APOE*E4	Controles (%)	Pacientes (%)	Valor de p	RR (IC 95%)
rs1064039	AA	(-)	2 (67)	1 (33)	#	X
		(+)	0	0		
	AG	(-)	7 (47)	8 (53)	0,678	X
		(+)	3 (30)	7 (70)		
	GG	(-)	35 (58)	25 (42)	0,239	X
		(+)	11 (42)	15 (58)		

Nossas análises indicaram que nenhum dos genótipos oferece risco ou proteção para DA em função do alelo APOE*E4.

Legenda: # - Número amostral insuficiente para cálculo estatístico;

X - condição não se aplica.

GAB2

Realizamos testes de genotipagem em 82 controles e 128 pacientes com DA e encontramos um resultado muito interessante para esse gene: uma associação positiva entre a variante rs2373115 de *GAB2* como fator de conferência de risco para DA em nossa amostra ($RR=1,979$; IC 95% 1,102-3,553; $p=0,009$; Tabela 15). Nossos resultados indicam que indivíduos homozigotos GG têm risco aumentado de desenvolver DA.

Tabela 15: Frequências genotípicas obtidas para *GAB2*

Grupo	Genótipos <i>GAB2</i> rs2373115			Total
	GG	GT	TT		

Controle	47 57,3%	34 41,5%	1 1,2%	82 100%
DA	93 72,7%	29 22,7%	6 4,7%	128 100%
Total	140	63	7	210

Resultados obtidos para as genotipagens de *GAB2* em amostras de controles idosos e pacientes. A diferença entre as freqüências do genótipo GG entre os grupos DA e controle mostrou ser bastante significativa, de modo que o genótipo possui representação maior entre os pacientes, o que nos permite concluir que este genótipo aumenta o risco para DA para seus portadores ($p=0,009$). À esquerda temos o gráfico no qual é possível visualizar as distribuições genotípicas observadas.

Legenda: ** $p<0,01$.

Em adição a esse resultado, também observamos que os indivíduos GG que possuem ao menos um alelo APOE*E4 têm um risco cerca de seis vezes maior ($RR=6,478$; IC 95% 2,629-15,965; $p<0,0001$) de desenvolverem DA do que indivíduos portadores dos demais genótipos (Tabela 16).

Tabela 16: Avaliação de suscetibilidade ou proteção para doença de Alzheimer na presença (+) ou ausência (-) de ao menos um alelo APOE*E4 para a variante rs2373115

GAB2

SNP	Genótipo	APOE*E4	Controles (%)	Pacientes (%)	Valor de p	RR (IC 95%)
rs2373115	GG	(-)	39 (48)	43 (52)	<0,0001	6,478 (2,6-15,9)
		(+)	7 (12)	50 (88)		
	GT	(-)	24 (55)	20 (45)	1	X
		(+)	10 (53)	9 (47)		
	TT	(-)	1 (25)	3 (75)	1	X
		(+)	0	3 (100)		

Aqui podemos observar que o genótipo GG não somente representa um fator de risco direto para DA, como aumenta substancialmente o risco para a doença em indivíduos que possuem ao menos uma cópia do alelo APOE*E4.

Legenda: X - condição não se aplica.

GAPDH

Para o SNP rs3741916, foram investigados 82 indivíduos controles e 134 pacientes. Não encontramos diferenças significativas entre as distribuições genotípicas para os grupos testados ($p=0,864$). Para o outro SNP de *GAPDH*, rs1060621, 83 controles e 132 pacientes foram genotipados. Também não encontramos diferenças significativas nas freqüências genotípicas entre os grupos ($p=0,924$). Os valores obtidos encontram-se listados nas Tabelas 17 e 18, a seguir.

Tabela 17: Freqüências genotípicas obtidas para *GAPDH*

Grupo	Genótipos <i>GAPDH</i>	Total	
-------	------------------------	-------	--

	rs3741916			
	CC	CG	GG	
Controle	45 54,9%	32 39,0%	5 6,1%	82 100%
DA	76 56,7%	52 38,8%	6 4,5%	134 100%
Total	121	84	11	216

Resultados obtidos para as genotipagens de *GAPDH* em amostras de controles idosos e pacientes. A distribuição dos genótipos não divergiu significativamente entre os grupos testados ($p=0,864$). À esquerda temos o gráfico no qual é possível visualizar essas distribuições genotípicas.

Tabela 18: Frequências genotípicas obtidas para *GAPDH*

Grupo	Genótipos <i>GAPDH</i> rs1060621			Total
	GG	GT	TT	
Controle	3 3,6%	26 31,3%	54 65,1%	83 100%
DA	5 3,8%	38 28,8%	89 67,4%	132 100%
Total	8	64	143	215

Resultados obtidos para as genotipagens de *GAPDH* em amostras de controles idosos e pacientes. A distribuição dos genótipos não divergiu significativamente entre os grupos testados ($p=0,924$). À esquerda temos o gráfico no qual é possível visualizar essas distribuições genotípicas.

Analizamos posteriormente se algum dos genótipos de *GAPDH* poderia sofrer modificação para o risco em função do alelo APOE*E4. Pudemos observar que indivíduos heterozigotos GT e homozigotos TT de rs1060621, assim como os heterozigotos CG e homozigotos CC de rs3741916 que possuem pelo menos um alelo APOE*E4 apresentam risco elevado para DA (Tabelas 19 e 20).

Tabela 19: Avaliação de suscetibilidade ou proteção para doença de Alzheimer na presença (+) ou ausência (-) de ao menos um alelo APOE*E4 para a variante rs3741916

<i>GAPDH</i>						
SNP	Genótipo	APOE*E4	Controles (%)	Pacientes (%)	Valor de p	RR (IC 95%)
rs3741916	CC	(-)	33 (45)	41 (55)	0,032	2,28 (1,02-5,08)
		(+)	12 (26)	34 (74)		

	CG	(-)	27 (50)	27 (50)	0,002	5,00 (1,67-14,9)
		(+)	5 (17)	25 (83)		
	GG	(-)	3 (60)	2 (40)	0,524	X
		(+)	1 (20)	4 (80)		

Também para o outro SNP de GAPDH estudado, inferimos que os genótipos CG e GG se comportam como fatores de risco para DA nos indivíduos que possuem ao menos uma cópia do alelo APOE*E4.

Legenda: X - condição não se aplica.

Tabela 20: Avaliação de suscetibilidade ou proteção para doença de Alzheimer na presença (+) ou ausência (-) de ao menos um alelo APOE*E4 para a variante rs1060621

GAPDH

SNP	Genótipo	APOE*E4	Controles (%)	Pacientes (%)	Valor de p	RR (IC 95%)
rs1060621	GG	(-)	1 (67)	2 (33)	1	X
		(+)	2 (40)	3 (60)		
	GT	(-)	22 (55)	18 (45)	0,004	5,81 (1,7-20,2)
		(+)	4 (17)	19 (83)		
	TT	(-)	41 (47)	47 (53)	0,004	3,05 (1,42-6,57)
		(+)	12 (22)	42 (78)		

Pudemos observar que os genótipos GT e TT mostraram ser fatores de risco para DA para indivíduos que possuem ao menos uma cópia do alelo APOE*E4.

Legenda: X - condição não se aplica.

GSK3B

Avaliamos 72 amostras de controles e 128 amostras de pacientes para o polimorfismo rs334558 de *GSK3B* e não encontramos associação de nenhuma das variantes como risco para doença de Alzheimer ($p=0,44$). Para o polimorfismo rs6438552 do mesmo gene, foram genotipadas 80 amostras de indivíduos controles e 132 pacientes, e o teste qui-quadrado evidenciou haver diferenças significativas entre as frequências genotípicas entre os dois grupos analisados ($p=0,019$), indicando que o genótipo GG está associado com risco elevado para a doença de Alzheimer na nossa população de estudo. Este genótipo é cerca de 2 vezes mais frequente no grupo DA (28,8%) do que no grupo controle (13,8%). Estes e demais resultados provenientes das genotipagens encontram-se listados nas tabelas 21 e 22, a seguir.

Tabela 21: Frequências genotípicas obtidas para *GSK3B*

Grupo	Genótipos <i>GSK3B</i> rs334558			Total	60
	AA	AG	GG

Controle	23 31,9%	38 52,8%	11 15,3%	72 100%
DA	46 35,9%	56 43,8%	26 20,3%	128 100%
Total	69	94	37	200

Resultados obtidos para as genotipagens de *GSK3B* em amostras de controles idosos e pacientes. A distribuição dos genótipos não divergiu significativamente entre os grupos testados ($p=0,44$), o que significa que nenhum dos genótipos oferece diretamente risco para DA. À esquerda temos o gráfico no qual é possível visualizar essas distribuições genotípicas.

Tabela 22: Frequências genotípicas obtidas para *GSK3B*

Grupo	Genótipos <i>GSK3B</i> rs6438552			Total
	AA	AG	GG	
Controle	20 25,0%	49 61,3%	11 13,8%	80 100%
DA	36 27,3%	58 43,9%	38 28,8%	132 100%
Total	56	107	49	212

Resultados obtidos para as genotipagens de *GSK3B* em amostras de controles idosos e pacientes. O genótipo GG apresentou frequências significativamente divergentes entre os grupos DA e controle, de modo que o GG possui representação maior entre os pacientes, o que nos permite concluir que este genótipo aumenta o risco para DA para seus portadores ($p=0,019$). À esquerda temos o gráfico no qual é possível visualizar as distribuições genotípicas observadas.
Legenda: * $p<0,05$.

As avaliações de risco concomitantes à presença do alelo APOE*E4 evidenciaram que para ambos os polimorfismos, os genótipos heterozigotos AG de rs334558 e AG de rs6438552 de *GSK3B* oferecem risco elevado para a DA (RR=4,97; IC 95% 1,795-13,734; $p=0,002$ e RR=8,545; IC 95% 3,142-23,242; $p<0,0001$) Detalhes nas tabelas 23 e 24.

Tabela 23: Avaliação de suscetibilidade ou proteção para doença de Alzheimer na presença (+) ou ausência (-) de ao menos um alelo APOE*E4 para a variante rs334558 *GSK3B*

SNP	Genótipo	APOE*E4	Controles (%)	Pacientes (%)	Valor de p	RR (IC 95%)
rs334558	AA	(-)	17 (40)	26 (60)	0,288	X

		(+)	6 (24)	19 (76)		
	AG	(-)	32 (52)	29 (48)	0,002	4,966
		(+)	6 (18)	27 (82)		(1,79-13,7)
	GG	(-)	6 (35)	11 (65)	0,719	X
		(+)	5 (25)	15 (75)		

Nossas análises demonstram que indivíduos heterozigotos AG portadores de ao menos um alelo APOE*E4 têm risco elevado para DA.

Legenda: X - condição não se aplica.

Tabela 24: Avaliação de suscetibilidade ou proteção para doença de Alzheimer na presença (+) ou ausência (-) de ao menos um alelo APOE*E4 para a variante rs6438552

GSK3B

SNP	Genótipo	APOE*E4	Controles (%)	Pacientes (%)	Valor de p	RR (IC 95%)
rs6438552	AA	(-)	15 (39)	23 (61)	0,552	X
		(+)	5 (28)	13 (72)		
	AG	(-)	43 (62)	26 (38)	<0,0001	8,545
		(+)	6 (16)	31 (84)		(3,1-23,2)
	GG	(-)	5 (21)	19 (79)	1	X
		(+)	6 (24)	19 (76)		

Apesar de o genótipo GG ter sido associado como fator de risco para DA, na análise somatória com alelos APOE*E4, o genótipo AG foi o que demonstrou ser fator de risco sinérgico.

Legenda: X - condição não se aplica.

GSTP1

Dentre os 74 controles vs. 121 pacientes genotipados para o rs1695 e os 73 controles e 128 pacientes testados para rs1138272, a análise estatística não evidenciou diferenças significativas para nenhuma das duas variantes entre os grupos ($p=0,357$ e $p=0,145$, respectivamente). Os valores obtidos estão presentes nas Tabelas 25 e 26.

Tabela 25: Frequências genotípicas obtidas para *GSTP1*

Grupo	Genótipos <i>GSTP1</i> rs1695			Total
	AA	AG	GG		

Controle	38 51,4%	29 39,2%	7 9,5%	74 100%
DA	51 42,1%	52 43,0%	18 14,9%	121 100%
Total	89	81	25	195

Resultados obtidos para as genotipagens de *GSTP1* em amostras de controles idosos e pacientes. A distribuição dos genótipos não divergiu significativamente entre os grupos testados ($p=0,357$), o que significa que nenhum dos genótipos oferece diretamente risco para DA. À esquerda temos o gráfico no qual é possível visualizar essas distribuições genotípicas.

Tabela 26: Frequências genotípicas obtidas para *GSTP1*

Grupo	Genótipos <i>GSTP1</i> rs1138272			Total
	CC	CT	TT	
Controle	64 87,7%	8 11,0%	1 1,4%	73 100%
DA	121 94,5%	7 5,5%	0	128 100%
Total	185	15	1	201

Resultados obtidos para as genotipagens de *GSTP1* em amostras de controles idosos e pacientes. A distribuição dos genótipos não divergiu significativamente entre os grupos testados ($p=0,145$), o que significa que nenhum dos genótipos oferece diretamente risco para DA. À esquerda temos o gráfico no qual é possível visualizar essas distribuições genotípicas.

Na análise somatória de genótipos dos polimorfismos de *GSTP1* com os alelos APOE*E4, no entanto, observamos que os genótipos homozigotos AA de rs1695 e CC de rs1138272 e parecem ser fatores de risco para DA em nossa população. Obtivemos respectivamente $RR=2,978$; IC 95% 1,143-7,758; $p=0,026$ e $RR=3,007$; IC 95% 1,524-5,933; $p=0,001$. Mais informações podem ser obtidas nas Tabelas 27 e 28.

Tabela 27: Avaliação de suscetibilidade ou proteção para doença de Alzheimer na presença (+) ou ausência (-) de ao menos um alelo APOE*E4 para a variante rs1695

<i>GSTP1</i>						
SNP	Genótipo	APOE*E4	Controles (%)	Pacientes (%)	Valor de p	RR (IC 95%)
rs1695	AA	(-)	29 (51)	28 (49)	0,026	2,978 (1,14-7,76)
		(+)	8 (26)	23 (74)		

	AG	(-)	21 (42)	29 (58)	0,16	X
		(+)	8 (26)	23 (44)		
	GG	(-)	6 (43)	8 (57)	0,172	X
		(+)	1 (10)	9 (90)		

O genótipo AA apareceu nesta análise, como fator de risco para DA em indivíduos que possuem ao menos uma cópia do alelo APOE*E4.

Legenda: X - condição não se aplica.

Tabela 28: Avaliação de suscetibilidade ou proteção para doença de Alzheimer na presença (+) ou ausência (-) de ao menos um alelo APOE*E4 para a variante rs1138272

GSTP1

SNP	Genótipo	APOE*E4	Controles (%)	Pacientes (%)	Valor de p	RR (IC 95%)
rs1138272	CC	(-)	49 (44)	63 (56)	0,001	3,007
		(+)	15 (20)	58 (80)		(1,52-5,93)
	CT	(-)	6 (55)	5 (45)	1	X
		(+)	2 (50)	2 (50)		
	TT	(-)	1 (100)	0	#	X
		(+)	0	0		

Indivíduos homozigotos CC que possuem ao menos um alelo APOE*E4 possuem risco aumentado para DA de acordo com nossas observações.

Legenda: X - condição não se aplica.

IL1A

Analizamos os genótipos de 76 amostras de controles e 130 pacientes para o polimorfismo rs1800587 do gene *IL1A*, e não encontramos diferenças significativas para essa variante ($p=0,743$) em nossa casuística (Tabela 29).

Tabela 29: Frequências genotípicas obtidas para *IL1A*

Grupo	Genótipos <i>IL1A</i> rs1800587		Total	100 80
	AA	AG			

Controle	6 7,9%	70 92,1%	76 100%
DA	12 9,2%	118 90,8%	130 100%
Total	18	188	206

Resultados obtidos para as genotipagens de *IL1A* em amostras de controles idosos e pacientes. A distribuição dos genótipos não divergiu significativamente entre os grupos testados ($p=0,743$), o que significa que nenhum dos genótipos oferece diretamente risco para DA. À esquerda temos o gráfico no qual é possível visualizar essas distribuições genotípicas.

Obs: Em nossa amostra não identificamos indivíduos portadores do genótipo GG.

Levando em conta, então, os efeitos somatórios dos genótipos de *IL1A* na presença de ao menos um alelo APOE*E4, verificamos que o genótipo heterozigoto AG oferece risco 2,96 vezes maior para DA do que para os não-portadores desse genótipo (RR=2,962; IC 95% 1,537-5,705; $p=0,001$). A Tabela 30 abaixo apresenta os detalhes referentes a essa análise.

Tabela 30: Avaliação de suscetibilidade ou proteção para doença de Alzheimer na presença (+) ou ausência (-) de ao menos um alelo APOE*E4 para a variante rs1800587

IL1A

SNP	Genótipo	APOE*E4	Controles (%)	Pacientes (%)	Valor de p	RR (IC 95%)
rs1800587	AA	(-)	6 (43)	8 (57)	0,245	X
		(+)	0	4 (100)		
	AG	(-)	53 (47)	60 (53)	0,001	2,962 (1,54-5,71)
		(+)	17 (23)	57 (77)		
	GG	(-)	0	0	#	X
		(+)	0	0		

Indivíduos heterozigotos AG que possuem ao menos um alelo APOE*E4 possuem risco elevado para DA, de acordo com nossa análise.

Legenda: # - número amostral insuficiente para cálculo estatístico;

X - condição não se aplica

IL1B

Foram genotipados 77 indivíduos controles e 128 pacientes para o polimorfismo rs1143634 de *IL1B*, e a análise estatística não revelou quaisquer diferenças nas frequências desta variante entre os grupos (Tabela 31). Também analisamos 78 controles e 132 pacientes de DA para outro polimorfismo (rs3087258) presente no mesmo gene, porém todos os indivíduos analisados (tanto controles quanto pacientes) eram portadores do genótipo GG desta variante, o que torna a análise irrelevante, já que não seria possível encontrar nenhuma diferença em relação às frequências genotípicas.

Tabela 31: Frequências genotípicas obtidas para *IL1B*

Grupo	Genótipos <i>IL1B</i> rs1143634			Total
	AA	AG	GG	
Controle	3 3,9%	25 32,5%	49 63,6%	77 100%
DA	7 5,5%	40 31,3%	81 63,3%	128 100%
Total	10	65	130	205

Resultados obtidos para as genotipagens de *IL1B* em amostras de controles idosos e pacientes. A distribuição dos genótipos não divergiu significativamente entre os grupos testados ($p=0,875$), o que significa que nenhum dos genótipos oferece diretamente risco para DA. À esquerda temos o gráfico no qual é possível visualizar essas distribuições genotípicas.

A análise somatória com alelos APOE*E4 revelou que para o polimorfismo rs1143634 de *IL1B*, os genótipos AG e AA oferecem risco elevado para DA em 4,99 e 3,01 vezes respectivamente ($RR=4,99$; IC 95% 1,443-17,234; $p=0,009$ e $RR=3,008$; IC 95% 1,374-6,584; $p=0,006$). G= Mais detalhes podem ser conferidos na Tabela 32.

Embora nós tenhamos identificado apenas indivíduos homozigotos GG para a variante rs3087258, foi possível estabelecer valores de suscetibilidade na presença do alelo APOE*E4. Nossas análises indicam que o genótipo GG aumenta cerca de 3 vezes o risco para DA quando na presença de ao menos um alelo APOE*E4 ($RR=3,27$; IC 95% 1,727-6,191; $p<0,0001$; Tabela 33).

Tabela 32: Avaliação de suscetibilidade ou proteção para doença de Alzheimer na presença (+) ou ausência (-) de ao menos um alelo APOE*E4 para a variante rs1143634 *IL1B*

SNP	Genótipo	APOE*E4	Controles (%)	Pacientes (%)	Valor de p	RR (IC 95%)
rs1143634	AA	(-)	2 (33)	4 (67)	1	X
		(+)	1 (25)	3 (75)		
	AG	(-)	21 (51)	20 (49)	0,009	4,988 (1,44-17,2)
		(+)	4 (17)	19 (83)		

	GG	(-)	37 (47)	41 (53)	0,006	3,008
		(+)	12 (23)	40 (77)		(1,37-6,58)

Nossa avaliação indicou que os genótipos AG e GG podem ser considerados fatores de risco para DA para indivíduos que possuam simultaneamente ao menos uma cópia do alelo APOE*E4.

Legenda: X - condição não se aplica.

Tabela 33: Avaliação de suscetibilidade ou proteção para doença de Alzheimer na presença (+) ou ausência (-) de ao menos um alelo APOE*E4 para a variante rs3087258

IL1B

SNP	Genótipo	APOE*E4	Controles (%)	Pacientes (%)	Valor de p	RR (IC 95%)
rs3087258	GG	(-)	60 (47)	68 (53)	<0,0001	3,27
		(+)	17 (21)	63 (79)		(1,73-6,19)

Dentre os indivíduos homozigotos GG, para aqueles que possuem ao menos um alelo APOE*E4, é possível notar o aumento significativo de risco para a doença.

SORL1

Analizamos os genótipos relativos a quatro variantes presentes nesse gene. No total, foi realizada a genotipagem de 75 controles e 132 pacientes para o SNP rs689021, 80 controles e 133 pacientes para o SNP rs2070045, e 82 controles e 133 pacientes para os rs3824968. Nenhuma destas três variantes mostrou associação com risco para doença de Alzheimer em nossa população de estudo (valores de $p=0,295$; $0,798$; $0,646$, respectivamente). Em contrapartida, encontramos uma associação positiva na qual o SNP rs641120 apresenta o genótipo GG oferecendo risco para a doença de Alzheimer ($p=0,026$). Para esta variante, foram analisados no total, o genótipo de 54 controles e 104 pacientes. Os detalhes dessas genotipagens encontram-se listados nas tabelas 34, 35, 36 e 37.

Tabela 34: Frequências genotípicas obtidas para *SORL1*

Grupo	Genótipos <i>SORL1</i> rs689021			Total	
	AA	AG	GG		
Controle	11 14,7%	39 52,0%	25 33,3%	75 100%

DA	22 16,7%	54 40,9%	56 42,4%	132 100%
Total	33	93	81	207

Resultados obtidos para as genotipagens de *SORL1* em amostras de controles idosos e pacientes. A distribuição dos genótipos não divergiu significativamente entre os grupos testados ($p=0,295$), o que significa que nenhum dos genótipos oferece diretamente risco para DA. À esquerda temos o gráfico no qual é possível visualizar essas distribuições genotípicas.

Tabela 35: Frequências genotípicas obtidas para *SORL1*

Grupo	Genótipos <i>SORL1</i> rs20070045			Total
	GG	GT	TT	
Controle	4 5,0%	26 32,5%	50 62,5%	80 100%
DA	7 5,3%	49 36,8%	77 57,9%	133 100%
Total	11	75	127	213

Resultados obtidos para as genotipagens de *SORL1* em amostras de controles idosos e pacientes. A distribuição dos genótipos não divergiu significativamente entre os grupos testados ($p=0,798$), o que significa que nenhum dos genótipos oferece diretamente risco para DA. À esquerda temos o gráfico no qual é possível visualizar essas distribuições genotípicas.

Tabela 36: Frequências genotípicas obtidas para *SORL1*

Grupo	Genótipos <i>SORL1</i> rs3824968			Total
	AA	AT	TT	
Controle	9 11,0%	29 35,4%	44 53,7%	82 100%

DA	10 7,5%	52 39,1%	71 53,4%	133 100%
Total	19	81	115	215

Resultados obtidos para as genotipagens de *SORL1* em amostras de controles idosos e pacientes. A distribuição dos genótipos não divergiu significativamente entre os grupos testados ($p=0,646$), o que significa que nenhum dos genótipos oferece diretamente risco para DA. À esquerda temos o gráfico no qual é possível visualizar essas distribuições genotípicas.

Tabela 37: Frequências genotípicas obtidas para *SORL1*

Grupo	Genótipos <i>SORL1</i> rs641120			Total
	AA	AG	GG	
Controle	12 22,2%	18 33,3%	24 44,4%	54 100%
DA	12 11,5%	23 22,1%	69 66,3%	104 100%
Total	24	41	93	158

Resultados obtidos para as genotipagens de *SORL1* em amostras de controles idosos e pacientes. A distribuição dos genótipos foi significativamente diferente entre os grupos ($p=0,026$). Nesse caso, o genótipo GG foi determinado como fator de risco para DA. À esquerda temos o gráfico no qual é possível visualizar essas distribuições genotípicas.

Apesar de termos encontrado apenas uma associação direta de risco para DA dentre as variantes de *SORL1* analisadas, nossos cálculos estatísticos mostram que para todos os polimorfismos desse gene, há ao menos um genótipo que quando na presença de alelos APOE*E4, aumenta drasticamente o risco para a doença – os riscos chegam a ser de 3 (como é o caso do genótipo TT de rs3824968) a 15,4 vezes (genótipo AA de rs641120) maiores do que para indivíduos que não possuem cópias de APOE*E4. Em suma, pudemos determinar os seguintes valores: genótipo AA de rs641120 tem $RR=15,4$ (IC 95% 1,473-160,972; $p=0,027$); genótipos homozigotos AA e GG de rs689021 com $RR=14,444$ (IC 95% 1,562-133,58; $p=0,009$) e $RR=4,148$ (IC 95% 1,362-12,631; $p=0,014$), respectivamente; genótipos GT e TT de rs2070045 com $RR=8,276$ (IC 95% 1,755-39,027; $p=0,003$) e $RR=3,012$ (IC 95% 1,402-6,47; $p=0,006$), respectivamente; genótipos AT e TT de rs3824968 com $RR=4,583$ (IC 95% 1,394-15,069; $p=0,012$) e $RR=2,99$ (IC 95% 1,327-6,739; $p=0,011$). Os detalhes das genotipagens estão listados nas Tabelas 38, 39, 40 e 41, a seguir.

Tabela 38: Avaliação de suscetibilidade ou proteção para doença de Alzheimer na presença (+) ou ausência (-) de ao menos um alelo APOE*E4 para a variante rs689021

SORL1

SNP	Genótipo	APOE*E4	Controles (%)	Pacientes (%)	Valor de p	RR (IC 95%)
rs689021	AA	(-)	10 (53)	9 (47)	0,009	14,444 (1,6-133,5)
		(+)	1 (7)	13 (93)		
	AG	(-)	28 (47)	32 (53)	0,274	X
		(+)	11 (33)	22 (67)		
	GG	(-)	20 (42)	27 (58)	0,014	4,148 (1,36-12,6)
		(+)	5 (15)	28 (85)		

Os dois genótipos homozigotos (AA e GG) aumentam o risco para DA se os indivíduos forem portadores também, de ao menos um alelo APOE*E4.

Legenda: X - condição não se aplica.

Tabela 39: Avaliação de suscetibilidade ou proteção para doença de Alzheimer na presença (+) ou ausência (-) de ao menos um alelo APOE*E4 para a variante rs2070045

SORL1

SNP	Genótipo	APOE*E4	Controles (%)	Pacientes (%)	Valor de p	RR (IC 95%)
rs2070045	GG	(-)	2 (33)	4 (67)	1	X
		(+)	2 (40)	3 (60)		
	GT	(-)	24 (45)	29 (55)	0,003	8,276 (1,75-39)
		(+)	2 (9)	20 (91)		
	TT	(-)	36 (51)	35 (49)	0,006	3,012 (1,4-6,47)
		(+)	14 (25)	41 (75)		

Indivíduos GT e TT que possuem ao menos um alelo APOE*E4 e ao mesmo tempo, aparecem como portadores de risco elevado para DA de acordo com nossa avaliação.

Legenda: X - condição não se aplica.

Tabela 40: Avaliação de suscetibilidade ou proteção para doença de Alzheimer na presença (+) ou ausência (-) de ao menos um alelo APOE*E4 para a variante rs3824968

SORL1

SNP	Genótipo	APOE*E4	Controles (%)	Pacientes (%)	Valor de p	RR (IC 95%)
rs3824968	AA	(-)	6 (55)	5 (45)	0,367	X
		(+)	2 (29)	5 (71)		
	AT	(-)	25 (45)	30 (55)	0,012	4,583 (1,39-15,1)
		(+)	4 (15)	22 (85)		
	TT	(-)	32 (49)	33 (51)	0,011	2,99 (1,33-6,74)
		(+)	12 (24)	37 (76)		

Nossas análises apontam os Indivíduos portadores dos genótipos AT e TT e que possuem ao menos um alelo APOE*E4 mesmo tempo, como portadores de risco elevado para DA.
Legenda: X - condição não se aplica.

Tabela 41: Avaliação de suscetibilidade ou proteção para doença de Alzheimer na presença (+) ou ausência (-) de ao menos um alelo APOE*E4 para a variante rs641120

SORL1

SNP	Genótipo	APOE*E4	Controles (%)	Pacientes (%)	Valor de p	RR (IC 95%)
rs641120	AA	(-)	11 (69)	5 (31)	0,027	15,4 (1,5-160,9)
		(+)	1 (12)	7 (88)		
	AG	(-)	14 (50)	14 (50)	0,321	X
		(+)	4 (31)	9 (69)		
	GG	(-)	17 (33)	35 (67)	0,1	X
		(+)	7 (17)	34 (83)		

Nossa avaliação indicou que o genótipo AA pode ser considerado fator de risco para DA quando na presença de ao menos uma cópia do alelo APOE*E4.

Legenda: X - condição não se aplica.

Após termos concluído a análise das genotipagens de controles vs. pacientes, propusemos, então, incluir amostras de pacientes portadores do comprometimento cognitivo leve (CCL) para análise genotípica para aqueles polimorfismos que demonstraram possuir freqüências genotípicas divergentes entre controles e pacientes. Os polimorfismos os quais encontramos essas diferenças foram rs429358 e rs7412 de *APOE*, rs2373115 de *GAB2*, rs6438552 de *GSK3B* e rs641120 de *SORL1*. Apresentamos a seguir os resultados para essas genotipagens.

APOE

Além dos 83 controles e 135 pacientes, genotipamos também 43 indivíduos portadores de CCL para os dois polimorfismos de *APOE*. Na tabela 42 a seguir temos informações detalhadas a respeito das freqüências genotípicas obtidas. Nossos resultados mostraram que as diferenças permanecem bastante significativas mesmo após a inserção deste terceiro grupo nas análises ($p=0,0004$).

A tabela 43 nos traz informações sobre freqüências alélicas obtidas para os três grupos, além de uma visualização gráfica desses resultados. É interessante notar a forma como os alelos de *APOE* do grupo CCL se distribuem nesse caso: para qualquer um dos três alelos, a freqüência deste grupo é sempre intermediária entre controles e DAs.

Tabela 42: Frequências genotípicas observadas para APOE

Grupo	Genótipos <i>APOE</i>						Total
	E2/E2	E2/E3	E2/E4	E3/E3	E3/E4	E4/E4	
Controle	0	11 13%	0	54 65%	17 21%	1 1%	83 100%
CCL	1 2%	1 2%	1 2%	25 58%	14 33%	1 2%	43 100%
DA	2 1,5%	2 1,5%	3 2%	66 49%	49 36%	13 10%	135 100%
Total	2	13	3	120	66	14	218

Resultados obtidos para as genotipagens dos polimorfismos rs429358 e rs7412 de *APOE* em amostras de controles idosos, pacientes com CCL e DA. Distribuição dos genótipos das amostras e percentagens para cada genótipo ($p=0,0004$).

Tabela 43: Frequências alélicas obtidas para APOE

Grupo	Alelos <i>APOE</i>			Total
	E2	E3	E4	
Controle	11 7%	136 82%	19 11%	166 100%
CCL	4 5%	65 75%	17 20%	86 100%
DA	9 3%	183 68%	78 29%	270 100%
Total	24	384	114	522

A tabela lista os valores de frequências alélicas obtidas para APOE em nossa casuística. Na coluna da esquerda temos uma visualização gráfica com as percentagens dos alelos e sua distribuição entre os grupos controle, CCL e DA.

GAB2

Analizamos 82 indivíduos controles, 128 pacientes com DA e 47 com CCL para o polimorfismo rs2373115 de *GAB2*. Embora tenhamos obtido um valor de significância menor após incluirmos o grupo CCL, este valor permaneceu significativo ($p=0,04$), o que indica que há diferença entre os três grupos. Esses resultados podem ser conferidos com mais detalhes na Tabela 44.

Tabela 44: Frequências genotípicas obtidas para *GAB2*

Grupo	Genótipos <i>GAB2</i>	Total
-------	-----------------------	-------

	rs2373115			
	GG	GT	TT	
Controle	47 57,3%	34 41,5%	1 1,2%	82 100%
CCL	28 59,5%	17 36,2%	2 4,3%	47 100%
DA	93 72,7%	29 22,7%	6 4,7%	128 100%
Total	140	63	7	210

Resultados obtidos para as genotipagens de *GAB2* em amostras de controles idosos, pacientes com CCL e DA. A frequência mais elevada do genótipo GG nos pacientes com DA parece continuar sendo o motivo de diferença significativa entre os grupos ($p=0,04$). Assim como para os alelos de *APOE*, os genótipos dos pacientes com CCL se distribuem em frequências intermediárias entre os dois outros grupos. À esquerda temos o gráfico no qual é possível visualizar as distribuições genotípicas observadas.

Legenda: * $p<0,05$.

Uma vez que sabemos que há diferenças entre estes grupos, realizamos uma comparação diretamente entre os grupos CCL vs. controles e CCL vs. DAs, a fim de estabelecer qual dos grupos possui um perfil genotípico mais semelhante (ou mais distinto) do grupo CCL. Nossas análises sugerem que para a variante rs2373115, o perfil genotípico dos pacientes com CCL é mais distinto do grupo DA ($p=0,008$) do que do grupo controle ($p=0,48$).

GSK3B

Analizamos 80 indivíduos controles, 132 pacientes com DA e 44 com CCL para o polimorfismo rs6438552 de *GSK3B*. Assim como na análise de *GAB2*, observamos um valor de significância menor após incluirmos o grupo CCL, mas que ainda assim permaneceu significativo ($p=0,042$), o que indica que há diferença entre os três grupos. Esses resultados podem ser conferidos com mais detalhes na tabela 45.

Tabela 45: Frequências genotípicas obtidas para *GSK3B*

Grupo	Genótipos <i>GSK3B</i> rs6438552			Total
	AA	AG	GG	
Controle	20 25,0%	49 61,2%	11 13,8%	80 100%

CCL	14 31,8%	17 38,6%	13 29,5%	44 100%
DA	36 27,3%	58 43,9%	38 28,8%	132 100%
Total	70	124	62	256

Resultados obtidos para as genotipagens de *GSK3B* em amostras de controles idosos, pacientes com CCL e DA. A frequência mais elevada do genótipo GG nos pacientes com DA e CCL parece ser a responsável pela diferença observada entre os grupos. ($p=0,042$). À esquerda temos o gráfico no qual é possível visualizar as distribuições genotípicas observadas.

Legenda: * $p<0,05$.

Uma vez que sabemos que há diferenças entre estes grupos, realizamos, então, uma comparação diretamente entre os grupos CCL vs. controles e CCL vs. DAs, a fim de estabelecer qual dos grupos possui um perfil genotípico mais semelhante (ou mais distinto) do grupo CCL. A análise estatística nos permitiu informar que para a variante rs6438552 de *GSK3B*, o perfil genotípico dos pacientes com CCL é tão distinto do grupo controle ($p=0,032$) quanto do grupo DA ($p=0,019$).

SORL1

Além dos Analisamos 54 indivíduos controles e 104 pacientes com DA, analisamos também 44 pacientes com CCL para o polimorfismo rs641120 de *SORL1*. Após incluirmos o grupo CCL, não pudemos mais observar diferenças entre os grupos ($p=0,052$). Esses resultados podem ser conferidos com mais detalhes na Tabela 46. O teste de partição do qui-quadrado indicou que o grupo não diverge significativamente nem do grupo controle ($p=0,1$) nem do grupo DA ($p=0,307$).

Tabela 46: Frequências genotípicas obtidas para *SORL1*

Grupo	Genótipos <i>SORL1</i> rs641120			Total
	AA	GG	GG	
Controle	12 22,2%	18 33,3%	24 44,4%	54 100%
CCL	9 20,5%	7 15,9%	28 63,6%	44 100%
DA	12 11,5%	23 22,1%	69 66,3%	104 100%

Total	33	48	121	202	
-------	----	----	-----	-----	--

Resultados obtidos para as genotipagens de *SORL1* em amostras de controles idosos, pacientes com CCL e DA. O teste qui-quadrado não evidenciou diferenças significativas entre os três grupos. À esquerda temos o gráfico no qual é possível visualizar as distribuições genotípicas observadas.

Discussão

Após analisarmos cada um dos vinte e um polimorfismos em 13 genes diferentes nos grupos DA e respectivos controles, encontramos quatro associações positivas para a doença de Alzheimer, sendo que dois desses polimorfismos encontram-se em genes localizados no cromossomo 11. Em nossa população o alelo APOE*E4 mostrou associação com risco elevado para a DA, o que corrobora achados da maior parte dos grupos que analisaram esse gene, e que vêm encontrando dados como este pelos últimos quinze anos (Chen *et al.*, 2007, Saunders *et al.*, 1993; Strittmatter *et al.*, 1993, van der Vlies *et al.* 2007), incluindo grupos de pesquisa brasileiros (Almeida & Shimokomaki, 1997; Souza *et al.*, 2003). O alelo APOE*E3 apresenta frequência majoritária em muitas populações (independentemente de diagnóstico), incluindo a nossa (72%), ao passo que o alelo APOE*E2 aparece em menor frequência (5%), e é mais freqüente em controles.

Sabemos que células da glia (uma das principais fontes de produção de APOE), podem reciclar colesterol de membranas neuronais, reunindo-o com a APOE, a fim de promover crescimento de neuritos. A habilidade de remodelar neurônios depende da isoforma da APOE e encontra-se comprometida em pacientes portadores de alelos APOE*E4. Também foi constatado que genótipo de APOE influencia na gravidade da DA (Raber, 2008). A isoforma APOE*E4 está associada com o aumento de deposição do peptídeo beta amiloide. Apesar de o mecanismo pelo qual esse processo se dá ainda não tenha sido completamente elucidado, diversos trabalhos têm demonstrado que APOE*E4 compromete a plasticidade neuronal e prejudica o crescimento de neuritos (Corder *et al.*, 1993, Nathan *et al.*, 1994).

Outro achado consistente foi a associação de GAB2 rs2373115 em nossa amostra. O genótipo GG apareceu em 74% dos nossos pacientes, contra 56% dos controles, o que mostrou diferença significativa no teste χ^2 ($p=0,009$). A associação desse SNP como possível fator de risco para a DA, encontrada em nosso trabalho é coerente com resultados encontrados por outros grupos de pesquisa (Reiman *et al.*, 2007; Sleegers *et al.*, 2008; Nacmias *et al.*, 2009).

Esse polimorfismo em especial está localizado em um íntron, e ainda não se sabe ao certo qual o seu papel biológico possível em DA. Sabe-se, entretanto, que a participação de GAB2 foi descrita como envolvida no processo de

fosforilação de quinases relacionadas às vias neuropatológicas da doença de Alzheimer, com destaque para a *GSK3B*. Em linhas gerais, foi postulado que a proteína *GAB2* juntamente com a presenilina 1 ativa a quinase PI3K, que ativa PKB, que fosforila *GSK3B* (tornando-a inativa). Estando esta última fosforilada, o mecanismo de hiperfosforilação da proteína TAU torna-se suprimido.

Nosso achado torna-se mais interessante quando consideramos o estudo funcional realizado no trabalho, mencionado anteriormente, de Reiman *et al.* (2007) que diminuiu níveis de RNAm de *GAB2*, promovendo aumento de fosforilação de TAU. Sabemos que a hiperfosforilação da proteína TAU leva à morte celular programada, característica amplamente observada em neurônios de pacientes portadores da doença de Alzheimer. Com a morte neuronal, passa a haver o processo de atrofia de regiões cerebrais, comumente observado em cérebros de pacientes de DA. Possivelmente os sintomas começam a surgir quando ocorre redução de áreas relacionadas à linguagem e memória.

Os resultados encontrados não nos permitem inferir, entretanto, que seja precisamente o polimorfismo rs2373115 de *GAB2* o responsável pelo aumento de risco observado, até mesmo porque faltam estudos funcionais com o propósito de confirmar essa observação, mas existe a possibilidade de que o bloco haplotípico no qual ele encontra-se inserido possua as variantes alélicas que estão por trás dessa associação.

Outro resultado positivo que tivemos foi a associação do SNP rs641120 de *SORL1*, também conferindo risco elevado para a DA. No trabalho original de Rogaeva *et al.*, 2006, a autora menciona uma lista com 29 SNPs distribuídos em dois blocos haplotípicos no gene *SORL1*, os quais foram investigados para avaliação de possível risco para DA, e atribui associações positivas para 5 SNPs (dos quais selecionamos 4 para análise), a depender do grupo étnico (americanos, israelenses, caribenhos e europeus). Ao final das análises dos resultados, o grupo de pesquisa observou que embora todos os grupos étnicos apresentassem associação de polimorfismos de *SORL1* com DA, esses alelos estavam distribuídos de acordo com a ancestralidade. Em resumo, para os grupos hispânico-caribenhos e árabe-israelenses, os polimorfismos associados com DA, localizavam-se no bloco mais próximo da extremidade 5', ao passo que caucasianos do norte europeu mostraram associação majoritariamente nos SNPs do bloco mais próximo da extremidade 3' do gene. O polimorfismo que mostrou associação positiva em nosso trabalho (rs641120) localiza-se no bloco upstream, o que amplia nosso espectro de análise de resultados, pois isso nos

permite sugerir que existe certa coerência entre a associação e a ancestralidade, uma vez que geograficamente, a população brasileira se aproxima mais da população hispânico-caribenha (que tem origem fundamentalmente africana) do que das demais em questão.

Nossa última associação positiva refere-se ao SNP rs6438552 de *GSK3B*, e certamente constitui uma das mais interessantes a se discutir. Há muito se conhece a participação deste gene nas vias patológicas da DA. A quinase *GSK3B* atua como agente fosforilador da proteína TAU, que sob condições anormais, forma os emaranhados neurofibrilares presentes nos neurônios dos pacientes com DA. Em 2005, um grupo de pesquisadores australianos encontrou associações entre dois SNPs em *GSK3B* com risco elevado para a doença de Parkinson (Kwok *et al.*, 2005). O alelo A do SNP rs6438552 está associado com aumento na transcrição de *GSK3B* e aumento na fosforilação da proteína TAU. Os autores observaram que indivíduos que possuem cópias do alelo A têm chance maior de perderem os exons 9 e 11. Esses exons codificam parte da região que viria a ser o sítio de fosforilação da proteína TAU, de modo a comprometer o processo normal de fosforilação, o que talvez possa explicar o papel funcional do SNP nessa patologia. Apesar do fato de o grupo ter trabalhado com pacientes com doença de Parkinson, decidimos considerar este trabalho, uma vez que ambas as doenças compartilham elementos das mesmas vias bioquímicas.

Como sabemos, o gene *GAB2* interage com *GSK3B*, ainda que indiretamente e, além disso, acredita-se que diferentes vias bioquímicas atuem em doenças complexas, assim como é para a DA. Dessa maneira, é possível que partes cruciais de uma das vias bioquímicas estejam comprometidas em nossa população, ou talvez o modo como os genótipos desses indivíduos estejam interagindo com o ambiente local possam ser algumas das explicações para a associação positiva encontrada entre essas variantes e a DA. É fato, porém, que dentre as associações positivas que encontramos, apenas o grupo controle para esse polimorfismo não encontra-se em HWE. O fato de uma população não estar em HWE pode ser devido a uma série de fatores como intercruzamento, estratificação populacional ou seleção. Pode também ser sintoma de associação com alguma doença, por exemplo. Até o presente momento, os pesquisadores testam o HWE num momento inicial como forma de conferir a qualidade de seus dados, e descartam os loci que, por exemplo, desviem do HWE entre os controles ao nível de significância $\alpha=10^{-3}$ ou 10^{-4} (Balding, 2006), o que não chega a ser o caso em nossa amostra. Com isso, ficamos cientes de que os

resultados de associação para GSK3B rs6438552 devem ser observados e analisados com cautela, porém, não há necessidade de invalidar os resultados por conta dessa eventualidade.

Com relação às análises realizadas em indivíduos portadores de CCL, nossos resultados talvez não nos permitam falar em genótipos de risco, mas o que podemos extrair desses resultados, são as observações com relação ao modo como esses pacientes se comportam genotipicamente com relação aos grupos DA e controle. Ao observarmos os dados de *APOE* e *GAB2*, notamos claramente as distribuições intermediárias entre as frequências. O que pudemos observar é que o grupo CCL costuma ser significativamente diferente de ao menos um dos grupos, refletindo a heterogeneidade desse grupo. O acompanhamento a longo prazo dos pacientes com CCL nos permitirá inferir sobre a suscetibilidade de risco de conversão nos portadores de genótipos de risco.

Encerrando esta linha de discussão comentaremos sobre aquilo que acreditamos ser um possível efeito somatório dos genes avaliados como modificadores do risco para DA. Com exceção dos genótipos do polimorfismo rs1064039 de *CST3*, pelo menos um genótipo em todos os polimorfismos mostrou associação com risco elevado para DA quando na presença de ao menos um alelo *APOE**E4, dado corroborado por inúmeros outros estudos semelhantes a esse. Nosso resultado nos permite concordar com autores que propõem a atuação simultânea de pequenas variáveis de risco culminando num quadro patológico, não apenas para DA, mas para muitas outras doenças complexas sem causas genéticas propriamente estabelecidas até o momento. Se isso for verdadeiro, fica mais fácil compreender porque apenas a variante *APOE**E4 sozinha não é necessária nem suficiente para o desenvolvimento da doença de Alzheimer de início tardio, mas quando combinada a outras alterações pode culminar no desenvolvimento de DA.

Apesar de todas as variantes polimórficas investigadas nesse trabalho já terem sido associadas em algum momento com DA por mais de um grupo de pesquisas, apenas uma pequena parcela mostrou estar relacionada como fator de risco em nossa casuística. Precisamos considerar as diferenças étnicas entre nossa população e as populações que utilizamos como referência para a replicação dos dados. A vasta maioria dos trabalhos de referência utilizou amostras de DNA de indivíduos de determinadas regiões da Europa, América do Norte e Ásia, principalmente. Nós sabemos que a população brasileira compartilha genes oriundos destes e ainda de outros grupos étnicos, e que sofre variação nas

diferentes regiões geográficas do país. É possível que um determinado polimorfismo que mostrou estar associado com certa(s) população(ões), não mostre resultados positivos quando investigado numa parcela da população brasileira, pois talvez a percentagem de alelos oriundos daquele grupo étnico não esteja significativamente representada na nossa população.

O *background* étnico é de notável importância em estudos como o nosso, pois sabemos que as frequências alélicas variam dentre as populações. Dessa maneira, se um alelo em questão for encontrado associado à DA em uma população, pode ser que esse achado não seja replicável em uma população a qual possua frequências alélicas muito pequenas para dado polimorfismo. Não somente pelo fato de o alelo estar ou não estar presente naquela amostra, mas também é essencial considerar que os genes trabalham em conjunto e que podem ter seu funcionamento alterado a depender do *background* molecular em que se encontram (Holmes *et al.*, 2003).

Todo o conjunto de genes deve ser considerado para podermos estabelecer uma associação, ou seja, por mais que a frequência alélica de determinado polimorfismo seja idêntica entre duas populações distintas, a associação pode não ser positiva para ambas as populações, pois o conjunto dos demais alelos de outros genes que sintetizam proteínas da mesma bioquímica pode ser diferente, resultando em cenários distintos. Além do que, é necessário ainda, considerar as diferenças ambientais às quais as populações estão submetidas, pois elas podem também influenciar o surgimento de uma patologia, especialmente em se tratando de doenças complexas.

Uma vez encontrada associação positiva é fundamental que sejam realizados estudos funcionais *in vitro* e *in vivo* que mostrem o efeito desta variação na modificação do transcriptoma celular na conformação ou função protéica e na via bioquímica em questão a fim de elucidar o papel biológico da variante. Resultados como os que encontramos, e todos aqueles dos quais partimos como referência nos ajudam, no entanto, a especular qual(is) gene(s) esteja(m) potencialmente envolvido(s) com a doença. É necessário aceitar que a associação de um polimorfismo pode ser apenas mero reflexo, por exemplo, de um promotor desregulado (daquele ou ainda de outro gene), ou talvez de uma região de ligação de enzimas relevantes no processo de transcrição, e não sinal de que a variante atue diretamente como causadora do processo patológico.

Outra questão importante que deve ser abordada se refere ao tamanho amostral utilizado em nosso estudo. Ainda que tenhamos adquirido parte das

amostras sob colaboração do grupo do Dr. Paulo Bertolucci, da Faculdade de Medicina da UNIFESP, não foi possível reunir um número de amostras muito superior a 200 indivíduos dentre controles e pacientes com doença de Alzheimer. Compreendemos que o fato de nossa casuística ser modesta limita em parte o estudo, pois enfraquece a confiabilidade estatística sobre o que foi observado, porém não o inviabiliza. Acreditamos que para a maioria dos casos, se uma associação for consistente, ela deverá se revelar, ainda que a amostra seja pequena. Outro argumento que trazemos aqui para sustentar a validade de nossos resultados, é que as associações encontradas não são inéditas. Em outro momento, ao menos algum outro grupo de pesquisa, utilizando de pacientes com o mesmo perfil clínico, e com número amostral substancial, encontrou significância nas associações, o que sustenta nossos achados. Além do mais, os pacientes de nosso ambulatório estão em segmento há quatro anos em média, e não podemos deixar de lembrar que o diagnóstico para a doença de Alzheimer é um tanto quanto difícil de estabelecer, de forma que tentamos justificar nosso número amostral reduzido com um diagnóstico muito próximo do ideal; uma vez que muitos pacientes portadores de outras formas de demência (como por exemplo, demência vascular, ou mesmo DA mista com outras formas de demência) foram excluídos de nossa casuística.

É possível que os estudos de associação elucidem o “perfil genético” típico do futuro paciente de DA, e com isso, por mais que não se possa mudar a genética de um indivíduo, talvez possamos traçar um perfil de vida com adequações ambientais, por exemplo, que possam retardar ao máximo o surgimento da doença ou contribuir para sintomas mais amenos. As Intervenções terapêuticas disponíveis atualmente para DA (como os medicamentos Memantina e Rivastigmina, por exemplo), talvez não apresentem resultados satisfatórios por serem administradas apenas em um momento no qual os danos neurológicos já estão instaurados. Benefícios maiores poderiam advir caso a intervenção medicamentosa fosse realizada mais precocemente. Sabemos que a população brasileira está envelhecendo, como resultado dos avanços da medicina e também de melhora na qualidade de vida no país. Com base nas taxas de progressão da doença e com o aumento exponencial do risco de acordo com a idade, há uma série de pesquisadores que acreditam que é apenas questão de tempo para que um indivíduo desenvolva DA; bastaria viver o suficiente. Se isso for verdade, e a população brasileira passar a viver o suficiente, o custo para o sistema de saúde no Brasil arcar com as despesas geradas pela doença certamente seria de ordem elevada.

Conclusões

Como conclusões finais, o trabalho nos permitiu que:

- Determinássemos as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos selecionados nos genes *APOE*, *ACE*, *APP*, *BDNF*, *CALHM1*, *CST3*, *GAB2*, *GAPDH*, *GSK3B*, *GSTP1*, *IL1A*, *IL1B*, *SORL1*, em pacientes com DA e controles idosos;
- Encontramos associações positivas entre os polimorfismos rs429358 e rs7412 de *APOE* ($p < 0,0001$), rs2373115 de *GAB2* ($p = 0,009$) rs6438552 de *GSK3B* ($p = 0,019$) e rs641120 de *SORL1* ($p = 0,026$) como possíveis fatores genéticos de risco para a doença de Alzheimer. Para esses polimorfismos, ampliamos a investigação para pacientes com CCL; o acompanhamento a longo prazo dessa amostra nos permitirá inferir se haverá maior taxa de conversão para DA naqueles indivíduos portadores dos alelos de risco;
- Inferíssemos que para todos os polimorfismos investigados, com exceção do rs1064039 de *CST3*, ao menos um genótipo transforma-se em fator genético de risco para DA se estiver atuando sinergicamente com ao menos um alelo *APOE**E4.

Resumo

A doença de Alzheimer (DA) é complexa e de etiologia desconhecida. Provavelmente componentes multifatoriais influenciam no desencadeamento dessa patologia, sendo que o único fator genético de risco bem estabelecido até o momento para a doença é a variante alélica *APOE**E4. Nos últimos anos, descobriu-se uma série de polimorfismos em genes diferentes sugerindo que essas alterações possam ter participação discreta na patologia.

O presente estudo avaliou vinte e um polimorfismos distribuídos em treze genes, sendo estes *APOE*, *ACE*, *APP*, *BDNF*, *CALHM1*, *CST3*, *GAB2*, *GAPDH*, *GSK3B*, *GSTP1*, *IL1A*, *IL1B* e *SORL1*, em pacientes, controles idosos e indivíduos com comprometimento cognitivo leve, na tentativa de verificar se existe algum tipo de associação entre os polimorfismos investigados como fatores de risco para DA. Nossos resultados mostraram associações positivas entre cinco polimorfismos conferindo risco elevado para o desenvolvimento de DA (rs429358 e rs7412 de *APOE*, rs2373115 de *GAB2*, rs6438552 de *GSK3B* e rs641120 de *SORL1*). Outro achado consistente de nosso estudo foi que 20/21 polimorfismos estudados apresentaram ao menos um genótipo associado com risco elevado para DA na presença de um alelo *APOE**E4.

Com nosso trabalho contribuímos para aumentar o conhecimento sobre a etiologia da DA, identificando possíveis marcadores moleculares de suscetibilidade nessa patologia.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is complex, and its etiology is not completely understood yet. It is likely that multifactorial components do account for this pathology development, being the allelic variant APOE*E4 is the only well-established genetic risk factor so far. Recently, a series of polymorphisms located at different genes were related to AD, suggesting that those variations might have a modest participation in this pathology.

The present study evaluated twenty-one polymorphisms distributed in thirteen genes, being them *APOE*, *ACE*, *APP*, *BDNF*, *CALHM1*, *CST3*, *GAB2*, *GAPDH*, *GSK3B*, *GSTP1*, *IL1A*, *IL1B* and *SORL1*, in elderly controls, AD and mild cognitive impairment patients, attempting to verify if there is any kind of association between the selected polymorphisms as risk factors for AD. Our results show positive associations between five polymorphisms and AD (*APOE* rs429358 and rs7412, *GAB2* rs2373115, *GSK3B* rs6438552 and *SORL1* rs641120). Another consistent finding was that 20/21 polymorphisms analyzed showed at least one genotype associated with increased risk for AD at the presence of at least one APOE*E4 allele.

We intend that our research might contribute to increase what is known about AD etiology, by deciphering possible molecular susceptibility markers evolved with this pathology.

Trabalhos apresentados em Congressos

Evento: Silver Congress of the International Psychogeriatric Association

Título: Association of GAPDH, GSTP1 and APOE polymorphisms in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment patients.

Autores: Giselle Izzo, Camila C. Kukita, Orestes V. Forlenza, Wagner F. Gattaz e Elida Benquique Ojopi

Forma de apresentação: oral

Local: Osaka, Japão

Data: 14 a 18 de outubro de 2007

Evento: Prêmio IPq 2007

Título: Associação dos polimorfismos de GAPDH, GSTP1 e APOE em pacientes de Doença de Alzheimer e Comprometimento Cognitivo Leve.

Autores: Giselle Izzo, Camila Kukita, Orestes Vicente Forlenza, Paulo Bertolucci, Leda Talib, Breno Diniz, Wagner Gattaz e Elida Paula Benquique Ojopi.

Forma de apresentação: pôster

Local: São Paulo/SP, Brasil

Data: 08 de novembro de 2007

Evento: VI RPDA (Reunião de Pesquisadores em doença de Alzheimer e desordens relacionadas)

Título: Associação dos polimorfismos de GAPDH, GSTP1 e APOE em pacientes de doença de Alzheimer e Comprometimento Cognitivo Leve.

Autores: Giselle Izzo, Camila Kukita, Orestes Vicente Forlenza, Paulo Bertolucci, Leda Talib, Breno Diniz, Wagner Gattaz e Elida Paula Benquique Ojopi.

Forma de apresentação: oral

Local: Ouro Preto/MG, Brasil

Data: 06 a 08 de dezembro de 2007

Evento: 11th International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD)

Título: *GAB2*, *GSTP1*, *BDNF*, *GAPDH*, and *APOE* polymorphisms and their potential role on late onset Alzheimer's Disease.

Autores: Giselle Izzo, Camila Kukita, Orestes Vicente Forlenza, Paulo Bertolucci, Leda Talib, Breno Diniz, Wagner Gattaz e Elida Paula Benquique Ojopi.

Forma de apresentação: pôster

Local: Chicago/IL, EUA

Data: 26 a 31 de julho de 2008

Evento: 9th World Congress of Biological Psychiatry

Título: *GAB2*, *GSTP1*, *SORL1*, *BDNF*, *GAPDH* and *APOE*, polymorphisms associated with late onset Alzheimer disease.

Autores: Giselle Izzo, Camila Kukita, Orestes Vicente Forlenza, Paulo Bertolucci, Leda Talib, Breno Diniz, Wagner Gattaz e Elida Paula Benquique Ojopi.

Forma de apresentação: oral

Local: Paris, França

Data: 28 de junho a 2 de julho de 2009

Evento: XVII World Congress of Psychiatric Genetics

Título: *GAB2*, *GSTP1*, *SORL1*, *BDNF*, *GAPDH* and *APOE*, polymorphisms associated with late onset Alzheimer disease.

Autores: Giselle Izzo, Camila Kukita, Orestes Vicente Forlenza, Paulo Bertolucci, Leda Talib, Breno Diniz, Wagner Gattaz e Elida Paula Benquique Ojopi.

Forma de apresentação: pôster

Local: San Diego/CA, EUA

Data: 4 a 8 de novembro de 2009

Trabalho submetido para publicação

Título: Effect of brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and serum levels on the progression of mild cognitive impairment.

Autores: Orestes Vicente Forlenza, Breno Satler Diniz, Antonio Lucio Teixeira, Elida Benquique Ojopi, Leda Leme Talib, Vanessa Amaral Mendonça, Giselle Izzo, Wagner Farid Gattaz.

Revista: *World Journal of Biological Psychiatry*.

Trabalho em fase final de preparação

Título: Association of GAB2 with increased risk for developing late onset Alzheimer's Disease

Autores: Giselle Izzo, Camila Kukita, Orestes Vicente Forlenza, Paulo Bertolucci, Leda Talib, Breno Diniz, Wagner Gattaz e Elida Paula Benquique Ojopi

Revista: Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry

Apêndice: Lista de Abreviações

A β – Beta-amilóide

AINES – antiinflamatórios não-esteroidais

APOE – apolipoproteína E

ACE – angiotensin I converting enzyme

APP – amyloid precursor protein

BDNF – brain-derived neurotrophic factor

CALHM1 – calcium homeostasis modulator 1

CCL – comprometimento cognitivo leve

CST3 – cystatin C

DA – doença de Alzheimer

DP – desvio padrão

GAB2 – GRB-associated Binding Protein 2

GAPDH – Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GSK3B – Glycogen synthase kinase-3

GST – glutathione s-transferase

GSTP1 – glutathione s-transferase pi 1

HWE – Equilíbrio de Hardy-Weinberg

IC – intervalo de confiança

IL1A – interleucina 1-alfa

IL1B – interleucina 1-beta

OMIM – Online Mendelian inheritance In Men

pb – pares de bases

PCR – polymerase chain reaction

RR – risco relativo

SNC – sistema nervoso central

SNP – single nucleotide polymorphism

SORL1 – sortilin-related receptor, L (DLR class) A repeats-containing

Referências Bibliográficas

Athan ES, Lee JH, Arriaga A, Mayeux RP, Tycko B. **Polymorphisms in the promoter of the human APP gene: functional evaluation and allele frequencies in Alzheimer disease.** Arch Neurol; Nov;59(11):1793-9, 2002

Almeida OP, Shimokomaki CM. **Apolipoprotein E4 and Alzheimer's disease in São Paulo-Brazil.** Arq Neuropsiquiatr; 55(1):1-7, 1997

Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, Gotthardt M, Spoelgen R, Behlke J, von Arnim CA, Breiderhoff T, Jansen P, Wu X, Bales KR, Cappai R, Masters CL, Gliemann J, Mufson EJ, Hyman BT, Paul SM, Nykjaer A, Willnow TE. **Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein.** Proc Natl Acad Sci; 20;102(38):13461-6, 2005

Applied Biosystems **Product Bulletin TaqMan Genotyping Assays** http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_040597.pdf; 2008

Arnáiz E, Almkvist O **Neuropsychological features of mild cognitive impairment and preclinical Alzheimer's disease** Acta Neurol Scand Suppl; 179:34-41, 2003

Balding, DJ **A tutorial on statistical methods for population association studies.** Nat Rev Genet; Oct;7(10):781-91, 2006

Beecham GW, Schnetz-Boutaud N, Haines JL, Pericak-Vance MA. **CALHM1 polymorphism is not associated with late-onset Alzheimer disease.** Ann Hum Genet; May;73(Pt 3):379-81, 2009

Benjamin R, Leake A, McArthur FK, Ince PG, Candy JM, Edwardson JA, Morris CM, Bjertness E. **Protective effect of apoE epsilon 2 in Alzheimer's disease.** Lancet; Aug 13;344(8920):47, 1994

Bernardini S, Bellincampi L, Ballerini S, Federici G, Iori R, Trequattrini A, Ciappi F, Baldinetti F, Bossu P, Caltagirone C, Spalletta G. **Glutathione S-transferase P1 *C allelic variant increases susceptibility for late-onset Alzheimer disease: association study and relationship with apolipoprotein E epsilon4 allele.** Clinical Chemistry; 51(6):944-51, 2005

Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. **Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database.** Nat Genet; 39(1): 17-23, 2007

Bertram L, Tanzi RE. **Of replications and refutations: the status of Alzheimer's disease genetic research.** Curr Neurol Neurosci Rep; 1(5):442-50, 2001

Bettens K, Brouwers N, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Sleegers K. **SORL1 is genetically associated with increased risk for late-onset alzheimer disease in the Belgian population.** Hum Mutat; 29(5):769-70, 2008

Beyer K, Lao JI, Gómez M, Riutort N, Latorre P, Mate JL, Ariza A. **Alzheimer's disease and the cystatin C gene polymorphism: an association study.** Neurosci Lett; Nov 23;315(1-2):17-20, 2001

Borroni B, Grassi M, Archetti S, Costanzi C, Bianchi M, Caimi L, Caltagirone C, Di Luca M, Padovani A. **BDNF Genetic Variations Increase the Risk of Alzheimer's Disease-Related Depression** J Alzheimers Dis; Aug 3 [Epub ahead of print], 2009

Bosco P, Guéant-Rodríguez RM, Anello G, Romano A, Namour B, Spada RS, Caraci F, Tringali G, Ferri R, Guéant JL. **Association of IL-1 RN*2 allele and methionine synthase 2756 AA genotype with dementia severity of sporadic Alzheimer's disease.** J Neurol Neurosurg Psychiatry; Jul;75(7):1036-8, 2004

Breitner JC, Gau BA, Welsh KA, Plassman BL, McDonald WM, Helms MJ, Anthony JC. **Inverse association of anti-inflammatory treatments and Alzheimer's disease: initial results of a co-twin control study.** Neurology; Feb;44(2):227-32, 1994

Cardon LR, Bell JL. **Association study designs for complex diseases.** Nat Rev Genet; 2(2):91-9, 2001

Cathcart HM, Huang R, Lanham IS, Corder EH, Poduslo SE. **Cystatin C as a risk factor for Alzheimer disease.** Neurology; Feb 22;64(4):755-7, 2005

Cedazo-Minguez A, Cowburn RF. **Apolipoprotein E: a major piece in the Alzheimer's disease puzzle.** J Cell Mol Med; 3:254-266, 2001

Chapuis J, Hannequin D, Pasquier F, Benthani P, Brice A, Leber I, Frebourg T, Deleuze JF, Cousin E, Thaker U, Amouyel P, Mann D, Lendon C, Campion D, Lambert JC. **Association study of the GAB2 gene with the risk of developing Alzheimer's disease.** Neurobiol Dis; Apr;30(1):103-6, 2008

Chen K, Reiman EM, Alexander GE, Caselli RJ, Gerkin R, Bandy D, Domb A, Osborne D, Fox N, Crum WR, Saunders AM, Hardy J. **Correlations between apolipoprotein E epsilon4 gene dose and whole brain atrophy rates.** Am J Psychiatry; 164(6):916-21, 2007

Cheng CY, Hong CJ, Liu HC, Liu TY, Tsai SJ **Study of the association between Alzheimer's disease and angiotensin-converting enzyme gene polymorphism using DNA from lymphocytes** Eur Neurol. 2002;47(1):26-9.

Chuo LJ, Sheu WH, Pai MC, Kuo YM. **Genotype and plasma concentration of cystatin C in patients with late-onset Alzheimer disease.** Dement Geriatr Cogn Disord; 23(4):251-7, 2007

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. **Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.** Science; Aug 13;261(5123):921-3, 1993

Crawford FC, Freeman MJ, Schinka JA, Abdullah LI, Gold M, Hartman R, Krivian K, Morris MD, Richards D, Duara R, Anand R, Mullan MJ. **A polymorphism in the cystatin C gene is a novel risk factor for late-onset Alzheimer's disease.** Neurology; Sep 26;55(6):763-8, 2000

Dreses-Werringloer U, Lambert JC, Vingtdeux V, Zhao H, Vais H, Siebert A, Jain A, Koppel J, Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Pasquier F, Galimberti D, Scarpini E, Mann D, London C, Campion D, Amouyel P, Davies P, Fosskett JK, Campagne F, Marambaud P **A polymorphism in CALHM1 influences Ca²⁺ homeostasis, Abeta levels, and Alzheimer's disease risk.** Cell; Jun 27;133(7):1149-61, 2008

Dinarello CA. **Biologic bases for interleukin-1 in disease.** Blood; 87(6):2095–147, 1996

Du Y, Dodel RC, Eastwood BJ, Bales KR, Gao F, Lohmüller F, Müller U, Kurz A, Zimmer R, Evans RM, Hake A, Gasser T, Oertel WH, Griffin WS, Paul SM, Farlow MR. **Association of an interleukin 1 alpha polymorphism with Alzheimer's disease.** Neurology; Aug 22;55(4):480-3, 2000

Ehlers MRW, Riordan JF. **Angiotensin-converting enzyme: new concepts concerning its biological role.** Biochemistry. 28:5311-5318, 1989

Erdos EG, Skidgel RA. **The angiotensin I-converting enzyme.** Lab. Invest. 56:345-348, 1987

Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Persson H, Lindvall O. **Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis.** Neuron; 7(1):165-76, 1991

Evans AE, Poirier O, Kee F, Lecerf L, McCrum E, Falconer T, Crane J, O'Rourke DF, Cambien F. **Polymorphisms of the angiotensin-converting-enzyme gene in subjects who die from coronary heart disease.** Q J Med; Apr;87(4):211-4, 1994

Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM. **Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium.** J Am Med Assoc; 278(16):1349-56, 1997

Federoff HJ. **Alzheimer's disease: reducing the burden with ApoE2.** Gene Ther. 2005 Jul;12(13):1019-29, 2005

Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, Fiske A, Pedersen NL. **Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease.** Arch Gen Psychiatry; Feb;63(2):168-74, 2006

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L. **Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease.** Nature; 21;349(6311):704-6, 1991

Gratacòs M, González JR, Mercader JM, de Cid R, Urretavizcaya M, Estivill X. **Brain-derived neurotrophic factor Val66Met and psychiatric disorders: meta-analysis of case-control studies confirm association to substance-related disorders, eating disorders, and schizophrenia.** Biol Psychiatry; 1;61(7):911-22, 2007

Grimaldi LM, Casadei VM, Ferri C, Veglia F, Licastro F, Annoni G, Biunno I, De Bellis G, Sorbi S, Mariani C, Canal N, Griffin WS, Franceschi M. **Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism.** Ann Neurol; Mar 1;47(3):361-5, 2000

Guerini FR, Beghi E, Riboldazzi G, Zangaglia R, Pianezzola C, Bono G, Casali C, Di Lorenzo C, Agliardi C, Nappi G, Clerici M, Martignoni E **BDNF Val66Met polymorphism**

is associated with cognitive impairment in Italian patients with Parkinson's disease. Eur J Neurol; Nov;16(11):1240-5, 2009

Gunstad J, Benitez A, Smith J, Glickman E, Spitznagel MB, Alexander T, Juvancic-Heltzel J, Murray L. **Serum brain-derived neurotrophic factor is associated with cognitive function in healthy older adults.** J Geriatr Psychiatry Neurol; 21(3):166-70, 2008

Guyant-Maréchal L, Rovelet-Lecrux A, Goumidi L, Cousin E, Hannequin D, Raux G, Penet C, Ricard S, Macé S, Amouyel P, Deleuze JF, Frebourg T, Brice A, Lambert JC, Campion D. **Variations in the APP gene promoter region and risk of Alzheimer disease.** Neurology; 27;68(9):684-7, 2007

Haass C, Selkoe DJ. **Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide.** Cell; 17;75(6):1039-42, 1993

Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L, **Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study** Lancet Neurol; 5(3):228-234, 2006

Hayes JD, Strange RC. **Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences.** Pharmacology; 61(3):154-66, 2000

Herrera E Jr, Caramelli P, Silveira AS, Nitrini R. **Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population.** Alzheimer Dis Assoc Disord; 16(2):103-8, 2002

Herrera E Jr, Caramelli P, Nitrini R. **Estudo epidemiológico populacional de demência na cidade de Catanduva – Estado de São Paulo – Brasil.** Rev Psiquiatria Clin; 25:70-73, 1998.

Holmes A, Lit Q, Murphy DL, Gold E, Crawley JN. **Abnormal anxiety-related behavior in serotonin transporter null mutant mice: the influence of genetic background** Genes Brain Behav; Dec;2(6):365-80, 2003

Hoshi M, Takashima A, Noguchi K, Murayama M, Sato M, Kondo S, Saitoh Y, Ishiguro K, Hoshino T, Imahori K **Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain.** Proc Natl Acad Sci USA; Apr 2;93(7):2719-23, 1996

Huang EJ, Reichardt LF. **Neurotrophins: roles in neuronal development and function.** Annu Rev Neurosci; 24:677-736, 2001

Huang Y. **Apolipoprotein E and Alzheimer disease** Neurology 66 (suppl 1); S79-S85, 2006

Hunter DJ, Altshuler D, Rader DJ. **From Darwin's finches to canaries in the coal mine - mining the genome for new biology.** N Engl J Med; Jun 26;358(26):2760-3, 2008

Hye A, Kerr F, Archer N, Foy C, Poppe M, Brown R, Hamilton G, Powell J, Anderton B, Lovestone S **Glycogen synthase kinase-3 is increased in white cells early in Alzheimer's disease.** Neurosci Lett; Jan 3;373(1):1-4, 2005

Hyman SE, **A glimmer of light for neuropsychiatric disorders.** Nature; 16;455(7215):890-3, 2008

Ignatius MJ, Gebicke-Härter PJ, Skene JH, Schilling JW, Weisgraber KH, Mahley RW, Shooter EM. **Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration** Proc Natl Acad Sci USA; Feb;83(4):1125-9, 1986

Ikram MA, Liu F, Oostra BA, Hofman A, van Duijn CM, Breteler MM. **The GAB2 Gene and the Risk of Alzheimer's Disease: Replication and Meta-Analysis.** Biol Psychiatry; Jun 1;65(11):995-9, 2009

Katzman R. **Alzheimer's Disease.** The New England Journal of Medicine; 314:964-973, 1986

Kehoe PG, Russ C, McIlroy S, Williams H, Holmans P, Holmes C, Liolitsa D, Vahidassr D, Powell J, McGleenon B, Liddell M, Plomin R, Dynan K, Williams N, Neal J, Cairns NJ, Wilcock G, Passmore P, Lovestone S, Williams J, Owen MJ. **Variation in DCP1, encoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer disease.** Nat Genet; Jan;21(1):71-2, 1999

Kim S, Misra A. **SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications.** Annu. Rev. Biomed. Eng; 9:289–320, 2007

Kölsch H, Jessen F, Freymann N, Kreis M, Hentschel F, Maier W, Heun R **ACE I/D polymorphism is a risk factor of Alzheimer's disease but not of vascular dementia** Neurosci Lett; Mar 22;377(1):37-9, 2005

Kwok JB, Hallupp M, Loy CT, Chan DK, Woo J, Mellick GD, Buchanan DD, Silburn PA, Halliday GM, Schofield PR. **GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease.** Ann Neurol; Dec;58(6):829-39, 2005

Laske C, Stransky E, Leyhe T, Eschweiler GW, Wittorf A, Richartz E, Bartels M, Buchkremer G, Schott K. **Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease.** J Neural Transm; 113(9):1217-24, 2006

Lee JH, Cheng R, Schupf N, Manly J, Lantigua R, Stern Y, Rogaeva E, Wakutani Y, Farrer L, St George-Hyslop P, Mayeux R. **The association between genetic variants in SORL1 and Alzheimer disease in an urban, multiethnic, community-based cohort.** Arch Neurol; 64(4):501-6, 2007

de Leon, MJ, Klunk W **Biomarkers for the early diagnosis of Alzheimer's disease** The Lancet Neurology; 5(3):198-199, 2006

Li WH, Sadler LA. **Low nucleotide diversity in man.** Genetics; 129:513–23, 1991

Li Y, Rowland C, Catanese J, Morris J, Lovestone S, O'donovan MC, Goate A, Owen M, Williams J, Grupe A. **SORL1 variants and risk of late-onset alzheimer's disease.** Neurobiol Dis; 29(2):293-296, 2008

Lin PI, Martin ER, Bronson PG, Browning-Large C, Small GW, Schmechel DE, Welsh-Bohmer KA, Haines JL, Gilbert JR, Pericak-Vance MA **Exploring the association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and Alzheimer disease** Neurology; Jul 11;67(1):64-8, 2006

Lovell MA, Xie C, Markesbery WR. **Decreased glutathione transferase activity in brain and ventricular fluid in Alzheimer's disease.** Neurology; 51(6):1562-6, 1998

Lv H, Jia L, Jia J. **Promoter polymorphisms which modulate APP expression may increase susceptibility to Alzheimer's disease.** Neurobiol Aging; Feb;29(2):194-202, 2008

Mahley RW, **Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology.** Science; 240(4852):622-30, 1988

Mahley RW, Huang Y. **Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond.** Curr Opin Lipidol; 10(3):207-17, 1999

Manly JJ, Tang MX, Schupf N, Stern Y, Vonsattel JPG, Mayeux R **Frequency and Course of Mild Cognitive Impairment in a Multiethnic Community** Ann Neurol; April; 63(4): 494–506, 2008

Mateo I, Infante J, Llorca J, Rodríguez E, Berciano J, Combarros O **Association between glycogen synthase kinase-3 β genetic polymorphism and late-onset Alzheimer's disease.** Dement Geriatr Cogn Disord; 21(4):228-32, 2006

Mazzola JL, Sirover MA. **Reduction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in Alzheimer's disease and in Huntington's disease fibroblasts.** J Neurochem; 76(2):442-9, 2001

Mendes CT, Mury FB, de Sá Moreira E, Alberto FL, Forlenza OV, Dias-Neto E, Gattaz WF **Lithium reduces Gsk3 β mRNA levels: implications for Alzheimer Disease.** Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci; Feb;259(1):16-22, 2009

McIntosh AM, Moorhead TW, McKirdy J, Sussmann JE, Hall J, Johnstone EC, Lawrie SM. **Temporal grey matter reductions in bipolar disorder are associated with the BDNF Val66Met polymorphism** Mol Psychiatry; Oct;12(10):902-3, 2007

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. **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(7):939-44, 1984

Minster RL, Demirci FY, DeKosky ST, Kamboh MI. **No association between CALHM1 variation and risk of Alzheimer disease.** Hum Mutat; Apr;30(4):E566-9, 2009

Mukai F, Ishiguro K, Sano Y, Fujita SC **Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 β .** J Neurochem; Jun;81(5):1073-83, 2002

Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD. **A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease.** Science; 4;254(5028):97-9, 1991

Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. **Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease.** Prog Neurobiol; 63(1):71-124, 2001

Myers AJ, Goate AM. **The genetics of late-onset alzheimer's disease.** Curr Opin Neurol; 14(4):433-40, 2001

Nacmias B, Tedde A, Bagnoli S, Cellini E, Guarnieri BM, Piacentini S, Sorbi S. **Implication of GAB2 gene polymorphism in Italian patients with Alzheimer's disease.** J Alzheimers Dis; Mar;16(3):513-5, 2009

Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE. **Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro.** Science; May 6;264(5160):850-2, 1994

Nawrot B. **Targeting BACE with small inhibitory nucleic acids - a future for Alzheimer's disease therapy?** Acta Biochim Pol; 51(2):431-44, 2004

Nickerson DA, Taylor SL, Weiss KM, Clark AG, Hutchinson RG, *et al.* **DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene.** Nat Genet; 19:233-40, 1998

Nizzari M, Venezia V, Repetto E, Caorsi V, Magrassi R, Gagliani MC, Carlo P, Florio T, Schettini G, Tacchetti C, Russo T, Diaspro A, Russo C. **Amyloid precursor protein and Presenilin1 interact with the adaptor GRB2 and modulate ERK 1,2 signaling.** J Biol Chem; 4;282(18):13833-44, 2007

Ojopi EPB, Bertoncini AB, Dias Neto, E. **Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer.** Rev Psiqu Clin; 31(1):26-33, 2004

Oyama R, Yamamoto H, Titani, K. **Glutamine synthetase, hemoglobin alpha-chain, and macrophage migration inhibitory factor binding to amyloid beta-protein: their identification in rat brain by a novel affinity chromatography and in Alzheimer's disease brain by immunoprecipitation.** Biochimica et biophysica acta; 1479(1-2):91-102, 2000

Patel NV, Gordon MN, Connor KE, Good RA, Engelman RW, Mason J, Morgan DG, Morgan TE, Finch CE. **Caloric restriction attenuates Abeta-deposition in Alzheimer transgenic models.** Neurobiol Aging; Jul;26(7):995-1000, 2005

Petersen RC., Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. **Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome.** Archives of Neurology; 56(3):303-8, 1999

Phillips HS, Hains JM, Armanini M, Laramée GR, Johnson SA, Winslow JW. **BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease.** Neuron; 7(5):695-702, 1991

Pinhel MA, Nakazone MA, Cação JC, Piteri RC, Dantas RT, Godoy MF, Godoy MR, Tognola WA, Conforti-Froes ND, Souza D. **Glutathione S-transferase variants increase**

susceptibility for late-onset alzheimer's disease: association study and relationship with apolipoprotein E epsilon4 allele. Clin Chem Lab Med; 46(4):439-45, 2008

Raber, J. **AR, apoE and cognitive function.** Horm Behav; 53(5):706-15, 2008

Raber J, Wong D, Yu GQ, Buttini M, Mahley RW, Pitas RE, Mucke L. **Apolipoprotein E and cognitive performance.** Nature; Mar 23;404(6776):352-4, 2000

Rebeck GW. **Confirmation of the genetic association of interleukin-1A with early onset sporadic Alzheimer's disease.** Neurosci Lett; Oct 20;293(1):75-7, 2000

Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. **An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels.** J Clin Invest; Oct;86(4):1343-6, 1990

Reiman EM, Webster JA, Myers AJ, Hardy J, Dunckley T, Zismann VL, Joshipura KD, Pearson JV, Hu-Lince D, Huentelman MJ, Craig DW, Coon KD, Liang WS, Herbert RH, Beach T, Rohrer KC, Zhao AS, Leung D, Bryden L, Marlowe L, Kaleem M, Mastroeni D, Grover A, Heward CB, Ravid R, Rogers J, Hutton ML, Melquist S, Petersen RC, Alexander GE, Caselli RJ, Kukull W, Papassotiropoulos A, Stephan DA. **GAB2 alleles modify Alzheimer's risk in APOE epsilon4 carriers.** Neuron; 7;54(5):713-20, 2007

Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, Zou F, Katayama T, Baldwin CT, Cheng R, Hasegawa H, Chen F, Shibata N, Lunetta KL, Pardossi-Piquard R, Bohm C, Wakutani Y, Cupples LA, Cuenco KT, Green RC, Pinessi L, Rainero I, Sorbi S, Bruni A, Duara R, Friedland RP, Inzelberg R, Hampe W, Bujo H, Song YQ, Andersen OM, Willnow TE, Graff-Radford N, Petersen RC, Dickson D, Der SD, Fraser PE, Schmitt-Ulms G, Younkin S, Mayeux R, Farrer LA, St George-Hyslop P. **The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease.** Nature Genetics; 39(2):168-177, 2007

Rogers J, Webster S, Lue LF, Brachova L, Civin WH, Emmerling M, Shivers B, Walker D, McGeer P. **Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis.** Neurobiol Aging; Sep-Oct;17(5):681-6, 1996

Rothwell NJ, Luheshi GN. **Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target.** Trends Neurosci; Dec;23(12):618-25, 2000

Russo C, Dolcini V, Salis S, Venezia V, Violani E, Carlo P, Zambrano N, Russo T, Schettini G. **Signal transduction through tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal fragments**

of APP via an enhanced interaction with Shc/Grb2 adaptor proteins in reactive astrocytes of Alzheimer's disease brain. Ann N Y Acad Sci; 973:323-3, 2002

Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ **Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease.** Neurology; 43(8):1467-72, 1993

Schaffer BA, Bertram L, Miller BL, Mullin K, Weintraub S, Johnson N, Bigio EH, Mesulam M, Wiedau-Pazos M, Jackson GR, Cummings JL, Cantor RM, Levey AI, Tanzi RE, Geschwind DH. **Association of GSK3B with Alzheimer disease and frontotemporal dementia.** Arch Neurol; Oct;65(10):1368-74, 2008

Scherzer CR, Offe K, Gearing M, Rees HD, Fang G, Heilman CJ, Schaller C, Bujo H, Levey AI, Lah JJ. **Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease.** Arch Neurol; 61(8):1200-5, 2004

Schjeide BM, Hooli B, Parkinson M, Hogan MF, Divito J, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE, Bertram L. **GAB2 as an Alzheimer disease susceptibility gene: follow-up of genomewide association results.** Arch Neurol; Feb;66(2):250-4, 2009

Schmidt V, Sporbert A, Rohe M, Reimer T, Rehm A, Andersen OM, Willnow TE. **SorLA/LR11 regulates processing of amyloid precursor protein via interaction with adaptors GGA and PACS-1.** J Biol Chem; 9;282(45):32956-64, 2007

Schulze H, Schuler A, Stuber D, Dobeli H, Langen H, Huber G. **Rat brain glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with the recombinant cytoplasmic domain of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein.** Journal of Neurochemistry; 5:1915-22, 1993

Selkoe DJ, **The molecular pathology of Alzheimer's disease.** Neuron; 6(4):487-98, 1991

Selkoe DJ, Podlisny MB. **Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease.** Annu Rev Genomics Hum Genet; 3:67-99, 2002

Seripa D, Matera MG, Dal Forno G, Gravina C, Masullo C, Daniele A, Binetti G, Bonvicini C, Squitti R, Palermo MT, Davis DG, Antuono P, Wekstein DR, Dobrina A, Gennarelli M, Fazio VM. **Genotypes and haplotypes in the IL-1 gene cluster: analysis of two genetically and diagnostically distinct groups of Alzheimer patients.** Neurobiol Aging; 26(4):455-64, 2005

Shalova IN, Cechalova K, Rehakova Z, Dimitrova P, Ognibene E, Caprioli A, Schmalhausen EV, Muronetz VI, Saso L. **Decrease of dehydrogenase activity of cerebral glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in different animal models of Alzheimer's disease.** Biochim Biophys Acta; 1770(5):826-32, 2007

Sirover MA, **New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.** Biochim. Biophys. Acta; 1432:159–184, 1999

Sleegers K, Bettens K, Brouwers N, Engelborghs S, van Miegroet H, De Deyn PP, Van Broeckhoven C. **Common variation in GRB-associated Binding Protein 2 (GAB2) and increased risk for Alzheimer dementia.** Human Mutation; 29:E338-E344, 2008

Sleegers K, Brouwers N, Bettens K, Engelborghs S, van Miegroet H, De Deyn PP, Van Broeckhoven C. **No association between CALHM1 and risk for Alzheimer dementia in a Belgian population.** Hum Mutat. Apr;30(4):E570-4, 2009

Smith AD, Johnston C, Sim E, Nagy Z, Jobst KA, Hindley N, King E. **Protective effect of apo epsilon 2 in Alzheimer's disease. Oxford Project to Investigate Memory and Ageing (OPTIMA).** Lancet; Aug 13;344(8920):473-4, 1994

Souza DR, de Godoy MR, Hotta J, Tajara EH, Brandão AC, Pinheiro Júnior S, Tognola WA, dos Santos JE. **Association of apolipoprotein E polymorphism in late-onset Alzheimer's disease and vascular dementia in Brazilians.** Braz J Med Biol Res; 36(7):919-23, 2003

Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR **Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells.** Curr Biol; Dec 1;6(12):1664-8, 1996

Stewart WF, Kawas C, Corrada M, Metter EJ **Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use.** Neurology; Mar;48(3):626-32, 1997

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. **Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease.** Proc Natl Acad Sci USA; 1;90(5):1977-81; 1993

Suehiro T, Morita T, Inoue M, Kumon Y, Ikeda Y, Hashimoto K. **Increased amount of the angiotensin-converting enzyme (ACE) mRNA originating from the ACE allele with deletion** Hum Genet; Jul;115(2):91-6, 2004

Sundararaj KP, Wood RE, Ponnusamy S, Salas AM, Szulc Z, Bielawska A, Obeid LM, Hannun YA, Ogretmen B. **Rapid shortening of telomere length in response to ceramide involves the inhibition of telomere binding activity of nuclear glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase** J Biol Chem; Feb 13;279(7):6152-62, 2004

Sundelöf J, Arnlöv J, Ingelsson E, Sundström J, Basu S, Zethelius B, Larsson A, Irizarry MC, Giedraitis V, Rönnekaa E, Degerman-Gunnarsson M, Hyman BT, Basun H, Kilander L, Lannfelt L. **Serum cystatin C and the risk of Alzheimer disease in elderly men** Neurology; Sep 30;71(14):1072-9, 2008

Tan EK, Ho P, Cheng SY, Yih Y, Li HH, Fook-Chong S, Lee WL, Zhao Y. **CALHM1 variant is not associated with Alzheimer's disease among Asians.** Neurobiol Aging. Jun 20 [Epub ahead of print], 2009

Tan EK, Lee J, Chen CP, Teo YY, Zhao Y, Lee WL. **SORL1 haplotypes modulate risk of Alzheimer's disease in Chinese.** Neurobiol Aging; Jul;30(7):1048-51, 2009

Tarze A, Deniaud A, Le Bras M, Maillier E, Molle D, Larochette N, Zamzami N, Jan G, Kroemer G, Brenner C. **GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization.** Oncogene; 18:2606-20, 2007

Vattemi G, Engel WK, McFerrin J, Askanas V **Cystatin C colocalizes with amyloid-beta and coimmunoprecipitates with amyloid-beta precursor protein in sporadic inclusion-body myositis muscles.** J Neurochem; Jun;85(6):1539-46, 2003

Vincent B, Vindebro R, Abrahamson M, von Pawel-Rammingen U. **The human protease inhibitor cystatin C is an activating cofactor for the streptococcal cysteine protease** J Biol Chem; Sep 22;283(9):960-8, 2008

van der Vlies AE, Pijnenburg YA, Koene T, Klein M, Kok A, Scheltens P, van der Flier WM. **Cognitive impairment in Alzheimer's disease is modified by APOE genotype.** Dement Geriatr Cogn Disord; 24(2):98-103, 2007

Wang B, Jin F, Yang Z, Lu Z, Kan R, Li S, Zheng C, Wang L **The insertion polymorphism in angiotensin-converting enzyme gene associated with the APOE epsilon 4 allele increases the risk of late-onset Alzheimer disease** J Mol Neurosci; 30(3):267-71, 2006

Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. **Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution.** Carcinogenesis; 19(2):275-80, 1998

Weiner MP, Gabriel SB, Stephens JC. **Genetic Variation, a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007.