

1 - INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de demência nos países ocidentais^{1,2,3}, e caracteriza-se, do ponto de vista clínico, por distúrbio progressivo de memória, acompanhado de declínio das demais funções cognitivas e por alterações de comportamento. Estes sintomas são decorrentes de processo degenerativo que envolve principalmente a formação hipocampal e áreas corticais associativas⁴. A DA é denominada pré-senil quando os sintomas se iniciam antes dos 65 anos e senil, quando tem início a partir dessa idade⁵.

O quadro neuropatológico da DA caracteriza-se por redução do número de neurônios e de sinapses acompanhada por duas lesões características principais: placas senis e emaranhados neurofibrilares⁶. Os emaranhados neurofibrilares formam-se a partir da hiperfosforilação da proteína tau, que se acha associada a microtúbulos envolvidos no transporte citoplasmático⁷. O principal componente das placas senis é um peptídeo de 39-43 aminoácidos altamente insolúvel, denominado peptídeo β amilóide (β A) que é produto da

clivagem da proteína precursora de amilóide (APP; *amyloid precursor protein*)^{8,9}.

A APP é uma proteína de função desconhecida que permanece na superfície da célula com uma porção transmembrana (Figura 1). A APP pode ser processada por dois mecanismos distintos:

- Por meio da α -secretase, formando o segmento conhecido como APP secretado (APPs), que parece ter funções biológicas como a regulação do crescimento e neuroproteção e, nos casos de APP contendo o domínio inibidor de proteinase Kunitz, pode atuar na coagulação sanguínea¹⁰. A α -secretase provavelmente pertence à família ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*) de metaloproteases^{11,12} e cliva a proteína APP em sua região β A.
- Por meio da β -secretase, identificada como uma protease denominada BACE (*beta-site APP-cleaving enzyme*)^{13,14} e da ação subsequente da γ -secretase que, acredita-se ser a presenilina 1^{15,16}, produzindo o peptídeo β A. O processamento da APP por essas proteases origina tanto a fração solúvel da β A (predominantemente β A₄₀) como a β A altamente fibrilogênico (predominantemente β A₄₂) associado a depósitos amilóides^{6,17,18}.

Múltiplos mecanismos moleculares têm sido postulados para explicar os efeitos neurotóxicos da proteína β A: indução de apoptose por efeito direto na membrana celular, ou indireto, tais como potenciação de efeitos neurotóxicos

de aminoácidos excitatórios e estresse oxidativo por acúmulo de radicais livres^{19,20,21}.

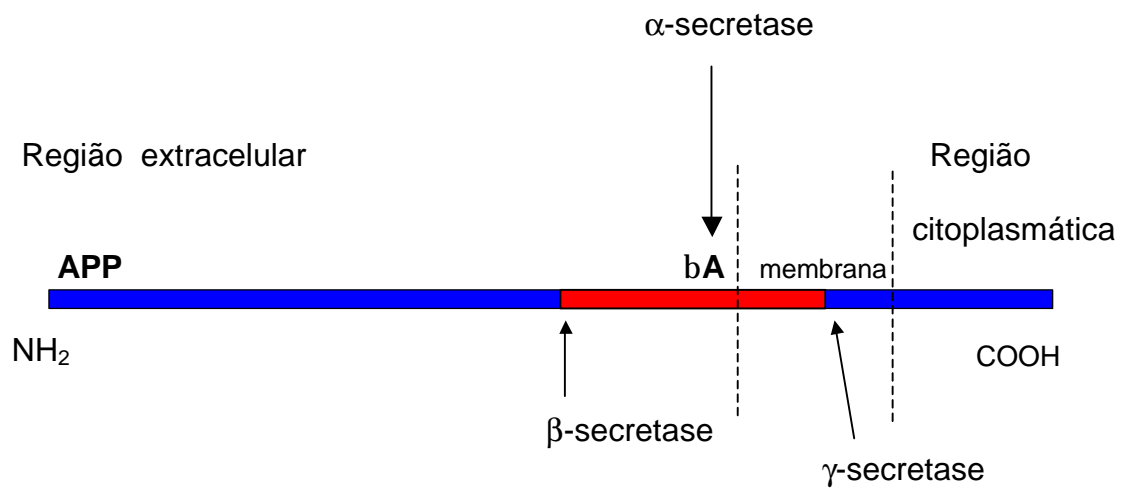


Figura 1. Topologia e processamento da proteína precursora de amilóide

A β A é um produto normal do metabolismo da APP, estando presente no LCR e plasma. Em indivíduos com DA comparados com normais, há aumento na produção de frações insolúveis e amiloidogênicas de β A, ou diminuição de sua depuração^{22,23}.

1.1 - Etiologia genética da DA

A genética da DA é complexa e envolve vários genes:

- Mutações nos genes APP, localizado no cromossomo 21 (cr 21), presenilina 1 (cr 14) e presenilina 2 (cr 1) são relacionadas com DA de início pré-senil familiar, na maioria dos casos, em modelo autossômico dominante de penetrância completa, sendo, portanto, determinantes do desenvolvimento de DA ²⁴.
- Em casos de DA de início senil e também pré-senil, existem evidências do envolvimento de fatores de risco genéticos, sendo o alelo $\epsilon 4$ do gene APOE (cr 19) o principal fator identificado até o momento²⁵. Vários outros fatores de risco já foram estudados, porém, merecem destaque os polimorfismos presentes na região promotora do gene APOE (-491 e -219), que podem interferir na intensidade da expressão da proteína codificada e o polimorfismo C/T da posição 766 do gene da proteína relacionada ao receptor LDL (LRP) que se situa no cromossomo 12.

1.2 - Apolipoproteína E

A apolipoproteína E (apoE) é uma proteína com peso molecular de 34 kDa composta de 299 aminoácidos²⁶. Ela é parte integrante de:

- Lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) sintetizadas principalmente no fígado²⁷ e em macrófagos²⁸ e que atuam no transporte de triglicérides do fígado para os tecidos periféricos;
- Subclasse de lipoproteínas de alta densidade (HDL) que atua no transporte de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado.
- Quilomicrons que atuam no transporte de colesterol e triglicérides absorvidos dos alimentos pelo epitélio intestinal^{29,30}.

A apoE é sintetizada por astrócitos no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso periférico (SNP), sendo encontrada em células satélites do gânglio cervical superior e do gânglio da raiz dorsal, glia entérica e em células de Schwann não envolvidas na mielinização^{31,32,33}. O SNC apresenta a segunda maior concentração de apoE RNAm no organismo, sendo cerca de um terço da detectada no fígado³⁴.

No SNP, a apoE coordena a mobilização e redistribuição de colesterol tanto durante situações de reparo, crescimento e manutenção da mielina como durante o desenvolvimento ou após lesão das membranas neuronais^{35,36,37}. No SNC, a apoE atua na mobilização e redistribuição de colesterol e fosfolípidos

durante o processo de remodelação de membranas, associadas ao mecanismo de plasticidade sináptica ³⁸.

A seqüência da região codificadora da APOE, localizada no cr 19q13.2, é polimórfica, sendo os principais alelos conhecidos como $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$. O alelo $\epsilon 3$ é o mais freqüente na população, sendo os alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 4$ considerados variantes. Os seus produtos são denominados apoE2, apoE3 e apoE4; respectivamente. Esses produtos se diferenciam pela alternância de cisteína (cys) e arginina (arg) nas posições 112 e 158: apoE2: cys-112 cys-158; apoE3: cys-112 arg-158 e apoE4: arg-112 arg-158 ³⁹.

Em 1991, foram encontradas evidências, através de estudo de ligação, da importância do cromossomo 19 no desenvolvimento da DA de início senil familiar ⁴⁰. A partir desse conhecimento e de que a apoE é encontrada em placas senis, emaranhados neurofibrilares intracelulares e em vasos cerebrais de pacientes com DA e da sua alta afinidade de ligação com o peptídeo βA no líquido cefalorraqueano (LCR) desses indivíduos, um grupo de pesquisadores decidiu avaliar a freqüência dos polimorfismos da APOE na DA.

Em 1993, Sttrimatter e colaboradores⁴¹ demonstraram um aumento da freqüência do alelo $\epsilon 4$ da APOE em pacientes com DA de início senil familiar. Ainda em 1993, o mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que essa associação também encontrava-se presente em casos esporádicos da doença ⁴². Um ano depois, evidenciou-se o mesmo efeito em pacientes com início pré-senil da DA ⁴³. Desde então, diversos estudos têm comprovado que a

presença do alelo $\epsilon 4$ da APOE é um importante fator de risco para DA ^{44,45,46,47}, mas as bases moleculares desse achado ainda não são totalmente conhecidas.

Foi demonstrado também que o efeito do alelo $\epsilon 4$ é dose-dependente, tanto com relação ao risco para o desenvolvimento da DA, pois os indivíduos homocigotos apresentam maior risco para a doença com relação aos heterocigotos ^{48,49}, como com relação à diminuição da idade de início da doença em mais de 5 anos por alelo ^{48,50,51}. Contudo, esse último achado é contestado por alguns pesquisadores ^{52,53}.

A frequência e a importância do alelo $\epsilon 4$ como fator de risco para o desenvolvimento de DA é menor em indivíduos idosos muito idosos (*oldest old*), achado esse, confirmado em diversos estudos ^{54,55,56}. Acredita-se que a menor frequência do alelo $\epsilon 4$ nessa faixa etária ocorra por seleção natural, já que sua presença é fator de risco não somente para DA como também para doenças cardiovasculares, que são responsáveis por grande morbidade e mortalidade ^{57,58}.

Com relação ao gênero, é controversa a existência de maior risco de DA entre as mulheres do que entre homens que possuem o alelo $\epsilon 4$ ^{59,60,61}.

Diversos estudos demonstram maior frequência do alelo $\epsilon 2$ em controles do que em indivíduos com DA, sendo, então, considerado um fator protetor contra o desenvolvimento da doença ^{62,63}.

1.2.1 - Envolvimento da apoE na fisiopatologia da DA

Existem diversas hipóteses a respeito de como a apoE está associada à fisiopatologia da DA.

A apoE interfere com a deposição da β A, uma vez que se demonstrou que a quantidade de β A depositada no tecido cerebral variava de acordo com o genótipo da APOE. Isso foi verificado em indivíduos com DA e em outros com síndrome de Down associada à DA ^{64,65,66}.

Acredita-se que a apoE tenha papel regulatório no metabolismo intraneuronal da proteína tau, com a presença do alelo ϵ 4 provocando a sua hiperfosforilação ^{67,68,69}.

Existem evidências de que o alelo ϵ 4 da APOE pode provocar efeitos deletérios tanto em SNC como em SNP quando comparado aos outros alelos. Nathan e colaboradores (1994)⁷⁰ estudaram o efeito da apoE4 e da apoE3 sobre cultura de neurônios obtidos de raiz dorsal de coelhos e observaram que havia menor extensão e ramificação dendrítica dos neurônios incubados com apoE4, quando comparados com os controles e os incubados com apoE3. Em 1997, Arendt e colaboradores⁷¹ mostraram evidências, por meio de estudo anátomo-patológico, de menor plasticidade neuronal, que ocorreria em indivíduos com DA em resposta ao processo degenerativo, no núcleo basal de Meynert, *locus ceruleus*, núcleo magno da rafe, núcleo amigdalóide medial,

núcleo tegmental, pedúnculo pontino e substância negra em pacientes que portavam o alelo $\epsilon 4$ da APOE, sendo o efeito dose-dependente.

Alguns pesquisadores sugeriram que o alelo $\epsilon 4$ interferiria de forma negativa no sistema colinérgico, tendo em vista a menor concentração da enzima colina-acetil transferase (CAT), responsável pela síntese de acetilcolina, em tecido cerebral de indivíduos com DA portadores deste alelo quando comparados com controles^{71,72,73}. Entretanto, esse achado não foi confirmado em outros estudos^{74,75}. Em 1998, Salehi e colaboradores⁷⁶ demonstraram redução no tamanho do complexo de Golgi em neurônios colinérgicos do núcleo basal de Meynert em indivíduos com DA, redução essa mais acentuada em portadores de pelo menos um alelo $\epsilon 4$. Essa diminuição seria uma evidência morfológica da redução do metabolismo neuronal.

Miyata e colaboradores (1996)⁷⁷ demonstraram que a apoE possui efeito antioxidante, mas que a isoforma $\epsilon 4$ tem menor desempenho nessa função. O aumento de marcadores de estresse oxidativo em indivíduos com DA portadores do alelo $\epsilon 4$ foi também demonstrado por outros pesquisadores^{78,79}.

Sabe-se que a presença do alelo $\epsilon 4$ da APOE está relacionada a níveis mais elevados de colesterol total e sua fração LDL, enquanto que a do alelo $\epsilon 2$ teria efeito oposto. No entanto, mais de 85% da variação dos níveis de colesterol da população geral não é dependente do genótipo da APOE⁸⁰.

Várias evidências sugerem que o metabolismo do colesterol interfere na fisiopatologia da DA: alguns estudos mostram maior prevalência de DA em

indivíduos com hipercolesterolemia^{81,82}; o principal fator de risco genético para a doença é o alelo $\epsilon 4$ da APOE, que é uma proteína carreadora de colesterol; o principal receptor da apoE no SNC é o LRP, que pertence à família dos receptores LDL e a presença de aterosclerose aumenta o risco de desenvolver DA⁸³.

Níveis altos de colesterol podem afetar o metabolismo do βA e dessa forma associar-se a maior risco de desenvolvimento de DA^{82,84,85}. Isso pode ser decorrente tanto de alteração na fluidez da membrana plasmática, aumentando a toxicidade da βA por maior influxo iônico celular⁸⁶ como por alteração na clivagem da APP^{87,88}.

No SNC, o colesterol sofre a ação da enzima CYP46, formando 24S-hidroxicolesterol que atravessa a barreira hemato-encefálica e é transportado no plasma até o fígado onde é metabolizado, sendo essa, a principal, mas não a única, via de saída do colesterol do SNC^{89,90}. Os níveis plasmáticos desse esterol podem ser uma indicação de morte neuronal, considerando que o processo degenerativo resulta em aumento da liberação de colesterol pelas membranas celulares⁹¹.

Diversos estudos têm comprovado a menor incidência de DA em usuários de estatinas, que são medicações utilizadas para o controle da hipercolesterolemia por meio da inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA)^{92,93,94}. O uso de estatinas diminui a

concentração plasmática de 24S-hidroxicolesterol, o que pode representar alteração do metabolismo do colesterol cerebral^{95,96}.

As estatinas podem reduzir os níveis de β A40 e β A42 como demonstrado por Fassbender e colaboradores (2001)⁸⁷ tanto in vitro, observando a produção dos peptídeos em cultura de neurônios hipocampais e do córtex, como in vivo, observando a diminuição da concentração dos peptídeos no LCR e no homogenato cerebral de cobaias, efeito esse que revertia assim que a estatina era retirada da ração.

1.2.2 - Estudos epidemiológicos

Diversos estudos indicam que a frequência do alelo ϵ 4 é maior em indivíduos naturais dos Estados Unidos e da região norte da Europa do que em outras regiões^{41,97,98}. A maior frequência populacional do alelo ϵ 4 ocorre na Finlândia e sua presença é fator de risco para DA tanto no subgrupo senil como no pré-senil; além disso, maior frequência desse alelo é observada tanto em casos esporádicos como familiares⁹⁹. Na região sul da Itália, a frequência do alelo é duas vezes maior entre indivíduos com DA esporádico do que entre controles, ao passo que em uma região localizada mais ao norte, a frequência é quatro vezes maior^{63,100}. Estudos norte-americanos mostraram menor frequência do alelo ϵ 4 em afro-americanos e “hispanicos”^{101,102,103}. Menor

freqüência desse alelo é também observada em chineses^{104,105}, indianos¹⁰⁶, espanhóis⁵⁰ e em latino-americanos^{107,108}, incluindo o Brasil^{109,110}. Há grande dificuldade na comparação dos resultados desses estudos pois a metodologia quanto à seleção de pacientes e controles é diversa (Tabela 1).

Andrade e colaboradores (2000)¹¹¹ avaliaram a freqüência dos alelos da APOE e a sua correlação com os níveis lipídicos plasmáticos em residentes em Porto Alegre, Brasil. Estudaram 23 indivíduos com DA provável com média de idade de $72,3 \pm 3,3$ anos, 100 afro-brasileiros com média de idade de $31 \pm 11,5$ anos e 343 caucasianos, com média de idade de $57 \pm 13,1$ anos. A freqüência do alelo $\epsilon 4$ da APOE foi de 0,39 em pacientes, 0,11 em caucasianos e 0,22 em afro-brasileiros. A diferença entre a freqüência do alelo $\epsilon 4$ era significativa entre pacientes e controles caucasianos ($p < 0,001$); porém, havia diferença na faixa etária média entre esses dois grupos. Nessa casuística, o alelo $\epsilon 4$ foi associado com maiores níveis de triglicérides, colesterol total e colesterol não HDL apenas entre mulheres.

A prevalência de DA entre descendentes de africanos residentes nos Estados Unidos é maior do que na população de Ibadan, na Nigéria¹¹², ao contrário do que poderia se esperar pelo baixo nível educacional e sócio-econômico dos africanos. Na população afro-americana, porém, a apoE parece ter pouca importância no risco de DA¹¹³, especulando-se sobre a possibilidade de existência de outros fatores genéticos, relacionados ou não à apoE.

Tabela 1. Frequência do alelo $\epsilon 4$ da APOE em diferentes países

	Países	DA		controles	
		N	$\epsilon 4$	N	$\epsilon 4$
Souza et al., 2003 ¹¹⁰	Brasil	68	0,25	58	0,12
Almeida et al., 1997 ¹⁰⁹	Brasil	43	0,22	56	0,09
Morelli et al., 1996 ¹⁰⁷	Argentina	45	0,22	45	0,08
Jacquier et al., 2001 ¹⁰⁸	Colômbia	83	0,23	44	0,07
Harwood et al., 1999 ¹⁰³	Estados Unidos	188*	0,26	84*	0,14
Strittmatter et al., 1993 ⁴¹	Estados Unidos	83	0,52	91	0,16
Wang et al., 2000 ⁹⁸	Estados Unidos	235	0,30	274	0,11
Mak et al., 1996 ¹⁰⁴	China	65	0,17	82	0,07
Hu et al., 2000 ¹⁰⁵	China	82	0,17	110	0,06
Chandak et al., 2002 ¹⁰⁶	Índia	78	0,19	100	0,08
Panza et al., 2000 ⁶³	Itália (sul)	109	0,19	92	0,10
Sorbi et al., 1994 ¹⁰⁰	Itália (norte)	64	0,40	84	0,08
Adroer et al., 1995 ⁵⁰	Espanha	160	0,29	207	0,06
Slooter et al., 1998 ⁴⁶	Holanda	97	0,20	997	0,15
Lehtovirta et al., 1995 ⁹⁹	Finlândia	202	0,49	55	0,11

DA= doença de Alzheimer

n= número de indivíduos

* amostra composta por 75% de cubanos

1.2.3 - Determinação genotípica da APOE como teste genético para diagnóstico de DA

Estudo multicêntrico conduzido por Mayeux e colaboradores¹¹⁴ demonstraram que a sensibilidade e especificidade da presença do alelo $\epsilon 4$ para o diagnóstico de DA era de 65 e 68%, respectivamente. Nessa amostra, o diagnóstico clínico apresentou sensibilidade de 93% e especificidade de 55%. Associando o diagnóstico clínico ao genótipo da APOE, a sensibilidade diminuiu para 61% e a especificidade aumentou para 84%. Isso deixa claro de que a genotipagem da APOE não deve ser utilizada para o diagnóstico de DA, uma vez que ela apresenta sensibilidade e especificidade baixas. A acurácia do diagnóstico clínico da DA varia, em diferentes estudos, de 80 a 90 %^{115,116,117}.

1.2.4 - ApoE em outras doenças

O alelo $\epsilon 4$ da APOE é descrito também como um fator de risco para doenças vasculares. Apesar de controvérsias, a maioria dos estudos evidencia um discreto risco para doenças ateroscleróticas coronarianas em portadores do alelo $\epsilon 4$ ^{118,119,120}. Kalaria, em 1997¹²¹, estudou, através de necrópsia, alterações ateroscleróticas em 65 indivíduos com diagnóstico de DA e encontrou

evidências de lesões envolvendo ramos da aorta ou doença cardíaca aterosclerótica em 50 pacientes (77%). Entre eles, 31% possuíam pelo menos um alelo $\epsilon 4$, sendo que houve relação significativa entre a presença do alelo $\epsilon 4$ e doença cardíaca ($P=0,005$; $OR=2,5$; $IC95\%= 1,7-3,8$).

Há fraca evidência de associação entre a presença do alelo $\epsilon 4$ e doença aterosclerótica carotídea¹²² e os estudos de correlação entre a presença do alelo $\epsilon 4$ e a ocorrência de doença cerebrovascular são controversos^{123,124,125}. O alelo $\epsilon 2$ é considerado um fator de risco para hemorragia secundária à angiopatía amilóide cerebral¹²⁶.

A maior parte dos estudos demonstra que não há correlação entre a presença do alelo $\epsilon 4$ e a ocorrência de demência vascular^{127,128,129,130}. Entre outras etiologias de demência, as pesquisas mostram que indivíduos com demência com corpúsculos de Lewy mostram frequência intermediária do alelo $\epsilon 4$ entre indivíduos com DA e controles, representando também um fator de risco para essa doença^{131,132,133}. Na demência frontotemporal, o alelo $\epsilon 4$ não se correlaciona com a ocorrência da doença, apesar de alguns estudos demonstrarem diminuição da idade de início na presença do alelo^{135,136,137,138}.

A presença do alelo $\epsilon 4$ condiciona pior prognóstico a curto e longo prazo para os pacientes que sofreram traumatismo cranio-encefálico^{139,140,141}.

Há resultados conflitantes sobre o papel do alelo $\epsilon 4$ na progressão de outras doenças neurodegenerativas, como doença de Parkinson^{142,143,144,145} e doenças desmielinizantes, como a esclerose múltipla^{146,147,148}.

1.3 - Região promotora do gene APOE

Angoti e colaboradores (1994)¹⁴⁹ sugeriram que uma única substituição de bases na região promotora de um gene poderia produzir diferenças no nível de transcrição da proteína, provocando, assim, alterações quantitativas na sua expressão. Em 1998, Bullido e colaboradores¹⁵⁰ estudaram o papel do polimorfismo A/T na posição -491 na região promotora do gene APOE quanto a ocorrência de DA. Nesse estudo inicial, foi encontrada associação entre a presença do genótipo A/A na posição -491 e a ocorrência de DA, sendo que pacientes portadores desse genótipo e não do alelo ϵ 4 apresentavam risco (OR = 4,05; IC95%= (1,65-9,62)). Essa associação era mais fraca em uma sub-amostra americana do que em uma espanhola. Demonstraram também que o alelo -491 A, quando comparado com -491T, era associado a maior expressão de apoE em cultura de células de hepatoma.

Essa correlação foi demonstrada em mais alguns estudos^{98,134,151,152,153,154} mas não encontrada em outros^{155,156,157,158,159,160,161}. Dois dos estudos com resultados negativos apresentaram viés de seleção pois um deles incluiu doentes mentais em seu grupo controle¹⁵⁹ e o outro avaliou somente casos de DA de início pré-senil¹⁵⁵. A presença do genótipo A/A foi considerada um fator de risco para DA no subgrupo pré-senil por Laws e colaboradores (1999)¹⁵⁴, mas não por Casadei e colaboradores (1999)¹⁶².

Pesquisadores participantes do estudo de Rotterdam¹⁶³ não encontraram associação entre o genótipo A/A na posição -491 e o desenvolvimento de DA, mas demonstraram que o alelo A estava associado a menores níveis plasmáticos de apolipoproteína E.

Alguns estudos demonstraram que o genótipo T/T teria efeito protetor contra o desenvolvimento de DA^{154,164}.

Em 1998, Lambert e colaboradores¹⁶⁵ descreveram o polimorfismo G/T localizado na posição -219 da região promotora do gene APOE, também denominado Th1E47cs. Demonstraram que indivíduos que apresentavam pelo menos um alelo T apresentavam maior risco para desenvolver DA ($p=0,002$; $OR=1,79$; $IC95\%=(1,21-2,65)$). Este polimorfismo achava-se em desequilíbrio de ligação com a região codificadora do gene APOE, mas seu efeito como fator independente associado à DA persistia quando analisado em modelo de regressão logística. Os mesmos investigadores, no mesmo ano¹⁵², confirmaram o achado inicial e demonstraram, considerando indivíduos com o genótipo 3/4 da APOE, que a expressão da apoE RNAm era maior em heterozigotos (-219 G/T).

Um recente estudo multicêntrico¹⁶⁶, analisou os efeitos dos polimorfismos -491 A/T e -219 T/G em seis diferentes populações dos Estados Unidos e Europa com um total de 1.732 pacientes com DA provável e 1.926 controles normais. Comprovaram que os polimorfismos da região promotora estavam em desequilíbrio de ligação com o alelo $\epsilon 4$ da APOE, porém, ao avaliar esses

polimorfismos entre portadores e não portadores do alelo $\epsilon 4$, constataram que o genótipo A/A da posição -491 estava associado a maior risco para o desenvolvimento de DA na casuística geral e que o genótipo T/T do polimorfismo da posição -219 atuava como fator de risco somente entre os idosos com idade superior a 85 anos, população na qual o alelo $\epsilon 4$ da APOE tem o seu papel como fator de risco atenuado. Contrariando o achado da importância do genótipo T/T entre os idosos muito idosos, um estudo espanhol demonstrou a importância do genótipo G/G como fator de risco para DA nessa faixa etária¹⁶⁷.

1.4 - Proteína relacionada ao receptor LDL

Em 1997, estudos de ligação sugeriram o envolvimento de regiões do cromossomo 12 na suscetibilidade à DA de início senil¹⁶⁸. Nessa ocasião, já se estudava o possível envolvimento de polimorfismos na região codificadora do gene da proteína relacionada ao receptor LDL (LRP; *Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein*) como fator de risco para DA¹⁶⁹.

O gene LRP localiza-se no cromossomo 12 e pertence à família dos receptores endocíticos LDL. Suas subunidades, α com peso molecular de 515 kDa e β com 85 kDa, permanecem associadas de forma não covalente na

superfície das células, sendo que a proteína LRP transita entre o endossomo e a superfície celular¹⁷⁰. O LRP, por meio de seu domínio N-terminal, é responsável pela internalização de múltiplos ligantes, incluindo proteinases, complexos proteinase-inibidor (entre estes, a α 2-macroglobulina ativada), apoE ligadas a lipoproteínas, APP contendo o domínio KPI (inibidor de protease de Kunitz) e outros¹⁷¹.

Com o conhecimento de que o LRP é o principal receptor da apoE no cérebro, seletivamente encontrado em neurônios e astrócitos ativados¹⁷² e que foi detectado em placas senis, considerou-se seu possível envolvimento com a fisiopatologia da DA. Especula-se que complexos β A-apoE ligados ao LRP, poderiam representar o evento inicial na via intracelular de processamento da APP e que essa associação poderia afetar a taxa da clivagem da APP pela α -secretase ou β/γ secretase¹⁷³. Outro estudo demonstrou que os efeitos do LRP no processamento da APP são mediados através de seus domínios citoplasmáticos, e que na ausência de LRP, o nível de β A é bastante reduzido e isso está correlacionado a redução específica da internalização da APP¹⁷⁴.

Em 1997, um polimorfismo na região 5' do gene do LRP foi considerado como fator de risco para DA¹⁷⁵ (Zuliani et al., 1994), porém esse achado não foi confirmado em estudos subsequentes^{176,177,178}.

No mesmo ano, Kang e colaboradores (1997)¹⁷⁹ estudaram o polimorfismo C/T na posição 766 do gene LRP, e encontraram que o genótipo C/C estava associado a maior risco de DA de início senil. Esse polimorfismo,

localizado no exon 3, é considerado uma mutação silenciosa, pois não leva à substituição de aminoácidos. Sugeriram que esse maior risco poderia ser decorrente de alteração na estrutura secundária do RNAm do LRP ou que esse polimorfismo estivesse em desequilíbrio de ligação com outros *loci* envolvidos com maior suscetibilidade à DA. Esse estudo revelou ainda, início mais precoce da doença e maior deposição amilóide em tecido cerebral de pacientes com DA e o genótipo C/C.

A maior frequência do genótipo C/C em pacientes com DA foi confirmado em alguns estudos^{180,181,182}, mas não constatado em outros^{183,184,178,185,186}.

Alguns pesquisadores demonstraram diminuição da frequência do alelo T em população de origem oriental e irlandesa^{180,186,187}.

1.5 - Considerações finais

No Brasil, nenhuma pesquisa foi realizada com respeito à relevância dos polimorfismos do LRP e da região promotora do gene APOE no desenvolvimento da DA.

A fisiopatologia da DA é multifatorial, com envolvimento de fatores genéticos e do meio, como características nutricionais e educacionais. A presença do alelo $\epsilon 4$ da APOE é apenas um fator de risco, portanto não é

suficiente e nem necessário para o desenvolvimento da doença. É de primordial importância o estudo de outros fatores genéticos de risco ou determinantes de DA, tendo por base populações com uma grande prevalência de DA e baixa frequência de $\epsilon 4$.

O estudo genético, além de sua importância na determinação de polimorfismos ou mutações que possam ser utilizadas como adjuvantes ao diagnóstico clínico e neuroimagem¹⁸⁸, é essencial para a pesquisa da fisiopatologia da DA, que ainda permanece obscura.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Determinar a frequência dos seguintes polimorfismos em indivíduos com DA provável e em controles normais em população brasileira:

- $\epsilon 2, \epsilon 3$ e $\epsilon 4$, localizados na região codificadora do gene APOE,
- A/T, localizado na posição -491 da região promotora do gene APOE,
- G/T, localizado na posição -219 da região promotora do gene APOE,
- C/T, localizado na posição 766 do gene LRP.

2.2 - Verificar a relevância desses polimorfismos, isoladamente e em conjunto, quanto risco de desenvolvimento de DA, considerando sexo e idade.

3 - METODOLOGIA

3.1 - Casuística

Foram estudados, após obtenção do consentimento informado, 120 indivíduos com diagnóstico de demência de acordo com critérios do DSM-IV¹⁸⁹ e diagnóstico de DA provável, segundo critérios do NINCDS/ADRDA⁵ e 120 controles, emparelhados por sexo (68,3% mulheres e 31,7% homens entre pacientes e 63,3% mulheres e 36,7% homens entre controles) ($p=0,41$) e idade ($75,2\pm 9,2$ anos entre pacientes e $72,5\pm 8,6$ anos entre controles) ($p=0,51$). Entre os pacientes, 89,2% eram brancos, 5,8% eram negros e 5,0% eram amarelos; entre os controles, 94,2% eram brancos, 4,2% eram negros e 1,6% eram amarelos ($p=0,287$).

Parte da casuística (32 pacientes e 43 controles) foi proveniente de um estudo epidemiológico realizado na cidade de Catanduva-São Paulo; destes, todos os pacientes fizeram parte do subgrupo senil e todos os controles tinham

idade acima dos 65 anos. Os demais pacientes estavam matriculados no ambulatório do Grupo de Neurologia Cognitiva e do Comportamento da Clínica Neurológica do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo ou foram encaminhados por médicos neurologistas que pertencem a esse grupo.

Foram convidados a participar do estudo como controles, os cônjuges ou acompanhantes não relacionados dos pacientes sem evidências de afecção neurológica ou psiquiátrica ou de doença sistêmica descompensada. Selecionamos para o grupo controle os indivíduos que obtiveram escore satisfatório no Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) e teste de fluência verbal. A nota de corte adotada do MEEM é 18 para analfabetos; 24 para indivíduos com escolaridade de 1 a 7 anos e 26 para indivíduos com escolaridade acima de 8 anos. O teste de fluência verbal é considerado normal se o indivíduo citar mais do que 12 animais em 1 minuto ou, no caso de o indivíduo ser analfabeto, mais do que 9 animais em 1 minuto^{190,191,192}.

Antecedentes familiares de demência estavam presentes em 47,9% dos pacientes e em 22,2% dos controles. A informação não foi obtida em 3 pacientes e 48 controles (Tabela 2) (Anexo 1).

Tabela 2. Caracterização demográfica e de antecedentes da casuística geral (%)

Características		DA	Controles
N		120	120
Média de idade (anos)		75,2 ± 9,2	72,5 ± 8,6
Gênero	Mulheres	82 (68,3)	76 (63,3)
	Homens	38 (31,7)	44 (36,7)
Procedência	Hospital terciário	88 (73,3)	77 (64,2)
	Estudo populacional	32 (26,7)	43 (35,8)
Cor	Branços	107 (89,2)	113 (94,2)
	Negros	7 (5,8)	5 (4,2)
	Amarelos	6 (5,0)	2 (1,6)
AF+		56 (47,9)	16 (22,2)

DA = doença de Alzheimer AF+ = antecedente familiar presente
N = número de indivíduos

Noventa pacientes (75,0%) tiveram início da doença com 65 anos ou mais (subgrupo senil) com média de idade de 79,3 ± 6,0 anos e média de idade de início de 75,3 ± 6,1 anos e 30 pacientes (25,0%) apresentaram início da DA com 64 anos ou menos (subgrupo pré-senil) com média de idade de 63,8 ± 4,8 anos e média de idade de início 58,2 ± 4,5 anos (Tabela 3).

Tabela 3. Caracterização demográfica e de antecedentes de indivíduos com DA dos subgrupos senil e pré-senil (%)

Características		senis	pré-senis
N		90	30
Média de idade (anos)		79,3 ± 6,0	63,8 ± 4,8
Média de idade de início (anos)		75,3 ± 6,1	58,2 ± 4,5
Gênero	Mulheres	64 (71,1)	18 (60,0)
	Homens	26 (28,8)	12 (40,0)
Procedência	Hospital terciário	57 (63,3)	30 (100)
	Estudo populacional	33 (36,7)	0
AF+		39 (44,3)	17 (56,7)

AF+ = antecedente familiar presente N = número de indivíduos

Na amostra, há 43 indivíduos com DA e 30 controles idosos muito idosos (idade \geq 80 anos). Vinte e cinco dos pacientes e 22 dos controles são da sub-amostra populacional e 18 pacientes e 8 controles são da sub-amostra recrutada em hospital terciário. Entre os pacientes, há maior número de mulheres (74,4%) mas entre os controles, homens e mulheres estão em mesmo número (Tabela 4).

Tabela 4. Caracterização demográfica e de antecedentes de indivíduos com DA e controles idosos muito idosos (≥ 80 anos) (%)

Características		DA	Controles
N		43	30
Média de idade (anos)		84,4 \pm 3,7	83,6 \pm 3,4
Média de idade de início (anos)		79,9 \pm 5,2	-
Gênero	Mulheres	32 (74,4)	15 (50,0)
	Homens	11 (25,6)	15 (50,0)
Procedência	Hospital terciário	18 (41,9)	8 (26,7)
	Estudo populacional	25 (58,1)	22 (73,3)
AF+		17 (39,5)	4 (13,3)

DA = doença de Alzheimer AF+ = antecedente familiar presente
N = número de indivíduos

3.2 - Técnicas Laboratoriais

O DNA genômico foi extraído de 10 mL de sangue periférico utilizando-se técnicas convencionais¹⁹³.

3.2.1 - Apolipoproteína E

A amplificação do exon 4 do gene APOE foi feita por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR), em volume de 25 µL, contendo:

- 100ng de DNA;
- 2,5 mM de cada desoxinucleotídeo;
- 10 mM de tampão tris-HCL pH=9,5 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ ;
- 0,25 mM de dimetilsulfóxido, DMSO;
- 6 pmol de cada *primer*:
 - 5' TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A 3'
 - 5' ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC 3'
- 1,5 U de *Taq* polimerase

A reação de PCR foi iniciada com desnaturação a 94 °C por 4 minutos seguida por 35 ciclos constituídos por desnaturação a 94 °C por 30 segundos, pareamento a 62 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto e concluída por extensão final a 70 °C por 7 minutos. Os produtos amplificados, com 234 pares de base (pb) foram submetidos à clivagem com a endonuclease *HhaI* e separados por tamanho por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%¹⁹⁴.

A seqüência do gene APOE, a localização dos *primers* utilizados em sua amplificação, os sítios de restrição *HhaI* presentes nessa seqüência e os codons polimórficos 112 e 158 estão representados na figura 2.

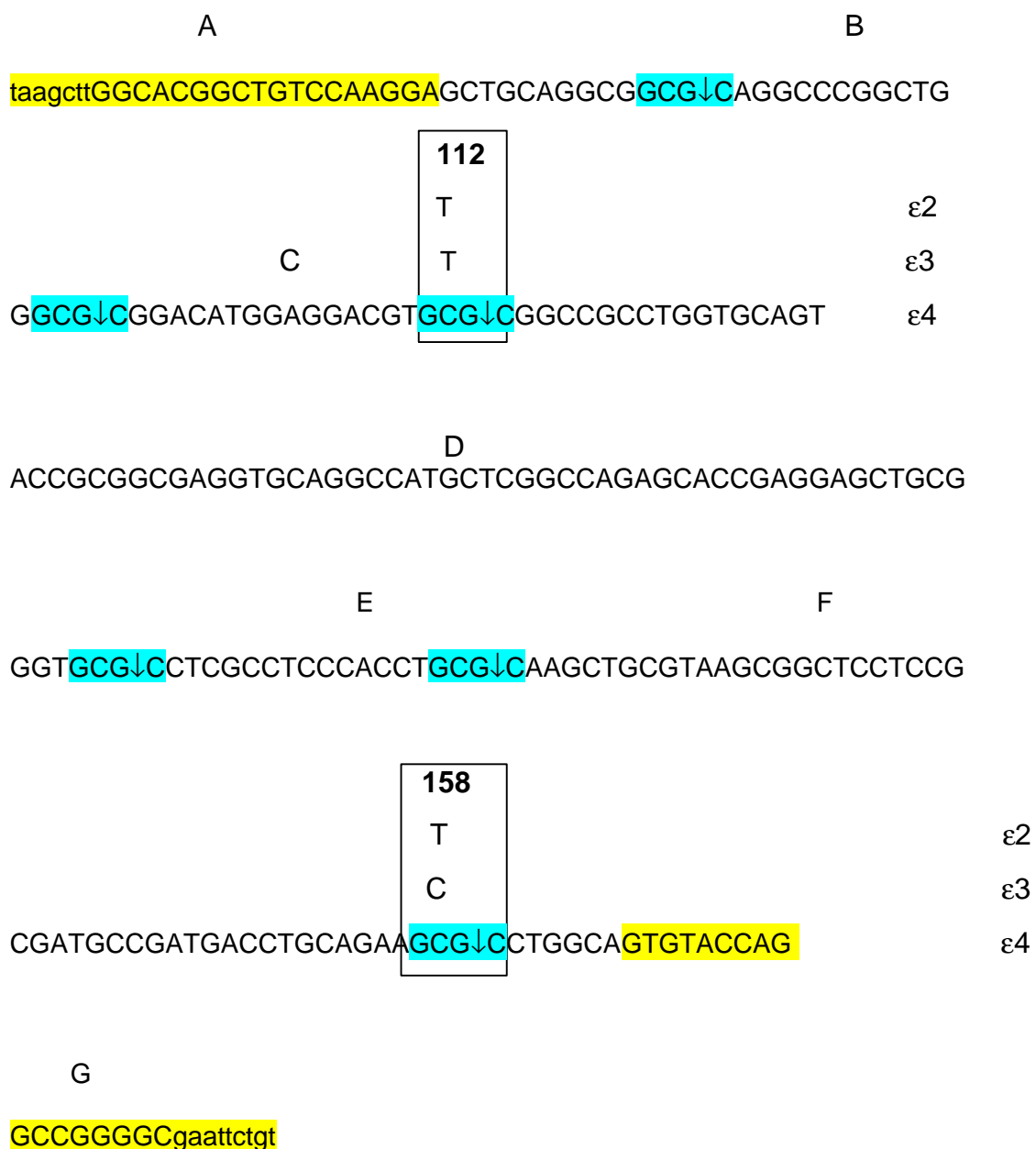


Figura 2. Seqüência de parte do gene da APOE ε4. A digestão desse fragmento com a endonuclease HhaI produzirá sete fragmentos, assinalados de A a G; destacamos em azul, os sítios de restrição de HhaI (GCG↓C). Em amarelo, destacamos a localização dos *primers* utilizados na amplificação de parte do gene APOE, acrescidos de uma seqüência adicional que cria sítios de clivagem (em letras minúsculas). Também em destaque, os codons 112 e 158 e seus respectivos polimorfismos.

O produto de PCR de APOE $\epsilon 4$, ao ser submetido a digestão pela endonuclease HhaI produzirá os sete fragmentos que estão representados na figura 3. A digestão do alelo $\epsilon 3$ produzirá seis fragmentos (A,B,C+D,E,F,G) e a do alelo $\epsilon 2$, apenas cinco (A,B,C+D,E,F+G).

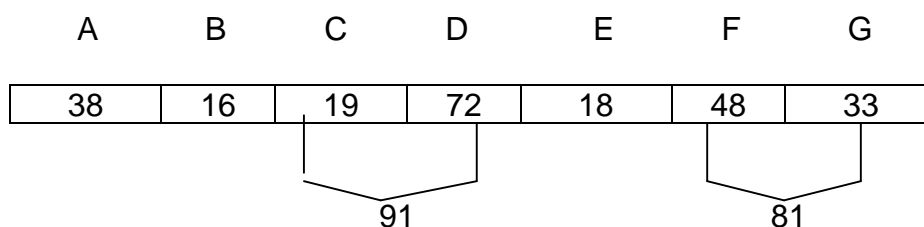


Figura 3. Fragmentos A-G gerados pela ação da enzima *HhaI* no produto de PCR do gene APOE $\epsilon 4$.

Os alelos $\epsilon 2, \epsilon 3$ e $\epsilon 4$ do gene APOE, que codificam as isoformas E2, E3 e E4 da proteína apoE, distinguem-se por variações nos codons 112 e 158, que determinam a presença de cisteína (cys) ou arginina (arg) nessas posições: E2 (cys 112,158), E3(cys 112, arg 158) e E4(arg 112 e 158). Desta forma, somente os fragmentos com 91, 81, 72 e 48 pb são importantes na leitura diferencial dos genótipos (Quadro 1).

	91pb	81pb	72pb	48pb
E2/E2	+	+		
E2/E3	+	+		+
E3/E3	+			+
E3/E4	+		+	+
E4/E4			+	+
E2/E4	+	+	+	+

pb=pares de bases

Quadro 1. Leitura dos genótipos da APOE de acordo com os fragmentos originados pelo processo de digestão

3.2.2 - Posição – 491 do gene APOE

A reação para detecção do polimorfismo A/T na posição –491¹⁵⁸ foi realizada por meio de PCR, em volume de 25 µL, contendo:

- 100ng de DNA;
- 1,25 mM de cada desoxinucleotídeo;
- 10 mM de tampão tris-HCL pH=9,5 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ ;
- 0,25 mM de dimetilsulfóxido, DMSO;
- 2,4 pmol de cada *primer* necessários para a amplificação do segmento compreendido entre a posição –784 e a –213, da região promotora da APOE:

- 5'CTC GAC TTT TAG CAG GTG CA 3'
- 5'CAA GCG TGG AAG GGG AAT G 3'
- 1,5 U de *Taq* polimerase

A desnaturação inicial do DNA foi obtida a 95° C por 1 minuto e a mistura da reação foi submetida a 15 ciclos de 94° C por 30 segundos, 54° C por 30 segundos e 72° C por 40 segundos seguido por 72°C por 2 minutos, gerando um produto de 571pb. A seguir, 1µl do produto deste PCR foi utilizado como molde para uma segunda reação de PCR, realizada em condições idênticas à primeira, mas empregando com *primers* internos (*nested*), sendo um deles com dois nucleotídeos não pareados (*mismatched*).

- 5'TGT TGG CCA GGC TGG TTT TAA 3'
- 5'TCC TTT CCT GAC CCT GTC CT3'

Essa reação amplifica a região que inclui o polimorfismo -491 e foi obtida com desnaturação inicial de 95° C por 1 minuto, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94° C durante 30 segundos, pareamento a 54° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 30 segundos, finalizando por extensão final a 72°C por 2 minutos. O produto gerado nessa reação tinha 226 pb e foi submetido à clivagem com a endonuclease *DraI* (5' TTT↓AAA 3') e os fragmentos dessa digestão separados por tamanho por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%. A seqüência, localização dos *primers* e do polimorfismo A/T na posição -491 da região promotora do gene APOE achase representada na Figura 4.

CTCGACTTTTAGCCAGGTGCA TCATACTGTTCCCACCCCTCCCATCCC

ACTTCTGTCCAGCCGCCTAGCCCCACTTTCTTTTTTTTCTTTTTTTGAG

ACAGTCTCCCTCTTGCTGAGGCTGGAGTGCAGTGGCGAGATCTCGGC

TCACTGTAACCTCCGCCTCCCGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGC

CTCCCAAGTAGCTAGGATTACAGGCGCCCGCCACCACGCCTGGCTAAC

TTTTGTATTTTAGTAGAGATGGGTTTCAC

CATGTTGGCCAGGCTGGTCTCA^TA A CTCCTGACCTTAAGTGGGCCTC
 TTTT↑AA

CCAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCTACCGCCCCCAGCCCCTCCCAT

CCCACTTCTGTCCAGCCCCCTAGCCCTACTTTCTTTCTGGGATCCAGGAGT

CCAGATCCCCAGCCCCCTCTCCAGATTACATTCATCCAGGCACAGGAAAG

GACAGGGTCAGGAAAGGAGGACTCTGGGCGGCAGCCTCCACATTCCCCT

TCCACGCTTG

Figura 4. Seqüência de parte do gene da região promotora da APOE, localização dos *primers* e do polimorfismo -491A/T.

Em destaque, em amarelo, a localização dos *primers* da primeira amplificação e em verde, a localização dos *primers* da segunda amplificação, um dos quais com duas discrepâncias para criar um sítio de restrição. A segunda reação de PCR utiliza como substrato o produto da primeira. A seta assinala o local de clivagem da enzima *Dral* (TTT↑AAA) e está realçado em azul a região do polimorfismo.

Os alelos A e T do sítio -491 da região promotora do gene APOE são demonstrados pela análise do produto da digestão pela enzima *Dral* (Quadro 2).

	226pb	207pb
A/A		+
A/T	+	+
T/T	+	

pb=pares de bases

Quadro 2. Leitura dos genótipos do polimorfismo A/T da localização -491 de acordo com os fragmentos originados pelo processo de digestão com a endonuclease *Dral*.

3.2.3 - Posição -219 do gene APOE

O protocolo proposto no primeiro estudo sobre este polimorfismo ¹⁶⁵ sofreu alterações para que pudessemos obter os resultados apropriados. A

principal modificação foi a inclusão de betaína na reação de PCR. A reação foi realizada com um volume de 25 μ L, contendo:

- 100ng de DNA;
- 0,625 mM de cada desoxinucleotídeo;
- 5 mM de tampão tris-HCL pH=9,5 mM KCl, 0,2 mM MgCl₂ ;
- 0,025 mM de dimetilsulfóxido, DMSO;
- 1 M de betaína
- 6,0 pmol de cada *primer mismatched*
 - 5'AGA ATG GAG GAG GGT GCC TG 3'
 - 5'ACT CAA GGA TCC CAG ACT TG 3'
- 0,2 U de *Tth* polimerase

A desnaturação inicial do DNA foi obtida a 94° C por 1 minuto e a reação prosseguiu com 40 ciclos de 94° C por 1 minuto, 60° C por 30 segundos e 72° C por 1 minuto, com extensão final a 72°C por 5 minutos. O produto dessa reação de PCR tem 233 pb e foi submetida à digestão com a endonuclease *MvaI* (CC↓(A/T) GG), seguida por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%.

A seqüência gênica da região está representada na Figura 5.

AGAATGGAGGAGGGTGCC↓TG T ATTACTGGGCGAGGTGTCCT
 G
 CCCTTCC↓TGGGGACTGTGGGGGGTGGTCAAAGACCTCTATG
 CCCACCTCCTTCCTCCCTCTGCCCTGCTGTGCC↓TGGGGCAGG
 GGGAGAACAGCCCACCTCGTGACTGGGCTGCCAGCCCGCCCT
 ATCCC↓TGGGGGAGGGGGCGGGACAGGGGGAGCCCTATAATTG
 GACAAGTCTGGGATCCTTGAGT

Figura 5. Seqüência gênica de parte da região promotora do gene APOE, localização dos *primers* e do polimorfismo -219T/G. Em destaque, em amarelo, a localização dos *primers*, as setas assinalam os locais (assinalados em azul) de clivagem da enzima *MvaI* (CC↑A/TGG) e está realçado em verde a localização do polimorfismo -219 T/G.

Os alelos T e G da posição -219 da região promotora do gene APOE são demonstrados pela análise do produto da digestão pela enzima *MvaI* (Quadro 3). Somente os fragmentos com 18, 30 e 48pb são relevantes para a interpretação.

	18pb	30pb	48pb
T/T			+
T/G	+	+	+
G/G	+	+	

pb=pares de bases

Quadro 3. Genótipos da região -219 do gene APOE de acordo com os fragmentos originados pelo processo de digestão com a endonuclease *MvaI*

3.2.4 - Proteína relacionada ao receptor LDL (LRP)

Cada reação para a detecção do polimorfismo C/T na posição 766 do gene do LRP foi realizada por meio de PCR, em volume de 25 μ L, contendo:

- 100ng de DNA;
- 1,25 mM de cada desoxinucleotídeo;
- 10 mM de tampão tris-HCL pH=9,5 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ ;
- 0,25 mM de dimetilsulfóxido, DMSO;
- 3,6 pmol de cada *primer*:
 - 5' GGG GTC CAG GAC TGC ATG TA 3'
 - 5' AAG TCC GTA CCT CGG CAG TG 3'
- 1,5 U de *Taq* polimerase

A reação de PCR dá origem a um produto de PCR com 59 pb. A desnaturação inicial do DNA foi obtida a 94° C por 3 minutos e a seguir, a reação prosseguiu com 32 ciclos de 30 segundos de 94° C, 62° C e 72°C, seguido por um ciclo final de 72° C por 3 minutos. O produto da reação de PCR foi submetido à digestão com a endonuclease *RsaI* (GT↑AC) e os fragmentos dessa reação separados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% ¹⁸².

A sequência de parte do gene LRP está representada na figura 6.

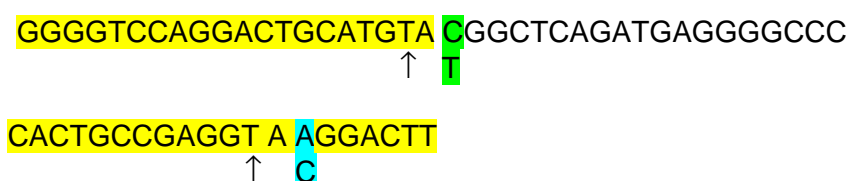


Figura 6. Seqüência de parte do gene do LRP. Com destaque em amarelo, acha-se a localização dos *primers*; as setas apontam o local de clivagem pela endonuclease *RsaI*, que reconhece a seqüência gt↑ac. Em verde, está destacada a posição 766, que é polimórfica e pode ser ocupada por um C ou T. Em azul, está assinalada a discrepância presente no primer, com intuito de criar mais um sítio de restrição.

O *primer* direto (5') foi desenhado com uma divergência (*mismatch*) com relação à seqüência original, de tal forma a criar um sítio de restrição somente quando o polimorfismo C está presente na posição 766. Da mesma forma, o *primer* reverso (3') foi desenhado com uma divergência, com o intuito de se criar um sítio de restrição, que estará sempre presente no amplímero e é utilizado como controle positivo da digestão pela endonuclease.

Desta forma, somente os produtos de 51 e 32 pb são relevantes para a leitura diferencial dos genótipos (Quadro 4). Caso a digestão do amplímero não tenha ocorrido como previsto, será obtido um fragmento de 59 pb, correspondente ao tamanho do produto final da reação de PCR.

	51pb	32pb	19pb	8pb
C/C		+	+	+
C/T	+	+	+	+
T/T	+			+

Pb=pares de bases

Quadro 4. Leitura dos genótipos do LRP de acordo com os fragmentos originados do processo de digestão pela endonuclease *Rsal*.

Os géis de poliacrilamida passaram por coloração pela prata para melhor visualização dos resultados. A leitura foi realizada sempre pelo mesmo examinador.

Fotografias dos géis de poliacrilamida com produtos da APOE, LRP e das regiões -491 e -219 do gene da APOE são mostradas na Figura 7 .

COLOCAR A FIGURA 7 DO POWER POINT

3.3 - Estudo Estatístico

A análise estatística consistiu de:

- Cálculo de freqüências, medidas de tendência central (média, mediana) e dispersão (desvio padrão).
- Análise de variância (ANOVA) para comparação de variáveis quantitativas em mais de dois grupos, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-HSD, quando houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Quando as variâncias não eram homogêneas, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico).
- Teste de associação do qui-quadrado para verificar associação entre variáveis categóricas. Quando pelo menos uma das freqüências esperadas foi menor do que 5, foi utilizado o teste exato de Fisher.
- Cálculo de OR (“*odds ratio*” ou razão de chance) e respectivos intervalos de confiança de 95% para identificar fatores de risco para a ocorrência de DA e para identificar, somente entre os afetados, fatores de risco para a ocorrência de DA no grupo etário senil, através de regressão logística.

Para todos os testes estatísticos foi estabelecido um nível de significância $\alpha=5\%$.

3.4 - Aspectos éticos

O procedimento foi explicado para todos os candidatos ao estudo e os que aceitaram participar assinaram um termo de consentimento. Caso o candidato não tivesse capacidade de compreensão, o mesmo processo foi realizado com seu representante legal.

O projeto inicial, envolvendo somente a análise da frequência dos polimorfismos da APOE e LRP em 100 pacientes e 100 controles foi aprovado pelo CAPPesq/Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Em 2001, nova consulta foi realizada quanto à inclusão de pacientes ambulatoriais externos ao HC-FMUSP, obtendo aprovação em 01/10/2001.

4 - RESULTADOS

4.1- Análise dos genótipos e alelos da APOE

O genótipo 3/3 foi o mais freqüente nos dois grupos (44,2% em indivíduos com DA e 65,0% em controles), enquanto que os genótipos 2/2 (0% em pacientes e 3,3% em controles) e 2/4 (1,7% em pacientes e 0% em controles) apresentaram prevalência baixa. O genótipo 4/4 conferiu risco três vezes maior para a ocorrência da doença com relação ao genótipo 3/4 (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição dos genótipos da APOE em indivíduos com DA e controles(%)

genótipo	DA	controles	p	OR IC95%
2/2	0	4 (3,3)	nd	nd
2/3	6 (5,0)	15 (12,5)	0,303	0,59 (0,21;1,61)
2/4	2 (1,7)	0	nd	nd
3/3	53 (44,2)	78 (65,0)	ref	
3/4	46 (38,3)	21 (17,5)	<0,001	3,22 (1,73;6,01)
4/4	13 (10,8)	2 (1,7)	0,004	9,57 (2,07;44,13)

DA= doença de Alzheimer
IC= intervalo de confiança

p= nível de significância
nd= não definido

OR= Odds Ratio
ref= categoria de referência

Ao dividir a amostra em subgrupos senil e pré-senil, notamos que no subgrupo senil o genótipo 3/4 representou fator de risco, o que não ocorreu no subgrupo pré-senil. O genótipo 4/4 permaneceu como fator de risco em ambos os subgrupos (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Distribuição dos genótipos da APOE em indivíduos com DA senil e controles(%)

genótipo	DA senil	controles	p	OR IC95%
2/2	0	4 (3,3)	nd	nd
2/3	5 (5,5)	15 (12,5)	0,524	0,70 (0,24;2,08)
2/4	2 (2,2)	0	nd	nd
3/3	37 (41,2)	78 (65,0)	ref	
3/4	36 (40,0)	21 (17,5)	<0,001	3,61 (1,86;7,03)
4/4	10 (11,1)	2 (1,7)	0,003	10,54 (2,19;50,55)

DA= doença de Alzheimer
IC= intervalo de confiança

p= nível de significância
nd= não definido

OR= Odds Ratio
ref= categoria de referência

Tabela 7. Distribuição dos genótipos da APOE em indivíduos com DA pré-senil e controles(%)

genótipo	DA pré-senil	controles	p	OR IC95%
2/2	0	4 (3,3)	nd	nd
2/3	1 (3,3)	15 (12,5)	0,759	0,32 (0,04;2,64)
2/4	0	0	nd	nd
3/3	16 (53,4)	78 (65,0)	ref	
3/4	10 (33,3)	21 (17,5)	0,074	2,32 (0,92;5,86)
4/4	3 (10,0)	2 (1,7)	0,037	7,31 (1,13;47,36)

DA= doença de Alzheimer
IC= intervalo de confiança
p= nível de significância
nd= não definido
OR= Odds Ratio
ref= categoria de referência

O alelo $\epsilon 2$ foi três vezes mais freqüente em controles do que em indivíduos com DA ($p=0,005$) e a freqüência do alelo $\epsilon 4$ foi três vezes maior em indivíduos com DA do que em controles ($p<0,001$), na amostra estudada (Tabela 8).

Tabela 8. Freqüências de alelos da APOE entre pacientes e controles

alelo	DA	controles	p
$\epsilon 2$	8 (0,03)	23 (0,09)	0,005
$\epsilon 4$	74 (0,31)	25 (0,10)	<0,001

DA= doença de Alzheimer

O risco para desenvolver DA foi maior em pacientes que possuíam dois alelos $\epsilon 4$ ($p=0,002$; OR=10,68; IC95%=(2,33; 48,96)) em comparação aos que

tinham um alelo apenas ($p < 0,001$; OR= 3,76; IC95%= (2,05; 6,89). A presença de um alelo $\epsilon 2$ conferiu fator protetor ($p = 0,025$; OR=0,38; IC95%=(0,16; 0,91) (Tabela 9). Nenhum genótipo 2/2 foi identificado entre os casos.

Tabela 9. Número e porcentagem (%) de indivíduos com DA e controles segundo a frequência do alelo $\epsilon 4$ ou $\epsilon 2$

frequência do alelo $\epsilon 4$	DA	controles	p	OR IC95%
0	59 (49,2)	97 (80,8)	ref	
1	48 (40,0)	21 (17,5)	<0,001	3,76 (2,05;6,89)
2	13 (10,8)	2 (1,7)	0,002	10,68 (2,33;48,96)

frequência do alelo $\epsilon 2$	DA	controles	p	OR IC95%
0	112 (93,3)	101 (84,2)	ref	
1	8 (6,7)	15 (12,5)	0,025	0,38 (0,16;0,91)
2	0 (0,0)	4 (3,3)	nd	nd

DA= doença de Alzheimer p= nível de significância OR= Odds Ratio
 IC= intervalo de confiança nd= não definido ref= categoria de referência

A presença de apenas um alelo $\epsilon 4$ esteve mais relacionado à ocorrência de DA em mulheres do que em homens. Nenhum homem do grupo controle era homocigoto. As mulheres que apresentavam dois alelos tiveram maior risco de desenvolver a doença com relação àquelas com um alelo apenas (Tabela 10).

Tabela 10. Correlação entre a ocorrência de DA e o número de alelos $\epsilon 4$ em homens e mulheres

frequência de $\epsilon 4$	homens		OR	mulheres		OR
	DA	controles	IC95%	DA	controles	IC95%
0	18	34	ref	41	63	ref
1	15	10	2,83(1,06-7,57) ^a	33	11	4,61(2,09-10,13) ^b
2	5	0	nd	8	2	6,15(1,24-30,40) ^c

a \Rightarrow p=0,038 b \Rightarrow p<0,001 c \Rightarrow p=0,026

DA= doença de Alzheimer p= nível de significância OR= Odds Ratio
 IC= intervalo de confiança nd= não definido ref= categoria de referência

Ao dividirmos a amostra de pacientes, levando em consideração a idade de início da doença, em DA senil (90 pacientes) e pré-senil (30 pacientes), confirmamos o efeito deletério do alelo $\epsilon 4$, mas não constatamos o efeito protetor do alelo $\epsilon 2$ nos dois subgrupos da casuística analisada (Tabela 11).

Tabela 11. Número e porcentagem (%) de indivíduos com DA senil ou pré-senil e controles segundo a presença de genótipos com pelo menos um alelo $\epsilon 2$ ou $\epsilon 4$

genótipo	DA senil	controles	p	OR
				IC95%
$-\epsilon 2$	7 (7,7)	19 (15,8)	0,079	0,45 (0,18;1,12)
$-\epsilon 4$	48 (53,3)	23 (19,2)	<0,001	4,82 (2,61;8,91)

genótipo	DA pré-senil	controles	p	OR
				IC95%
$-\epsilon 2$	1 (3,3)	19 (15,8)	0,079	0,18 (0,02;1,43)
$-\epsilon 4$	13 (43,3)	23 (19,2)	0,006	3,22 (1,37;7,57)

DA= doença de Alzheimer
p= nível de significância

OR= Odds Ratio
IC= intervalo de confiança

Quando consideramos somente os indivíduos com idade igual ou maior que 80 anos, idosos muito idosos, sendo 43 indivíduos com DA e 30 controles, constatamos que a porcentagem de indivíduos com um alelo $\epsilon 4$ (21,9%) foi maior do que em controles (15,4%), contudo, ambas foram menores em comparação à amostra total e a presença do alelo $\epsilon 4$ não representou um fator de risco nesta sub-amostra ($p=0,086$). A frequência do alelo $\epsilon 4$ nos controles muito idosos é maior do que nos controles da casuística total. Nenhum desses indivíduos possuía o genótipo 4/4 (Tabela 12).

Tabela 12. Número e porcentagem (%) de indivíduos idosos muito idosos com DA e controles, segundo a frequência do alelo $\epsilon 4$

frequência de $\epsilon 4$	DA	controles	OR
			IC95%
0	28 (78,1)	25 (84,6)	ref
1	15 (21,9)	5 (15,4)	2,68 (0,85;8,43)

$p=0,086$

DA= doença de Alzheimer
IC= intervalo de confiança

p = nível de significância
ref= categoria de referência

OR= Odds Ratio

A média da idade de início em pacientes que não possuíam o alelo $\epsilon 4$ da APOE foi $72,9 \pm 11,2$ anos, naqueles com um alelo $\epsilon 4$ foi $69,9 \pm 7,8$ anos e com dois alelos $\epsilon 4$ foi $67,7 \pm 4,2$ anos (Tabela 13).

Tabela 13. Médias e respectivos desvios padrão da idade de início dos indivíduos com DA, segundo a frequência do alelo $\epsilon 4$

	Frequência $\epsilon 4$			p^*
	0	1	2	
Idade de início (anos)	$72,9 \pm 11,2$	$69,9 \pm 7,8$	$67,7 \pm 4,2$	0,016

*nível de significância estatística segundo o teste de Kruskal-Wallis

0=1 ($p=0,272$); 0 \neq 2 ($p=0,020$); 1=2 ($p=0,444$)

No subgrupo senil, a média da idade de início foi $79,2 \pm 5,5$ anos para os indivíduos com DA sem nenhum alelo $\epsilon 4$; $73,0 \pm 4,8$ anos para aqueles com um alelo e $69,3 \pm 3,2$ anos para aqueles com dois alelos (Tabela 14).

Tabela 14. Médias e respectivos desvios padrão da idade de início dos indivíduos do subgrupo senil, segundo a frequência do alelo $\epsilon 4$

	Frequência $\epsilon 4$			p*
	0	1	2	
Idade de início (anos)	$79,2 \pm 5,5$	$73,0 \pm 4,8$	$69,3 \pm 3,2$	<0,001

*nível de significância estatística segundo a análise de variância(ANOVA)

0≠1 (p<0,001); 0≠2 (p<0,001); 1=2 (p=0,097)

No subgrupo pré-senil, a média da idade de início foi $57,5 \pm 4,6$ anos para os indivíduos com DA sem nenhum alelo $\epsilon 4$; $58,0 \pm 4,7$ anos para aqueles com um alelo e $62,3 \pm 1,5$ anos para aqueles com dois alelos. Verificamos assim, que a presença do alelo $\epsilon 4$ no subgrupo pré-senil aumentou a média da idade de início dos pacientes dessa casuística, mas não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 15).

Tabela 15. Médias e respectivos desvios padrão da idade de início dos indivíduos do subgrupo pré-senil, segundo a frequência do alelo $\epsilon 4$

	Frequência $\epsilon 4$			p*
	0	1	2	
Idade de início (anos)	57,5 ± 4,6	58,0 ± 4,7	62,3 ± 1,5	0,243

*nível de significância estatística segundo a análise de variância(ANOVA)

4.2 - Análise dos genótipos e alelos da localização -491 da região promotora do gene APOE

O genótipo A/A foi o mais freqüente tanto em indivíduos com DA (65,8%) como em controles (68,3%) e o genótipo T/T foi o mais incomum (5,8% em pacientes e 5,0% em controles).

O estudo genotípico do polimorfismo da região -491 do gene da APOE não evidenciou associação com a ocorrência de DA (Tabela 16) na amostra total e nos subgrupos senil e pré-senil (Tabela 17).

Tabela 16. Distribuição dos genótipos da localização –491 da região promotora do gene APOE em indivíduos com DA e controles (%)

genótipo	DA	controles	p	OR
				IC95%
A/A	79 (65,8)	82 (68,3)	0,74	0,91 (0,51;1,61)
A/T	34 (28,3)	32 (26,7)	ref	
T/T	7 (5,8)	6 (5,0)	0,88	1,09 (0,33;3,62)

DA= doença de Alzheimer OR= Odds Ratio p= nível de significância IC= intervalo de confiança
ref= categoria de referência

Tabela 17. Distribuição dos genótipos da localização –491 da região promotora do gene APOE nos subgrupos senil ou pré-senil (%)

genótipo	DA senil	controles	p
A/A	62 (68,9)	82 (68,3)	0,875
A/T	23 (25,5)	32 (26,7)	ref
T/T	5 (5,6)	6 (5,0)	0,824

genótipo	DA pré-senil	Controles	p
A/A	17 (56,7)	82 (68,3)	0,250
A/T	11 (36,7)	32 (26,7)	ref
T/T	2 (6,6)	6 (5,0)	0,972

DA= doença de Alzheimer p= nível de significância ref= categoria de referência

A freqüência do alelo A foi de 80% em indivíduos com DA e 82% em controles e do alelo T foi 20% e 18%, respectivamente ($p=0,643$).

A análise do número de indivíduos com DA e controles que possuíam genótipos com pelo menos um alelo A ou T, mostrou que nenhum dos alelos interferiu no desenvolvimento da DA na casuística estudada (Tabela 18). A mesma observação foi válida nos subgrupos senil e pré-senil (Tabela 19).

Tabela 18. Número e porcentagem (%) de indivíduos com DA comparados aos controles, segundo a presença de genótipos com pelo menos um alelo A ou T

genótipo	DA	controles	p
-/A	113 (94,2)	114 (95,0)	0,776
-/T	41 (34,2)	38 (31,7)	0,680

DA= doença de Alzheimer p= nível de significância

Tabela 19. Número e porcentagem (%) de indivíduos com DA senil ou pré-senil comparado aos controles, segundo a presença de genótipos com pelo menos um alelo A ou T

genótipo	DA senil	controles	p
-/A	85 (94,4)	114 (95,0)	1,000
-/T	28 (31,1)	38 (31,7)	0,932

genótipo	DA pré-senil	controles	p
-/A	28 (93,3)	114 (95,0)	0,661
-/T	13 (43,3)	38 (31,7)	0,228

DA= doença de Alzheimer p= nível de significância

4.3 - Análise dos genótipos e alelos da localização -219 da região promotora do gene APOE

O estudo genotípico da região -219 da região promotora da APOE mostrou maior frequência de heterozigotos na população estudada (57,5% em pacientes e 58,3% em controles). Não houve evidência de associação entre os

genótipos deste polimorfismo e o desenvolvimento de DA na casuística geral (tabela 20).

Tabela 20. Distribuição dos genótipos da localização -219 da região promotora do gene APOE em indivíduos com DA e controles (%)

genótipo	DA	Controles	p	OR
				IC95%
T/T	37 (30,8)	24 (20,0)	0,15	1,56(0,85;2,88)
T/G	69 (57,5)	70 (58,3)	ref	
G/G	14 (11,7)	26 (21,7)	0,10	0,55(0,26;1,13)

DA= doença de Alzheimer OR= Odds Ratio p= nível de significância IC= intervalo de confiança
ref= categoria de referência

Ao dividirmos a amostra em subgrupos senil e pré-senil, constatamos que o genótipo T/T constituiu um fator de risco para a doença no subgrupo senil ($p=0,032$; $OR=2,03$; $IC\ 95\%=(1,60; 3,87)$) (Tabela 21).

Tabela 21. Distribuição dos genótipos da localização -219 da região promotora do gene APOE nos subgrupos senil e pré-senil (%)

genótipo	DA senil	controles	p	OR
				IC95%
T/T	32 (35,5)	24 (20,0)	0,043	1,94(1,02;3,70)
T/G	48 (53,3)	70 (58,3)	ref	
G/G	10 (11,1)	26 (21,7)	0,165	0,56(0,25;1,27)

genótipo	DA pré-senil	controles	p	OR
				IC95%
T/T	5 (16,7)	24 (20,0)	0,508	0,69(0,24;2,04)
T/G	21 (70,0)	70 (58,3)	ref	
G/G	4 (13,3)	26 (21,7)	0,260	0,51(0,16;1,64)

DA= doença de Alzheimer OR= Odds Ratio p= nível de significância IC= intervalo de confiança
ref= categoria de referência

A frequência do alelo T foi de 60% em indivíduos com DA e 49% em controles, enquanto que a do alelo G foi de 40% e 51%, respectivamente ($p=0,022$).

Na análise do número de indivíduos, pacientes e controles, que possuíam genótipos com pelo menos um alelo T ou G, constatamos que o alelo T representou um fator de risco para o desenvolvimento da doença ($p=0,038$; OR= 2,09; IC95%=(1,03; 4,24)), e o alelo G apresentou uma tendência a atuar como fator protetor ($p=0,054$; OR=0,56; IC95%=(0,31;1,01)) na amostra total (Tabela 22). Entretanto, quando dividimos a amostra nos subgrupos senil e pré-

senil, notamos que apenas no subgrupo senil o alelo T representou um fator de risco e o alelo G, um fator protetor para o desenvolvimento de DA (Tabela 23).

Tabela 22. Número e porcentagem (%) de indivíduos com DA comparados aos controles, segundo a presença de genótipos com pelo menos um alelo T ou G

genótipo	DA	controles	p	OR
				IC95%
-/T	106 (88,3)	94 (78,3)	0,038	2,09(1,03;4,24)
-/G	83 (69,2)	96 (80,0)	0,054	0,56(0,31;1,01)

DA=doença de Alzheimer OR=Odds Ratio p=nível de significância IC= intervalo de confiança

Tabela 23. Número e porcentagem (%) de indivíduos com DA senil ou pré-senil comparados aos controles, segundo a presença de genótipos com pelo menos um alelo T ou G

Genótipo	DA senil	controles	p	OR
				IC95%
-/T	80 (88,9)	94 (78,3)	0,045	2,21(1,01;4,86)
-/G	58 (64,4)	96 (80,0)	0,012	0,45(0,24;0,84)

Genótipo	DA pré-senil	controles	p	OR
				IC95%
-/T	26 (86,7)	94 (78,3)	0,307	1,79(0,57;5,61)
-/G	25 (83,3)	96 (80,0)	0,679	1,25(0,43;3,60)

DA= doença de Alzheimer OR= Odds Ratio p= nível de significância
IC= intervalo de confiança

Entre os idosos muito idosos, houve diminuição da porcentagem de indivíduos portadores do genótipo T/T e aumento dos portadores do genótipo G/G entre controles. O genótipo G/G representou um fator protetor nesse subgrupo da amostra (Tabela 24).

Tabela 24. Distribuição dos genótipos da localização -219 da região promotora do gene da APOE entre os indivíduos idosos muito idosos com DA e controles (%)

genótipo	DA	controles	p	OR
				IC95%
T/T	17 (39,6)	5 (16,7)	0,11	2,59(0,69-10,16)
T/G	21 (48,8)	16 (53,3)	ref	
G/G	5 (11,6)	9 (30,0)	0,01	0,16(0,03-0,88)

DA= doença de Alzheimer OR= Odds Ratio p= nível de significância IC= intervalo de confiança
ref= categoria de referência

Na análise de indivíduos idosos muito idosos, que apresentavam genótipos com pelo menos um alelo T ou G, o alelo G representou tendência a ser um fator protetor (Tabela 25).

Tabela 25. Número e porcentagem (%) de indivíduos com DA e controles muito idosos, segundo a presença de genótipos com pelo menos um alelo T ou G

genótipo	DA	controles	p	OR
				IC95%
-/T	38(62,2)	21(37,8)	0,05	3,26(0,84;13,09)
-/G	26(46,7)	24(53,3)	0,08	0,38(0,11;1,26)

DA= doença de Alzheimer OR= Odds Ratio p= nível de significância
 IC= intervalo de confiança

Contudo, constatamos que o locus da APOE e o da localização -219 da sua região promotora estão em desequilíbrio de ligação (Tabela 26), isto é, há uma tendência de combinações específicas de alelos ocorrerem juntas no cromossomo com maior frequência do que seria esperado pela probabilidade. Esse achado foi confirmado por meio de análise multivariada.

Tabela 26. Número e porcentagem (%) de indivíduos segundo os genótipos da APOE e localização -219 da sua região promotora

APOE	Th1E47cs		
	T/T	T/G	G/G
2/2	-	1(0,7)	3(7,5)
2/3	-	15(10,9)	6(15,0)
2/4	-	1(0,7)	1(2,5)
3/3	27(44,3)	79(56,8)	25(62,5)
3/4	27(44,3)	38(27,3)	2(5,0)
4/4	7(11,4)	5(3,6)	3(7,5)

$p < 0,001$ (nível de significância estatística segundo teste de associação do qui-quadrado).

4.4 - Análise dos genótipos e alelos do gene do LRP

O genótipo C/C foi o mais freqüente tanto em pacientes (72,5%) como em controles (71,7%), enquanto que o genótipo T/T mostrou-se com prevalência baixa (4,2% em pacientes e 3,3% em controles).

Não houve associação entre o genótipo C/C e o desenvolvimento de DA (Tabela 27), mesmo entre os subgrupos senil e pré-senil, na amostra estudada (Tabela 28).

Tabela 27. Distribuição dos genótipos do LRP entre pacientes e controles (%)

genótipo	DA	controles	p	OR
				IC95%
C/C	87 (72,5)	86 (71,7)	0,79	1,08(0,59;1,96)
C/T	28 (23,3)	30 (25,0)	ref	ref
T/T	5 (4,2)	4 (3,3)	0,68	1,34(0,33;5,49)

DA= doença de Alzheimer OR= Odds Ratio p= nível de significância IC= intervalo de confiança
ref= categoria de referência

Tabela 28. Distribuição dos genótipos do LRP em pacientes com DA senil e pré-senil (%)

genótipo	DA senil	controles	p	OR
				IC95%
C/C	69 (76,8)	86 (71,7)	0,312	1,42(0,72;2,78)
C/T	17 (18,9)	30 (25,0)	ref	
T/T	4 (4,4)	4 (3,3)	0,460	1,76(0,39;7,97)

genótipo	DA pré-senil	controles	p	OR
				IC95%
C/C	18 (60,0)	86 (71,7)	0,200	0,57(0,24;1,35)
C/T	11 (36,7)	30 (25,0)	ref	
T/T	1 (3,3)	4 (3,3)	0,744	0,68(0,07;6,79)

DA= doença de Alzheimer OR= Odds Ratio p= nível de significância IC= intervalo de confiança
ref= categoria de referência

A frequência do alelo C foi de 84% e a do alelo T foi de 16% em indivíduos com DA e controles ($p=1,000$).

A análise do número de indivíduos, pacientes e controles, que possuíam pelo menos um alelo C ou T , permite-nos inferir que nenhum dos dois alelos foi relacionado com o desenvolvimento da doença na amostra estudada (Tabela 29). O mesmo foi válido para os subgrupos senil e pré-senil (Tabela 30).

Tabela 29. Número e porcentagem (%) de indivíduos com DA comparados aos controles, segundo a presença de genótipos com pelo menos um alelo C ou T

genótipo	DA	controles	p
C/-	115 (95,8)	116 (96,7)	1,000
T/-	33 (27,5)	34 (28,3)	0,886

DA= doença de Alzheimer p= nível de significância

Tabela 30. Número e porcentagem (%) de indivíduos com DA senil ou pré-senil comparados aos controles, segundo a presença de genótipos com pelo menos um alelo C ou T

genótipo	DA senil	controles	p
-/C	86 (95,5)	116 (96,7)	0,727
-/T	21 (23,3)	34 (28,3)	0,415

genótipo	DA pré-senil	controles	p
-/C	29 (96,7)	116 (96,7)	1,000
-/T	12 (40,0)	34 (28,3)	0,215

DA= doença de Alzheimer p= nível de significância

4.5 - Antecedentes familiares

A presença de pelo menos um familiar acometido por demência acarretou maior risco para o desenvolvimento de DA (Tabela 31).

Tabela 31 . Número e porcentagem (%) de indivíduos (casos e controles) segundo antecedentes familiares para demência

antecedente familiar	Grupo		OR
	casos	controles	IC 95%
Não	56 (77,8)	16 (22,2)	ref.
Sim	61 (52,1)	56 (47,9)	3,02(1,44;6,32)

p=0,003 OR=odds ratio ref=categoria de referência

5 - DISCUSSÃO

5.1 - Apolipoproteína E

Os resultados deste estudo mostraram que o alelo $\epsilon 4$ da APOE representou um fator de risco genético para a ocorrência de DA na casuística analisada. Foi demonstrado efeito dose-dependente do alelo $\epsilon 4$, em que a presença de dois alelos quase triplica o risco de desenvolver a doença com relação aos pacientes com um alelo apenas, corroborando outros estudos^{41,48,49}.

A freqüência do alelo $\epsilon 4$ em pacientes deste estudo é maior do que em outros dois estudos brasileiros^{109,110}, mas menor com relação a um terceiro estudo¹¹¹, porém a população amostral desses estudos era menor. A freqüência do alelo $\epsilon 4$ entre controles foi semelhante nos quatro estudos brasileiros. Contudo, a freqüência constatada na população caucasiana dos Estados Unidos e da região norte da Europa^{41,99,100} é maior com relação a das casuísticas brasileiras.

Há grandes dificuldades quando se tenta traçar o perfil da importância do alelo $\epsilon 4$ em diferentes países, em diferentes raças, pois nem todos os pesquisadores utilizam os mesmos critérios de classificação dos pacientes e controles; alguns analisam amostras populacionais, outros, ambulatoriais e em alguns estudos faltam informações relevantes. Além disso, a imprecisão dos conceitos de raças e etnias torna a interpretação das pesquisas bastante confusa. Por exemplo, o significado do termo “hispanico”, utilizado em diversos estudos americanos, é muito pouco preciso.

A população brasileira é produto de um complexo processo de miscigenação entre ameríndios, europeus e africanos que ocorreu ao longo de sua história¹⁹⁵. O estudo de Alves-Silva e colaboradores (2000)¹⁹⁶ demonstrou que as patrilinhagens de mais de 90% dos brancos brasileiros é de origem europeia e que, aproximadamente, 60% das matrinhagens é de origem ameríndia ou africana. Portanto, o conceito de raça em países com grande fluxo migratório como o Brasil e mesmo, em menor grau, os Estados Unidos, é bastante relativo.

Em nossa amostra, de acordo com as outras populações estudadas^{62,63}, o alelo $\epsilon 2$ desempenhou papel protetor contra o desenvolvimento de DA na casuística geral, efeito que se perde quando analisamos os subgrupos senil e pré-senil, provavelmente devido à diminuição da amostra.

Foi demonstrada, exceto no subgrupo pré-senil, a antecipação da idade de início da doença nos pacientes portadores do alelo $\epsilon 4$, sendo que esse efeito

é dose dependente somente na casuística geral. Esse achado está de acordo com dados já descritos na literatura ^{48,50,51}.

As alterações neuropatológicas da DA iniciam-se na região transentorrinal, espalham-se para a região entorrinal, hipocampo e outras estruturas límbicas e alcançam o isocórtex ⁴. A maioria dos estudos de PET (*Positron Emission Tomography*) e de volumetria por RNM (Ressonância Nuclear Magnética) demonstram que indivíduos portadores do alelo $\epsilon 4$ apresentam alterações funcionais ¹⁹⁷ e morfológicas cerebrais nessas regiões mais precocemente ^{198,199,200,201,202} do que os não portadores, o que pode explicar o efeito de antecipação da idade de início da doença em quem possui o alelo $\epsilon 4$.

Reiman e colaboradores ²⁰³ (2001) demonstraram, por meio de estudo longitudinal de 2 anos, declínio da taxa metabólica cerebral de glicose, medida por PET, nos córtices temporal, cíngulo posterior, pré-frontal, prosencéfalo basal, giro parahipocampal e no tálamo em 10 indivíduos heterozigotos para o alelo $\epsilon 4$, comparados a 15 indivíduos não portadores do alelo, que apresentaram declínio nos córtices cíngulo anterior e posterior, córtex parietal e núcleo caudado.

A presença do alelo $\epsilon 4$ esteve mais relacionado ao desenvolvimento de DA entre mulheres do que em homens, sendo que a presença de um alelo condicionou o dobro do risco em mulheres comparado com os homens. Esse achado apesar de controverso na literatura ^{59,60,61} poderia ser explicado com

base em alguns estudos experimentais que demonstram efeito sinérgico positivo entre o estrógeno e o alelo $\epsilon 4$ da APOE no processo de plasticidade neuronal. Portanto, em mulheres em menopausa, a falta de estrógeno poderia acarretar menor remodelação^{204,205,206}.

Entre os indivíduos idosos muito idosos do nosso estudo, a frequência do alelo $\epsilon 4$ foi maior em pacientes do que em controles, mas não representou um fator de risco para o desenvolvimento de DA ($p=0,086$; $OR=2,68$; $IC95\%=0,85-8,43$). A frequência do alelo $\epsilon 4$ foi menor entre os pacientes muito idosos (21,9%) comparando com a amostra total de pacientes (31,0%), mas os controles apresentam uma relação inversa. A menor frequência do alelo $\epsilon 4$ dos pacientes muito idosos pode ser explicada pelo fato de ele representar um fator de risco para o desenvolvimento de DA em indivíduos mais jovens e a demência condiciona uma sobrevida menor, além disso, há o efeito deletério do alelo seja como fator de risco de doenças vasculares, seja na recuperação de qualquer lesão cerebral^{57,58}. A relação inversa da frequência do alelo entre os controles, assim como a falta de função como fator de risco, representa que o alelo $\epsilon 4$, por si só, não constitui um determinante de patologias ou de pior prognóstico, provavelmente, há a interação de outros fatores genéticos e ambientais⁵⁵.

Devemos ressaltar, contudo, que a maior parte dos indivíduos idosos muito idosos provém do estudo populacional realizado na cidade de Catanduva e é plausível que uma amostra populacional apresente frequência mais baixa

de $\epsilon 4$ com relação a amostra dos pacientes seguidos ambulatorialmente, como foi demonstrado no nosso trabalho, uma vez que os pacientes com antecedentes familiares da doença tendem a procurar auxílio médico mais precocemente e com maior frequência²⁰⁷.

Embora a presença do alelo $\epsilon 4$ da APOE exerça um significativo impacto no risco do desenvolvimento de DA, muitos indivíduos com a doença não possuem o alelo $\epsilon 4$ e muitos idosos muito idosos possuem o alelo e não desenvolveram DA.

5.2 - Região promotora do gene APOE

Na amostra estudada, não houve correlação entre o polimorfismo da localização -491 e a ocorrência de DA. Quanto ao polimorfismo da localização -219, na casuística geral e na sub-amostra senil, o alelo T representou um fator de risco e na sub-amostra senil, o alelo G representou um fator protetor contra o desenvolvimento da DA. Porém, foi demonstrado que esses polimorfismos estão em desequilíbrio de ligação com a região codificadora do gene APOE e que, portanto, não atuam independentemente.

Os polimorfismos da região promotora podem atuar modulando o nível de expressão da apoE, sendo que alguns estudos ^{208,209}, demonstraram que a deposição de β A em cérebros de ratos é influenciada por essa maior expressão.

Polimorfismos com uma única troca de bases na região promotora podem resultar em alteração importante da expressão da proteína transcrita¹⁴⁹. Essas evidências motivaram o estudo dos polimorfismos da região promotora da APOE ²¹³. Porém, apesar dessa evidência não houve associação entre o polimorfismo da região -491 e o desenvolvimento de DA em nossa população, o que também está de acordo com a maioria dos estudos já publicados ^{155,156,157,158,159,160}.

O efeito isolado desses polimorfismos foi demonstrado em estudos caso-controles, em que apesar do desequilíbrio de ligação existentes entre eles e a APOE, mostravam-se independentes através da análise de regressão logística. Um estudo recente ²¹⁰, verificou que polimorfismos da região promotora do gene APOE (-491A /T e -219T/G) estão relacionados com a quantidade de β A depositados nas áreas 8 e 9 de Brodman em 74 pacientes com DA, independente do genótipo da APOE.

Vários estudos que encontraram desequilíbrio de ligação entre o alelo A do -491 e o alelo ϵ 4 da APOE, mas encontraram associação do polimorfismo da região -491 e o desenvolvimento de DA, através de análise estratificada entre portadores e não portadores do alelo ϵ 4. Essa técnica desconsidera o

desequilíbrio de ligação que também entre o alelo $\epsilon 2$ da apoE e o alelo T do -491 e o efeito dose-dependente do alelo $\epsilon 4$.

5.3 - Proteína relacionada ao receptor LDL

No nosso estudo, não houve correlação entre o polimorfismo C/T da localização 766 do gene codificador do LRP e a ocorrência de DA.

O polimorfismo do gene LRP caracteriza-se por uma única troca de bases, o que não afeta a estrutura e função da proteína resultante e provavelmente por isso, não exerça papel como fator de risco. Um importante estudo, realizado em 1999, verificou os genótipos do polimorfismo C/T do LRP em 225 casos de DA definida e 187 controles e constataram que não houve diferença significativa entre genótipos e entre alelos de indivíduos com DA e controles ¹⁸⁴. Esse achado está de acordo com uma meta-análise, realizada em 2001 ¹⁸⁵, em que sete estudos foram avaliados, tendo sido encontrada uma significância estatística (OR=1,35; p=0,01; IC95%=(1,06-1,72)) que sugere uma fraca correlação entre este polimorfismo e o desenvolvimento de DA. A maioria dos pesquisadores acredita na possibilidade de esse polimorfismo estar em desequilíbrio de ligação com algum sítio próximo, no cromossomo 12, que realmente seja importante na fisiopatologia da DA ^{178,179}.

5.4 - Antecedente familiar

Neste estudo, a presença de pelo menos um familiar acometido por demência proporcionou um maior risco para a ocorrência de DA. Tal resultado, está de acordo com a literatura^{211,212}.

5.5 - Considerações finais

No nosso estudo, demonstramos que em uma amostra de indivíduos brasileiros, somente o alelo $\epsilon 4$ da APOE representou risco genético para a ocorrência de DA, sendo seu efeito dose-dependente e mais deletério em mulheres do que em homens. O alelo $\epsilon 2$ representou fator protetor na casuística geral. Os polimorfismos da região promotora do gene da APOE e do gene do LRP não se mostraram relevantes quanto à ocorrência de DA.

Estes dados estão de acordo com a maior parte das pesquisas realizadas no Brasil e no exterior. A única característica variável é relativa à frequência do alelo $\epsilon 4$ na DA. Em comparação a outros estudos latino-americanos, encontramos maior frequência do alelo em indivíduos com DA. Porém, considerando todos os estudos latino-americanos, constatamos que a

freqüência do alelo $\epsilon 4$ nesses estudos é maior em relação a casuísticas da região asiática e da região sul da Europa e menor do que a observada na região norte da Europa e nos Estados Unidos.

Os estudos realizados nos Estados Unidos, com amostra de indivíduos caucasianos, mostram considerável variação da freqüência do alelo $\epsilon 4$ tanto em pacientes como em controles, o que torna difícil sua comparação sem uma análise estatística apropriada.

Devido a importância da presença de antecedente familiar de demência como fator de risco para DA e a freqüência variável do alelo $\epsilon 4$ em diferentes populações, devemos considerar a presença de outros fatores genéticos que possam se associar ao risco relacionado a presença do alelo $\epsilon 4$ da APOE e também a possibilidade de fatores ambientais interagirem de modo diferenciado com o polimorfismo da APOE em cada região.

6 - CONCLUSÕES

Na amostra de indivíduos brasileiros estudada, constatamos que:

6.1 - Apolipoproteína E

- 1) O alelo $\epsilon 4$ representou um fator de risco genético para o desenvolvimento de DA, sendo o seu efeito, dose-dependente.
- 2) O alelo $\epsilon 2$ representou um fator protetor, demonstrado somente na casuística geral.
- 3) A presença do alelo $\epsilon 4$ condicionou uma diminuição da idade de início da doença na casuística geral e no sub-grupo senil.
- 4) O efeito deletério do alelo $\epsilon 4$ foi maior em mulheres do que em homens.
- 5) Entre os muito idosos, o alelo $\epsilon 4$ apresentou uma menor frequência e não atuou como fator de risco.

6.2 - Região promotora do gene APOE

- 1) O alelo T representou um fator de risco na casuística geral e no subgrupo senil.
- 2) O alelo G representou um fator de risco protetor no subgrupo senil.
- 3) O locus -219 está em desequilíbrio de ligação com o locus do gene da apoE.

6.3 - Proteína relacionada ao receptor LDL

- 1) Os alelos C e T não representaram qualquer papel no desenvolvimento da DA, seja na casuística geral ou nos sub-grupos senil e pré-senil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fratiglioni L, Launer LJ, Andersen K, Breteler MM, Copeland JR, Dartigues JF, Lobo A, Martinez-Lage J, Soininen H, Hofman A. Incidence of dementia and major subtypes in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. Neurologic diseases in the elderly research group. *Neurology* 2000;54(11 suppl 5):S10-5.
2. Fujishima M, Kiyohara Y. Incidence and risk factors of dementia in a defined elderly Japanese population. *Ann NY Acad Sci* 2002;977:1-8.
3. Herrera Jr E, Caramelli P, Silveira AS, Nitrini R. Epidemiology survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alz Dis Assoc Disord* 2002;16:103-8.
4. Braak H, Braak E. Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 1996; 165S:3-12.
5. McKhann G, Drachman D, Folstein M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS/ADRDA workgroup under the auspices of the Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* 1984;34:939-44.
6. Wilcock GK, Esiri MM. Plaques, tangles and dementia. A quantitative study. *J Neurol Sci* 1982; 56:343-56.
7. Mandelkow EM, Schweers O, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E. Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein. *Ann N Y Acad Sci* 1996;777:96-106.

8. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4245-9.
9. Selkoe DJ. Physiological production of the β -amyloid protein and the mechanism of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994;53:438-47.
10. Van Nostrand WE, Schaier AH, Farrow JS, Cunningham D D. Protease nexin-II (amyloid beta-protein precursor): a platelet alpha-granule protein. *Science* 1990;248:745-8.
11. Koike H, Tomioka S, Sorimachi H, Saido TC, Maruyama K, Okuyama A, Fujisawa-Sehara A, Ohno S, Suzuki K, Ishiura S. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J* 1999;343:371-5.
12. Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Nat Acad Sci USA* 1999;96:3922-7.
13. Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, Smith TS, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as β -secretase. *Mol Cell Neurosci* 1999;14:419-27.
14. Vassar R, Benett BD, Babu-Khan S, Khan S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. β -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999;286:735-41.
15. Wolfe MS, De Los Angelis J, Miller DD, Xia W, Selkoe DJ. Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1999;38:11223-30.
16. Sisodia SS, Annaert W, Kim SH, De Strooper B. γ -secretase: never more enigmatic. *TINS* 2001;24(Suppl 11): S2-6.

17. Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gajdusek DC. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 1987;235:877-80.
18. De Strooper B, Annaert W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* 2000;113:1857-70.
19. Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel R. Beta-amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* 1992; 12:376-89.
20. Auld DS, Kar S, Quirion R. β -amyloid peptides as direct cholinergic neuromodulators: a missing link? *Trends Neurosci* 1998;21:43-9.
21. Geula C, Wu CK, Saroff D, Lorenzo A, Yuan M, Yankner BA. Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat Med* 1998;4(7):827-31.
22. LeBlanc A. The role of β -amyloid peptide in Alzheimer's disease . *Metabolic Brain Disease*. 1994;9:3-31.
23. Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zlokovic BV. Clearance of Alzheimer's amyloid- β_{1-40} peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 2000;106:1489-99.
24. St George-Hyslop PH. Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 2000;47:183-99.
25. Tilley L, Morgan K, Kalsheker N. Genetic risk in Alzheimer's disease. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1998;51:293-304.
26. Utermann G, Pruin N, Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E. III. Effect of a single polymorphic gene locus on plasma lipid levels in man. *Clin Genet* 1979;15:37-62.
27. Blue ML, Williams DL, Zucker S, Khan AS, Blum CB. Apolipoprotein E synthesis in human kidney, adrenal gland and liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1983;80:283-7.

28. Mazzone T. Apolipoprotein E secretion by macrophages: its potential physiological functions. *Cur Op Lipidol* 1996;7:303-7.
29. Braunwald E. Princípios da Patogenia da Aterosclerose. In *Tratado de Medicina Cardiovascular*. 2ed. Boston: Saunders,1987:1154-75.
30. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology*. 9ed. Philadelphia: Saunders, 1996: 865-76.
31. Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, Mahley RW Taylor JM. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest* 1985;76:1501-13.
32. Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1987;917:148-61.
33. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988;240:622-30.
34. Elshourbagy NA, Liao WS, Mahley RW, Taylor JM. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:203-7.
35. Ignatius MJ, Gebicke-Harter PJ, Skene JHP, Schilling JW Weisgraber KH, Mahley RW, Shooter EM. Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:1125-9.
36. Gelman BB, Rifai N, Goodrum JF, Bouldin TW, Krigman MR. Apolipoprotein E is released by rat sciatic nerve during segmental demyelination and remyelination. *J Neuropathol Exp Neurol* 1987; 46(6):644-52.
37. Boyles JK, Zoellner CD, Anderson LJ, Kosik LM, Pitas RE, Weisgraber KH, Hui DY, Mahley RW, Gebicke-Haerter PJ, Ignatius MJ, Shooter EM. A role for apolipoprotein E, apolipoprotein A-I, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat siatic nerve. *J Clin Invest* 1989;83(3):1015-31.

38. Poirier J, Baccichet A, Dea D, Gauthier S. Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience* 1993;55(1):81-90.
39. Rall SC, Weisgraber KH, Mahley RW. Human Apolipoprotein E: The complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 1982;257:4171-8.
40. Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC. Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet* 1991;48:1034-50.
41. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D. Apolipoprotein E: high-avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1977-81.
42. 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 ϵ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 1993; 43:1467-72.
43. Chartier-Harlin MC, Pasfitt M, Legrain S, Perez-Tur J, Broseau T, Evans A, Berr C, Vidal O, Roques P, Gourlet V, et al. Apolipoprotein E epsilon 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: Analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Hum Mol Genet* 1994;3:569-74.
44. Mayeux R, Stern Y, Ottman R, Tatemichi TK, Tang MX, Maestre G, Ngai C, Tycko B, Ginsberg H. The apolipoprotein ϵ 4 allele in patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1993;34:752-4.
45. Polvikoski T, Sulkava R, Haltia M, Kainulainen K, Vuorio A, Verkkoniemi A, Niinistö L, Halonen P, Kontula K. Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of β -amyloid protein. *N Engl J Med* 1995;333(19):1242-7.
46. Slooter AJC, Cruts M, Kalmijn S, Hofman A, Breteler MMB, Van Broeckhoven C, van Duijn CM. Risk estimates of dementia by apolipoprotein E genotypes from a population-based incidence study: The Rotterdam study. *Arch Neurol* 1998;55:964-8.

47. Lindsay J, Laurin D, Verreault R, Hébert R, Helliwell B, Hill GB, McDowell I. Risk factors for Alzheimer's disease: A prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *Am J Epidemiol* 2002;156:445-53.
48. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schemmechel 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* 1993;261:921-3.
49. Clair DS, Rennie M, Slorach E, Norrman, Yates C, Carothers A . Apolipoprotein E ϵ 4 allele is a risk factor for familial and sporadic presenile Alzheimer's disease in both homozygote and heterozygote carriers. *J Med Genet* 1995;32:642-4.
50. Adroer R, Santacruz P, Blesa R, López-Pousa S, Ascaso C, Oliva R. Apolipoprotein E allele frequency in Spanish Alzheimer and control cases. *Neurosci Lett* 1995;189:182-6.
51. Bergem ALM, Lannfelt L. Apolipoprotein E type ϵ 4 allele, heritability and age at onset in twins with Alzheimer disease and vascular dementia. *Clin Genet* 1997;52:408-13.
52. Levy-Lahad E, Lahad A, Wijsman EM, Bird TD, Schellenberg GD. Apolipoprotein E genotypes and age of onset in early-onset familial Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1995;38:678-80.
53. Weiner MF, Veja G, Risser RC, Honig LS, Cullum CM, Crumpacker D, Rosenberg RN. Apolipoprotein E ϵ 4, other risk factors, and course of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 1999; 45:633-8.
54. Yamagata Z, Asada T, Kinoshita A, Zhang Y, Asaka A . Distribution of apolipoprotein E gene polymorphisms in japanese patients with Alzheimer's disease and in japanese centenarians. *Hum Hered* 1997;47(1):22-6.
55. Juva K, Verkkoniemi A, Viramo P, Polvikoski T, Kainulainen K, Kontula K, Sulkava R. ApoE ϵ 4 does not predict mortality, cognitive decline, or dementia in the oldest old. *Neurology* 2000;54:412-5.
56. Louhija J, Viitanen M. Survival in Finnish centenarians in relation to apolipoprotein E polymorphism. *JAGS* 2001;49(7):1007-8.

57. Olichney JM, Sabbagh MN, Hofstetter CR, Galasko D, Grundman M, Katzman R, Thal LJ. The impact of apolipoprotein E4 on cause of death in Alzheimer's disease. *Neurology* 1997;49:76-81.
58. Tilvis RS, Strandberg TE, Juva K. Apolipoprotein E phenotypes, dementia and mortality in a prospective population sample. *J Am Geriatr Soc* 1998;46:712-5.
59. 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. *JAMA* 1997;278(16):1349-56.
60. Combarros O, Leno C, Oterino A, Berciano J, Fernández-Luna JL, Fernández-Viadero C, Peña N, Miró J, Delgado M. Gender effect on apolipoprotein e ϵ 4 allele-associated risk for sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 1998;97: 68-71.
61. Bretsky PM, Buckwalter JG, Seeman TE, Miller CA, Poirier J, Schellenberg GD, Finch CE, Henderson VW. Evidence for an interaction between apolipoprotein E genotype, gender, and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1999;13(4):216-21.
62. Howard L, West G, Rebeck W, Hyman BT. Frequency of the apolipoprotein E ϵ 2 allele is diminished in sporadic Alzheimer disease. *Neurosci Lett* 1994; 175:46-8.
63. Panza F, Solfrizzi V, Torres F, Mastroianni F, Colacicco AM, Basuile AM, Capurso C, D'Introno A, Del Parigi A, Capurso A . Apolipoprotein E in Southern Italy: protective effect of ϵ 2 allele in early- and late-onset sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2000;292:79-82.
64. Hyman BT, West HL, Rebeck GW, Lai F, Mann DMA. Neuropathological changes in Down's syndrome hippocampal formation - Effect of age and apolipoprotein E genotype. *Arch Neurol* 1995;52:373-8.
65. McNamara MJ, Gomez-Isla T, Hyman BT. Apolipoprotein E genotype and deposits of A β 40 and A β 42 in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1998;55:1001-4.

66. Holtzman DM, Fagan AM, Mackey B, Tenkova T, Sartorius L, Paul SM, Bales K, Ashe KH, Irizarry MC, Hyman BT. Apolipoprotein E facilitates neuritic and cerebrovascular plaque formation in an Alzheimer's disease model. *Ann Neurol* 2000; 47:739-47
67. Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Dong LM, Jakes R, Huang DY, Pericak-Vance M, Schemchel D, Roses AD. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11183-6.
68. Tesseur I, Dorpe JV, Spittaels K, Haute CV, Moechars D, Leuven FV. Expression of human apolipoprotein E4 in neurons causes hyperphosphorylation of protein tau in the brains of transgenic mice. *Am J Pathol* 2000;156:951-64.
69. Huang Y, Liu XQ, Wyss-Coray T, Brecht WJ, Sanan DA, Mahley RW. Apolipoprotein E fragments present in Alzheimer's disease brains induce neurofibrillary tangle-like intracellular inclusions in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(15):8838-43.
70. Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE. Differential effects of apolipoprotein E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science* 1994;264:850-2.
71. Arendt T, Schindler C, Brückner MK, Eschirich K, Bigl V, Zedlick D, Marcova L. Plastic neuronal remodeling is impaired in patients with Alzheimer's disease carrying apolipoprotein ϵ 4 allele. *J Neurosci* 1997;17(2):516-29.
72. Soininen H, Kosunen O, Helisami S, Mannermaa A, Paljärvi L, Talasniemi S, Rynänen M, Riekkinen P. A severe loss of choline acetyltransferase in the frontal cortex of Alzheimer patients carrying apolipoprotein ϵ 4 allele. *Neurosci Lett* 1995;187:79-82
73. Allen SJ, MacGowan SH, Tyler S, Wilcock GK, Robertson AGS, Holden PH, Smith SKF, Dawbarn D. Reduced cholinergic function in normal and Alzheimer's disease brain is associated with apolipoprotein E4 genotype. *Neurosci Lett* 1997;239:33-6.

74. Svensson AL, Warpman U, Hellström-Lindhäl E, Bogdanovic N, Lannfelt L, Nordeberg A. Nicotinic receptors, muscarinic receptors and choline acetyltransferase activity in the temporal cortex of Alzheimer patients with differing apolipoprotein E genotypes. *Neurosci Lett* 1997;232(1):37-40.
75. Corey-Bloom J, Tiraboschi P, Hansen LA, Alford M, Schoos B, Sabbagh MN, Masliah E, Thal LJ. E4 allele dosage does not predict cholinergic activity or sinapse loss in Alzheimer's disease. *Neurology* 2000;54:403-6.
76. Salehi A, Dubelaar EJJ, Mulder M, Swaab DF. Aggravated decreased in the activity of nucleos basalis neurons in Alzheimer's disease is apolipoprotein E-type dependent. *Neurobiology* 1998; 95(19): 11445-9.
77. Miyata M, Smith JD. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidatie insults and β -amyloid peptides. *Nat Genet* 1996;14:55-61.
78. Tamaoka A, Myatake F, Matsuno S, Ishii K, Nagase S, Sahara N, Ono S, Mori H, Wakabayashi K, Tsuji S, Takahashi H, Shoji S. Apolipoprotein E allele-dependent antioxidant activity in brains with Alzheimer's disease. *Neurology* 2000;54:2319-21.
79. Ihara Y, Hayabara T, Sasaki K, Kawada R, Nakashima Y, Kuroda S. Relationship between oxidative stress and apoE phenotype in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 2000;102:346-9.
80. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Artherosclerosis* 1988; 8:1-21.
81. Jarvik GP, Wijsman EM, Kukull WA, Schelleberg GD, Yu C, Larson EB. Interactions of apolipoprotein E genotype, total cholesterol level, age, and Sex in prediction of Alzheimer's disease: a case-control study. *Neurology* 1995;45:1092-6.
82. Notkola I, Sulkava R, Pekkanen J, Erkinjuntti T, Ehnholm C, Kivinen P, Tuomilehto J, Nissinen A . Serum total cholesterol, apolipoprotein E ϵ 4 allele and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiol* 1998;17:14-20.
83. Hoffman A, Ott A, Breteler MMB, Bots ML, Slooter AJC, Harskamp F, van Duijn CN, Van Broeckhoven C, Grobbee DE. Atherosclerosis, apolipoprotein E and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam study. *Lancet* 1997;349:151-4.

84. Simons M, Keller P, Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K. Cholesterol depletion inhibits the generation of β -amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6460-4.
85. Launer LJ, White LR, Petrovitch H, Ross GW, Curb JD. Cholesterol and neuropathologic markers of AD. A population-based autopsy study. *Neurology* 2001;57:1447-52.
86. Arispe N, Doh M. Plasma membrane cholesterol controls the cytotoxicity of Alzheimer's disease $A\beta$ (1-40) and (1-42) peptides. *FASEB J*. 2002;16:1526-36.
87. Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lütjohann D, Keller P, Runz H, Kühl S, Bertsch T, Bergmann K, Hennerici M, Beyreuther K, Hartmann T. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease peptides $A\beta$ 42 and $A\beta$ 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(10):5856-61.
88. Yao Z, Papadopoulos V. Function of β -amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity. *FASEB J* 2002;16:1677-9.
89. Björkhem I, Lütjohann D, Breuer O, Sakinis A, Wennmalm A . A importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol: turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with $^{18}O_2$ techniques in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 1997;272:30178-84.
90. Björkhem I, Lütjohann D, Diczfalusy U, Stahle L, Ahlborg G, Wahren J. Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J Lipid Res* 1998;39:1594-600.
91. Lütjohann D, Papassotiropoulos A, Björkhem I, Locatelli S, Bagli M, Oehring RD, Schelegel U, Jessen F, Rao ML, Bergmann K, Heun R. Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J Lipid Res* 2000;41:195-8.
92. Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA. Statins and the risk of dementia. *Lancet* 2000;356(9242):1627-31.

93. Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, Celesia G, Siegel G. Decreased prevalence of Alzheimer disease Associated with 3-hidroxi-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 2000;57:1439-43.
94. Rockwood K, Kirkland S, Hogan DB, MacKnight C, Merry H, Verreault R, Wolfson C, McDowell I. Use of lipid-lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people. *Arch Neurol* 2002;59:223-7.
95. Locatelli S, Lütjohann D, Schmidt HHJ, Carsten O, Beisiegel U, Bergmann K. Reduction of plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) levels using high-dosage simvastatin in patients with hypercholesterolemia. Evidence that simvastatin affects cholesterol metabolism in the human brain. *Arch neurol* 2002;59:213-6.
96. Vega GL, Weiner MF, Lipton AM, Bergmann K, Lütjohann D, Moore C, Svetlik D. Reduction in levels of 24S-hydroxycholesterol by statin treatment in patients with Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 2003;60:510-5.
97. Corbo RM, Scacchi R, Mureddu L, Mulas G, Alfano G. Apolipoprotein E polymorphism in Italy investigated in native plasma by a simple polyacrylamide gel isoelectric focusing technique. Comparison with frequency data of other European populations. *Ann Hum Genet* 1995;59:197-209.
98. Wang JC, Kwon JM, Shah P, Morris JC, Goate, A . Effect of APOE genotype and promoter polymorphism on risk of Alzheimer's disease. *Neurology* 2000;55:1644-5.
99. Lehtovirta M, Helisalmi S, Mannermaa A, Soininen H, Koivisto K, Ryyananen M, Riekkinen M, Ryyeknen P. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease in Eastern Finland. *Neurosci Lett* 1995; 185:13-5.
100. Sorbi S, Nacmias B, Forleo P, Latorraca S, Gobbini I, Bracco L, Piacentini S, Amaducci L. ApoE allele frequencies in Italian sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1994;177:100-2.

101. Tang MX, Maestre G, Tsai WY, Liu XH, Feng L, Chung WY, Chun M, Schofield P, Stern Y, Tycko B, Mayeux R. Effect of age, ethnicity, and head injury on the association between APOE Genotypes and Alzheimer's disease. *Ann NY Acad of Sci* 1996; 802:6-15.
102. Tang MX, Stern Y, Marder K, Bell K, Gurland B, Lantigua R, Andrews H, Feng L, Tycho B, Mayeux R. The APOE ϵ 4 and the risk of Alzheimer disease among african americans, whites and hispanics. *JAMA* 1998;279(10):751-5.
103. Harwood DG, Barker WW, Loewenstein DA, Ownby RL, Hyslop-George PS, Mullan M, Duara R. A cross-ethnic analyses of risk factors for AD in white hispanics and white non-hispanics. *Neurology* 1999;52:551-6.
104. Mak YT, Chiu H, Woo J, Kay R, Chan YS, Hui E, Sze KH, Lum C, Kwok T, Pang CP. Apolipoprotein E genotype and Alzheimer's disease in Hong Kong elderly Chinese. *Neurology* 1996;46:145-9.
105. Hu CJ, Sung SM, Liu HC, Hsu WC, Lee LS, Lee CC, Tsai CH, Chang JG. Genetic risk factors of sporadic Alzheimer's disease among chinese in Taiwan. *J Neurol Sci* 2000;181:127-31.
106. Chandak GR, Sridevi UM, Vas CJ, Panikker DM, Singh L. Apolipoprotein E and presenilin-1 allelic variation and Alzheimer's disease in India. *Hum Biol* 2002;74(5):683-93.
107. Morelli L, Leoni J, Castano EM, Mangone CA, Lambierto A. Apolipoprotein E polymorphism and late onset Alzheimer's disease in Argentina. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;61(4):426-7.
108. Jacquier M, Arango D, Villareal E, Torres O, Serrano ML, Cruts M, Montañes P, Cano C, Rodriguez MN, Serneels S, Broeckhoven CV. ApoE ϵ 4 and Alzheimer disease. Positive association in a Colombian Clinical series and review of the Latin-American studies. *Arq Neuropsiquiatr* 2001;59(1):11-7.
109. Almeida OP, Shimokomaki CM. Apolipoprotein E4 and Alzheimer's disease in São Paulo-Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 1997;55(1):1-7.

110. Souza DRS, 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* 2003 (*in press*).
111. Andrade FM, Larrandaburu M, Callegari-Jaques SM, Astaldo G, Hutz MH. Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer's disease in a southern Brazilian population. *Braz J Med Biol Res* 2000;33(5):529-37.
112. Hendrie HC, Benjamin MBCB, Osuntokun BO, Kathleen SH, Ogunniyi AO, Hui SL, Unverzagt FW, Gureje O, Rodenberg CA, Baiyewu O, Musick BS. Prevalence of Alzheimer's disease and dementia in two communities: nigerian africans and african americans. *Am J Psychiatry* 1995;152:1485-92.
113. Evans DA, Bennetti DA, Wilson RS, Bienias JL, Morris MC, Scherr PA, Hebert LE, Aggarwal N, Beckett LA, Joglekar R, Berry-Kraves E, Schneider J. Incidence of Alzheimer disease in a biracial urban community. Relation to apolipoprotein E allele status. *Arch Neurol* 2003;60:185-9.
114. Mayeux R, Saunders AM, Shea S, Mirra S, Evans D, Roses AD, Hyman BT, Crain B, Tang MX, Phelps CH. Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 1998;338:506-11.
115. Saunders AM, Hulette C, Welsh-Bohmer KA, Schemechel DE . Specificity, sensitivity, and predictive value of apolipoprotein-E genotyping for sporadic Alzheimer's disease. *Lancet* 1996;348:90-3.
116. Welsh-Bohmer KA, Gearing M, Saunders AM, Roses AD, Mirra S. Apolipoprotein E genotypes in a neuropathological series from the consortium to establish a registry for Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1997;42:319-25.
117. Tsuang D, Larson EB, Bowen J, McCormick W, Teri L, Nochlin D, Leverenz JB, Peskind ER, Lim A, Raskind MA, Thomson ML, Mirra SS, Gearing M, Schellenberg GD, Kukull W. The utility of apolipoprotein E genotyping in the diagnosis of Alzheimer's disease in a community-based case series. *Arch Neurol* 1999; 56:1489-95.

118. Wilson PWF, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease: a meta-analysis. *Arterioscler Thromb Biol* 1996;16(10):1250-5.
119. Scuteri A, Bos AJG, Zonderman AB, Brant LJ, Lakatta EG, Fleg JL. Is the ApoE allele an independent predictor of coronary events. *Am J Med* 2001;110:28-32.
120. Corbo RM, Vilaro T, Ruggeri M, Gemma AT, Scacchi R. Apolipoprotein E genotype and plas levels in coronary artery disease. A case-control study in the Italian population. *Clin Bioch* 1999;32(3):217-22.
121. Kalaria RN. Arteriosclerosis, apolipoprotein E, and Alzheimer's disease. *Lancet* 1997;349(9059):1174.
122. Slooter AJC, Bots ML, Havekes LM, del Sol AI, Cruts M, Grobbee DE, Hofman A, Van Broeckhoven C, Witteman JCM, van Duijn CM. Apolipoprotein E and carotid artery atherosclerosis: the Rotterdam study. *Stroke* 2001;32(9):1947-52.
123. Margaglione M, Seripa D, Gravina C, Grandone E, Vecchione G, Cappucci G, Merla G, Papa S, Postiglione A, Minno G, Fazio VM. Prevalence of apolipoprotein E alleles in healthy subjects and survivors of ischemic stroke. An Italian case-control study. *Stroke* 1998;29:399-403.
124. Kokubo Y, Chowdhury AH, Chigusa D, Yokoyama T, Sobue H, Tanaka H. Age-dependent association of apolipoprotein E genotypes with stroke subtypes in a Japanese rural population. *Stroke* 2000;31:1299-306.
125. Zhu L, Fratiglioni L, Guo Z, Basun H, Corder EH, Winblad B, Viitanen M. Incidence of dementia in relation to stroke and the apolipoprotein E ϵ 4 allele in the very old. Findings from a population-based longitudinal study. *Stroke* 2000;31:53-60.
126. Nicoll JAR, Burnett C, Love S, Graham DI, Dewar D, Ironside JW, Stewart J, Vinters HV. High frequency of apolipoprotein ϵ 2 allele in hemorrhage due to cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 1997;41:716-21.
127. Stengard JH, Pekkanen J, Sulkava R, Ehnholm C, Erkinjuntti T, Nissinen A. Apolipoprotein E polymorphism, Alzheimer's disease and vascular dementia among elderly Finnish men. *Acta Neurol Scand* 1995;92:297-8.

128. Isoe K, Urakami K, Sato K, Takahashi K. Apolipoprotein E in patients with dementia of the Alzheimer type and vascular dementia. *Acta Neurol Scand* 1996;93(2-3):133-7.
129. Molero AE, Pino-Ramirez G, Maestre GE. Modulation by age and gender of risk for Alzheimer's disease and vascular dementia associated with the apolipoprotein E- ϵ 4 allele in Latin Americans: findings from the Maracaibo Aging Study. *Neurosci Lett* 2001;307:5-8.
130. Souza DRS, Campos BF, Arruda EF, Yamamoto LJ, Trindade DM, Tognola WA. Influence of the polymorphism of apolipoprotein E in cerebral vascular disease. *Arq Neuropsiquiatr* 2003;61(1):7-13.
131. Harrington CR, Louwagie J, Rossau R, Vanmechelen E, Perry RH, Perry EK, Xuereb JH, Roth M, Wischik CM. Influence of apolipoprotein E genotype on senile dementia of the Alzheimer and Lewy body types. Significance for etiological theories of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1994;145(6):1472-84.
132. Hardy J, Crook R, Prihar G, Roberts G, Raghavan R, Perry R. Senile dementia of the Lewy body type has a apolipoprotein E ϵ 4 allele frequency intermediate between controls and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1994;182:1-2.
133. Rosenberg CK, Cummings TJ, Saunders, Widico C, McIntyre LM, Hulette CM. Dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2001;102:621-6.
134. Artiga MJ, Bullido MJ, Frank A, Sastre I, Recuero M, Garcia MA, Lendon CL, Han SW, Morris JC, Vásquez J, Goate A, Valdivieso F. Risk for Alzheimer's disease correlates with transcriptional activity of the APOE gene. *Hum Mol Gen* 1998;7(12):1887-92.
135. Minthon L, Hesse C, Sjögren M, Englund E, Gustafson L, Blennow K. The apolipoprotein E ϵ 4 allele frequency is normal in fronto-temporal dementia, but correlates with age at onset of disease. *Neurosci Lett* 1997;226:65-7.
136. Geschwind D, Karrim J, Nelson SF, Miller B. The apolipoprotein E ϵ 4 allele is not a significant risk factor for frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 1998;44:134-8.

137. Pickering-Brown SM, Owen F, Isaacs A, Snowden J, Varma A, Neary D, Furlong R, Daniel SE, Cairns NJ, Mann DMA. Apolipoprotein E ϵ 4 allele has no effect on age at onset or duration of disease in cases of frontotemporal dementia with Pick- or microvacuolar-type histology. *Exp Neurol* 2000;163:452-6.
138. Riemenschneider M, Diehl J, Müller U, Förstl H, Kurz A . Apolipoprotein E polymorphism in german patients with frontotemporal degeneration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;72:639-41.
139. Teasdale GM, Nicoll JAR, Murray G, Fiddes M. Association of apolipoprotein E polymorphism with outcome after head injury. *Lancet* 1997;350:1069-71.
140. Friedman G, From P, Sazbon L, Grinblatt I, Shochina M, Tsenter J, Babaey S, Yehuda AB, Groswasser Z. Apolipoprotein E ϵ 4 genotype predicts a poor outcome in survivors of traumatic brain injury. *Neurology* 1999;52:244-8.
141. Lichtman SW, Seliger G, Tycko B, Marder K. Apolipoprotein E and functional recovery from brain injury following postacute rehabilitation. *Neurology* 2000;55:1536-9.
142. Olivieri RL, Nicoletti G, Cittadella R, Manna I, Branca D, Zappia M, Gambardella A, Caracciolo M, Quatrone A. Apolipoprotein E polymorphisms and Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1999;277(2):83-6.
143. Tang G, Xie H, Xu L, Hao Y, Lin D, Ren D. Genetic study of apolipoprotein E gene, alpha-1 antichymotrypsin gene in sporadic Parkinson disease. *Am J Med Genet* 2002;114(4):446-9.
144. Eerola J, Launes J, Hellstrom O, Tienari PJ. Apolipoprotein E (APOE), PARKIN and catechol-o-methyltransferase (COMT) genes and susceptibility to sporadic Parkinson's disease in Finland. *Neurosci Lett* 2002;330(3):296-8.
145. Zareparsis S, Camicioli R, Sexton G, Bird T, Swanson P, Kaye J, Nutt J, Payami H. Age at onset of Parkinson disease and apolipoprotein E genotypes. *Am J Genet* 2002;111(4):459-60.

146. Sylantiev C, Chapman J, Hilkevich O, Nissipeanu P, Chistik V, Korczyn AD. The APOE allele and progression of disability in multiple sclerosis. *Neurology* 1998;50:A150.
147. Chapman J, Sylantiev C, Nissipeanu P, Korczyn AD. Preliminary observations on APOE epsilon 4 allele and progression of disability in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1999;56:1484-7.
148. Evangelou N, Jackson M, Beeson D, Palace J. Association of the APOE epsilon 4 allele with disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999;67:;203-5.
149. Angoti E, Mele E, Constanzo F, Avvedimento EV. A polymorphism (G→A transition) in the -78 position of the apolipoprotein A-I promoter increases transcription efficiency. *J Biol Chem* 1994;269:17371-4.
150. Bullido MJ, Artiga MJ, Recuero M, Sastre I, Garcia MA, Aldudo J, Lendon C, Han SW, Morris JC, Frank A, Vazquez J, Goate A, Valdivieso F. A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat Genet* 1998;18(1):69-71.
151. Artiga MJ, Bullido MJ, Sastre I, Recuero M, Garcia MA, Lendon CL, Han SW, Morris JC, Vazquez J, Goate A, Valdivieso F. Allelic polymorphism in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. *FEBS Lett* 1998;421:105-8.
152. Lambert JC, Berr C, Pasquier F, Delacourte A, Frigard B, Cottel D,, Pérez-Tur J, Mouroux V, Mohr M, Cécyre D, Galasko D, Lendon C, Poirier J, Hardy J, Mann D, Amouyel P, Chartier-Harlin MC. Pronounced impact of Th1E47cs mutation compared with -491 AT mutation on neural APOE gene expression and risk of developing Alzheimer's disease. *Hum Mol Gen* 1998b;7(9):1511-6.
153. Ahmed ARH, MacGowan Sh, Culpan D, Jones RW, Wilcock GK. The -491A/T polymorphism of the apolipoprotein E gene is associated with the APOE ε4 allele and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1999;263:217-9.
154. Laws SM, Taddei K, Martins G, Paton A, Fisher C, Clarnette R, et al. The -491AA polymorphism in the APOE gene is associated with increased plasma apoE levels in Alzheimer's disease. *NeuroReport* 1999;10:879-82

155. Rocks G, Cruts M, Bullido MJ, Backhovens H, Artiga MJ, Hofman A, Valdivieso F, Broeckhoven CV, Van Duijn CM. The -491 A/T polymorphism in the regulatory region of the apolipoprotein E gene and early-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1998;258:65-8.
156. Song YQ, Rogaeva E, Premkumar S, Brindle N, Kawarai T, Orlacchio A, Yu G, Levesque G, Nishimura M, Ikeda M, Pei Y, O'Toole C, Duara R, Barker W, Sorbi S, Freedman M, Farrer L, George-Hyslop PS. Absence of association between Alzheimer disease and the -491 regulatory region polymorphism of APOE. *Neurosci Lett* 1998;250:189-92.
157. Town T, Paris D, Fallin D, Duara R, Barker W, Gold M, Crawford F, Mullan M. The -491 apolipoprotein E promoter polymorphism association with Alzheimer's disease: independent risk and linkage disequilibrium with the Know APOE polymorphism. *Neurosci Lett* 1998;252:95-8.
158. Helisalmi S, Hiltunen M, Valonen P, Mannermaa A, Koivisto AM, Lehtovirta M, Ryyänäm M, Soininen H. Promoter polymorphism(-491 A/T) in the APOE gene of Finnish Alzheimer's disease patients and control individuals. *J Neurol* 1999;246:821-4.
159. Thome J, Gewirtz JC, Sakai N, Zachariou V, Retz-Junginger P, Retz W, Duman RS, Rösler M. Polymorphisms of the human apolipoprotein E promoter and bleomycin hydrolase gene: risk factors for Alzheimer's disease dementia?. *Neurosci Lett* 1999;274:37-40.
160. Chen L, Baum L, Ng HK, Chan LYS, Saatre I, Artiga MJ, Valdivieso F, Bullido MJ, Chiu HFK, Pang CP. Apolipoprotein E promoter and α 2-macroglobulin polymorphisms are not genetically associated with Chinese late onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1999; 269:173-7.
161. Toji H, Maruyama H, Sasaki K, Nakamura S, Kawakami H. Apolipoprotein E promoter polymorphism and sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population. *Neurosci Lett* 1999;259:56-8.
162. Casadei VM, Ferri C, Veglia F, Gavazzi A, Salani G, Cattaneo M, Sorbi S, Annoni G, Licastro F, Mariani C, Franceschi M, Grimaldi LME. APOE - 491 promoter polymorphisms is a risk factor for late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* 1999;53: 1888-9.

163. Roks G, Cruts M, Houwing-Duistermaat JJ, Dermaut B, Serneels S, Havekes LM, Hofman A, Breteler MMB, Van Broeckhoven C, van Duijin CM. Effect of the APOE –491 A/T promoter polymorphism on apolipoprotein E levels and risk of Alzheimer disease: The Rotterdam study. *Am J Med Genet* 2002;114:570-3.
164. Alvarez-Arcaya A, Combarros O, Llorca J, Sánchez-Guerra M, Berciano J, Fernández-Luna JL. The –491 TT apolipoprotein E promoter polymorphism is associated with reduced risk for sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2001;304:
165. Lambert, JC, Pasquier F, Cattel D, Frigard B, Amouyel P, Chartier-Harlin MC. A new polymorphism in the APOE promoter associated with risk of developing Alzheimer's disease. *Hum Mol Gen* ;1998;7:533-40.
166. Lambert JC, Araria-Goumidi L, Myllykangas L, Ellis C, Wang JC, Bullido MJ, Harris JM, Artiga MJ, Hernandez D, Kwon JM, Frigard B, Petersen RC, Cumming AM, Pasquier F, Sastre I, Tienari PJ, Frank A, Sulkava R, Morris JC, Clair DS, Mann DM, Wavrat-DeVrière F, Ezquerra-Trabalon M, Amouyel P, Hardy J, Haltia M, Valdivieso F, Goate AM, Perez-Tur J, Lendon CL, Chartier-Harlin MC. Contribution of APOE promoter polymorphisms to Alzheimer's disease risk. *Neurology* 2002;59(1):59-66.
167. Beyer K, Lao JI, Gómez M, Riutort N, Latorre P, Mate JL, Ariza A. The Th1/E47cs apolipoprotein E (APOE) promoter allele is a risk factor for Alzheimer disease of very later onset. *Neurosci Lett* 2002;326:187-90.
168. Pericak-Vance MA, Bass MP, Yamaoka LH, Gaskell PC, Scott WK, Terwedow HÁ, Menold MM, Conneally PM, Small GW, Vance JM, Saunders AM, Roses AD, Haines JL. Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer disease. *JAMA* 1997;278:1237-41.
169. Lendon CL, Talbot CJ, Craddock NJ, Han SW, Wragg M, Morris JC, Goate AM. Genetic association studies between dementia of the Alzheimer's type and three receptors for Apolipoprotein E in a caucasian population. *Neurosci Lett.* 1997;222:187-90.
170. Herz J, Kowal RC, Ho YK, Brown MS, Goldstein JL. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates endocytosis of monoclonal antibodies in cultured cells and rabbit liver. *J Biol Chem* 1990;265:21355-62.

171. Strickland DK, Kounnas MZ, Argraves WS. LDL Receptor-related Protein: a Multiligand Receptor for Lipoprotein and Proteinase Catabolism. *FASEB* 1995;9:890-8.
172. Beiseigel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK . The LDL Receptor-related protein, LRP, is a Apolipoprotein E-binding protein . *NATURE* 1989;314:162-4 .204-8.
173. Rosenberg RN. The molecular and genetic basis of AG: The end of the beginning. The 2000 Wartenberg lecture. *Neurology* 2000; 54:2045-54.
174. Pietrzik CU, Busse T, Merriam DE, Weggen S, Koo EH. The cytoplasmatic domain of the LDL receptor-related protein regulates multiple steps in APP processing. *EMBO J* 2002;21(21):5691-700.
175. Zuliani G, Hobbs HH. Tetranucleotide lenght polymorphism 5' of the α 2macroglobulin receptor (A2MR/LDL receptor-related protein (LRP)) gene. *Hum Mol Genet* 1994;3:215.
176. Clatworthy A, Gomez-Isla T, Rebeck GW, Wallace RB, Hyman BT. Lack of association of a polymorphism in the low-density lipoprotein receptor-related protein gene with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1997;54:1289 – 92.
177. Kamboh MI, Ferrell RE, DeKosky ST. Genetic association studies between Alzheimer's disease and two polymorphisms in the low density lipoprotein receptor-related protein gene. *Neuros Letter* 1998;244:65-8.
178. Fallin D, Kundtz A, Town T, Gauntlett AC, Duara R, Barker W, Cawforf F, Mullan M. No association between the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) gene and late-onset Alzheimer's disease in a community-based sample. *Neurosc Let* 1997;233:145-7.
179. Kang DE, Saitoh T, Chen X, Xia Y, Masliah E, Hansen LA, Katzman R. Genetic association of the low density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP) , a apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* 1997;49:56-61.
180. Baum L, Chen L, NG Ho-Keung, Chan YS, Mak YT, Woo J, Chiu HFK, Pang P. Low density lipoprotein receptor related protein gene exon 3 polymorphism association with Alzheimer's disease in chinese. *Neurosci lett* 1998;244:65-8.

181. Lambert JC, Vrièze FW, Amouyel P, Chartier Harlin, MC. Association at LRP gene locus with sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Lancet* 1998;351:1787-8.
182. Hollenbach E, Ackermann S, Hyman BT, Rebeck W. Confirmation of an association between a polymorphism in exon 3 of the low density lipoprotein receptor-related protein gene and Alzheimer's disease. *Neurology* 1998;50:1905-7.
183. Woodward R, Singleton AB, Gibson AM, Edwardson JA, Morris CM. LRP gene and late-onset Alzheimer's disease. *Lancet* 1998;352:239-40.
184. Beffert U, Arguin C, Poirier J. The polymorphism in exon 3 of the low density lipoprotein receptor-related protein gene is weakly associated with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1999;259:29-32.
185. Sánchez-Guerra M, Combarros O, Infante J, Llorca J, Berciano J, Fontalba A, Fernández-Luna JL, Peña N, Fernández-Viadero C. Case-control study and meta-analysis of low density lipoprotein receptor-related protein gene exon 3 polymorphism in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2001;316:17-20.
186. McIlroy SP, Dynan KB, Vahidassr DJ, Lawson JT, Patterson CC, Passmore P. Common polymorphism in LRP and A2M do not affect genetic risk for Alzheimer disease in northern Ireland. *Am J Med Genet* 2001;105:502-6.
187. Hatanaka Y, Kamino K, Fukuo K, Mitsuda N, Nishiwaki-Ueda Y, Sato N, Satoh T, Yamamoto H, Yoneda H, Imagawa M, Miki T, Ohta S, Ogihara T. Low density lipoprotein receptor-related protein gene polymorphisms and risk for late-onset Alzheimer's disease in a Japanese population. *Clin Genet* 2000;58:319-23.
188. Roses AD. Apolipoprotein E, a gene with complex biological interactions in the aging brain. *Neurobiology of disease* 1997;4:170-86.
189. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSMIV. 4th ed, Washington, DC, 139-43, 1994.

190. Nitrini R, Lefèvre BH, Mathias SC, Caramelli P, Carrilho PEM, Sauaia N, Massad E, Takiguti C, Silva IO, Porto CS, Magila MC, Scaff M. Testes neuropsicológicos de aplicação simples para o diagnóstico de demência. *Arq Neuropsiquiatr* 1994;52(4):457-65.
191. Bertolucci PHF, Brucki SMD, Campacci SR, Juliano Y. O mini-exame do estado mental em uma população geral. 1994;52(1):1-7.
192. Brucki SM, Malheiros SM, Okamoto IH, Bertolucci PH. Normative data on the verbal fluency test in the animal category in our milieu. *Arq Neuropsiquiatr* 1997;55(1):56-61.
193. Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleates cells. *Nucleic ac res* 1988;16:1215.
194. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990;31:545-8.
195. Ribeiro D. O povo brasileiro. A formação e o sentido do Brasil. 2ed. São Paulo: Companhia das Letras, 1995.
196. Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, Prado VF. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet.* 2000;67(2):444-61.
197. Small GW, Ercoli LM, Silverman DHS, Huang S –C, Komo S, Bookheimer SY, Lavretsky H, Miller K, Siddarth P, Rasgon NL, Mazziotta JC, Saxena S, Wu HM, Mega MS, Cummings JL, Saunders AM, Pericak-Vance MA, Roses AD, Barrio JR, Phelps ME. Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease. *PNAS* 2000;97(11):6037-42.
198. Juottonen K, Lehtovirta M, Helisami S, Riekkinen PJ, Soininen H. Major decreased of the entorhinal cortex in patients with Alzheimer's disease carryng the apolipoprotein E ε4 allele. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;65:322-7.
199. Geroldi C, Pihlajamäki M, Laakso MP, De Carli C, Beltramello A, Bianchetti A, Soininen H, Trabucchi M, Frisoni GB. APOE-ε4 is associated with less frontal and more medial temporal lobe atrophy in AD. *Neurology* 1999;53:1825-32.

200. Moffat SD, Szekely CA, Zonderman AB, Kabani NJ, Resnick SM. Longitudinal change in hippocampal volume as a function of apolipoprotein genotype. *Neurology* 2000;55(1):134-6.
201. Jack CR, Petersen RC, Xu YC, O'Brien PC, Waring SC, Tangalos EG, Smith GE, Ivnik RJ, Thibodeau SN, Kokmen E. Hippocampal Atrophy and apolipoprotein E genotype are independently associated with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1998;43:303-10.
202. Barber R, Gholkar A, Scheltens P, Ballard C, McKeith I, Morris CM, O'Brien JT. Apolipoprotein E ϵ 4 allele, temporal atrophy and white matter lesions in late-life dementias. *Arch Neurol* 1999;56:961-5.
203. Reiman EM, Caselli RJ, Chen K, Alexander GE, Bandy D, Frost J. Declining brain activity in cognitively normal apolipoprotein E ϵ 4 heterozygotes: A foundation for using positron emission tomography to efficiently test treatments to prevent Alzheimer's disease. *PNAS* 2001;98(6):3334-9.
204. Stone DJ, Rozovsky I, Morgan TE, Anderson CP, Hajian H, Finch CE. Astrocytes and microglia respond to estrogen with increased apoE mRNA in vivo and in vitro. *Exp Neurol* 1997;143:313-8.
205. Stone DJ, Rozovsky I, Morgan TE, Anderson CP, Finch CE. Increased synaptic sprouting in response to estrogen via an apolipoprotein E-dependent mechanism: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1998;18(9):3180-5.
206. Kadish I, Van Groen. Low levels of estrogen significantly diminish axonal sprouting after entorhinal cortex lesions in the mouse. *J Neurosci* 2002;22(10):4095-102.
207. Tsuang D, Kukull W, Sheppard L, Banhart RL, Peskind E, Edland SD, Schellenberg G, Raskind M, Larson EB. Impact of sample selection on APOE ϵ 4 allele frequency: a comparison of two Alzheimer's disease samples. *J Am Geriatr Soc* 1996;44:704-7.
208. Bales KR, Verina T, Dodel RC. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat Genet* 1997;263-4.

209. Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T. Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2892-97.
210. Lambert JC, Mann D, Goumidi L, Harris J, Amouyel P, Iwatsubo T, Lendon C, Chartier-Harlin MC. Effect of the APOE promoter polymorphisms on cerebral amyloid peptide deposition in Alzheimer's disease. *Lancet* 2001;357:608-9.
211. Silverman JM, Raiford K, Edland S, Fillenbaum G, Morris JC, Clarck CM, Kukull W, Heyman A . The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD)Part VI.Family history assesment: a multicenter study of first-degree relatives of Alzheimer's disease proband and nondemented spouse controls. *Neurology* 1994;44(7):1253-9.
212. Lautenslager NT, Cupples LA, Rao VS, Auerbach AS, Becker R, Burke J, Chui H, Duara R, Foley EJ, Glatt SL, Green RC, Jones R, Karlinsky H, Kukull WA, Kurz A, Larson EB, Martelli K, Sadovnick AD, Volicer L, Waring SC, Growdon JH, Farrer LA. Risk of dementia among relatives of Alzheimer" disease patients in the MIRAGE study: What is in store for the oldest old?. *Neurology* 1996;46:641-50.
213. Amouyel P, Hardy J, Haltia M, Valdivieso F, Goate AM, Pérez-Tur J, Lendon CL, Chartier-Harlin MC. Contribution of APOE promoter polymorphisms to Alzheimer's disease risk. *Neurology* 2002;59:59-66.

SUMMARY

PROMOTER AND CODING REGION APOE AND LRP GENES POLYMORPHISMS IN BRAZILIAN INDIVIDUALS WITH ALZHEIMER'S DISEASE

Background: Alzheimer's disease (AD) is the most frequent cause of dementia in Western countries. Two clinical subtypes of AD are recognized: early-onset, with clinical symptoms starting before or at 65 years of age, and late-onset, with manifestations starting after 65. Promoter (-219 and -491) and coding region apolipoprotein E (APOE) gene polymorphisms and a polymorphism at the low density lipoprotein receptor related protein (LRP) gene have been assigned as risk factors for AD.

Objective: To investigate the role of APOE polymorphisms $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$, A/T at position -491 and G/T at -219, and LRP polymorphism C/T, as risk factors for AD in Brazilian individuals.

Methods: One hundred twenty patients with probable AD and 120 controls were analysed. Genotype determination was performed following standard protocols.

Results: A significant difference between both groups for $\epsilon 4$ alleles was observed: frequency of $\epsilon 4$ allele in AD was 0.31 and in controls 0.10. Individuals with two $\epsilon 4$ alleles ($p=0.002$; OR=10.68; IC95%=2.33-48.96) had larger risk than individuals with only one allele ($p=0.001$; OR=3.76; IC95%=2.05-6.89). Presence of one $\epsilon 2$ allele had a protective influence ($p=0.025$; OR=0.38; IC95%=0.16-0.91). The T allele of -219 polymorphism was associated with an increased risk for AD ($p=0.038$; OR=2.09; IC95%=1.03-4.24), but this polymorphism was in linkage disequilibrium with $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ polymorphisms. No significant differences between both groups were observed for -491 APOE and C/T LRP polymorphisms.

Conclusion: In this Brazilian population, we confirmed that $\epsilon 4$ allele is a genetic risk factor and that $\epsilon 2$ allele had a protective influence for AD. We did not find any significant difference in frequency of polymorphisms for LRP gene or promoter region of APOE among patients and controls.

ANEXO