

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Maria Aparecida Camargos Bicalho

ESTUDO DOS FATORES PSICOSSOCIAIS, COMORBIDADES CLÍNICAS E
POLIMORFISMOS FUNCIONAIS DOS GENES *BDNF*, *COMT*, *5HTT* E *APOE* NO
BINÔMIO DEPRESSÃO-DEMÊNCIA NO IDOSO

Belo Horizonte

2010

Maria Aparecida Camargos Bicalho

ESTUDO DOS FATORES PSICOSSOCIAIS, COMORBIDADES
CLÍNICAS E POLIMORFISMOS FUNCIONAIS DOS GENES *BDNF*,
COMT, *5HTT* E *APOE* NO BINÔMIO DEPRESSÃO-DEMÊNCIA NO
IDOSO

**Tese apresentada como requisito para
obtenção do título de doutor junto ao
Programa de Pós-graduação em
Ciências Biológicas: Farmacologia
Bioquímica e Molecular da Universidade
Federal de Minas Gerais.**

Orientador: Prof. Luiz Armando De Marco

Co-orientador: Prof. Marco Aurélio

Romano-Silva

Belo Horizonte

2010



Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas:
Farmacologia Bioquímica e Molecular
Universidade Federal de Minas Gerais

DECLARAÇÃO

DECLARAMOS para os devidos fins, que **Maria Aparecida Camargos Bicalho** concluiu o Doutorado em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas desta Universidade, tendo defendido sua tese intitulada "*Estudo dos polimorfismos funcionais dos genes BDNF, COMT, 5HTT, e APOE no binômio depressão-demência no idoso*", aprovada em 29/04/2010. Esta declaração será válida até emissão do diploma definitivo pela UFMG. Belo Horizonte, 19 de julho de 2010.


Prof. Luiz Armando De Marco
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
Farmacologia Bioquímica e Molecular - UFMG

Às pessoas mais importantes: Marco Aurélio, Lucas e Arthur.

AGRADECIMENTOS:

Aos meus pais, exemplos de perseverança e dedicação.

À Tininha, irmã e amiga, por me representar nos momentos de ausência.

Ao Marco Aurélio, companheiro em todos os momentos da vida.

Ao Lucas e ao Arthur, pelos momentos importantes de suas vidas que eu não pude estar presente...

Aos meus sogros, Éden e Josire, pelo apoio, compreensão e cuidado com a minha família.

À Cláudia pela escuta sensata.

Ao mestre e amigo, Professor Luiz Armando de Marco, pela dedicação, apoio e disponibilidade.

À Professora Wolfanga Lentz Boson, pela paciência de ensinar desde o primeiro PCR.

Ao Professor Marco Aurélio Romano Silva responsável pela consolidação de grandes projetos.

À Débora, que vivenciou todas as dificuldades e contribuiu, direta ou indiretamente, para a sua concretização.

Aos “gigantes da geriatria” Professor Edgar Nunes de Moraes e Professora Marília Campos Abreu Marino, pelos ensinamentos sobre a “arte” da geriatria.

Ao Professor Marcus Vinícius Gomes, pela dedicação à ciência, exemplo para todos nós.

Ao amigo e companheiro de doutorado, Fausto Pimenta, com quem compartilhei os sucessos e as decepções ao longo destes anos.

Aos colegas do laboratório Juliana Drummond, Juliana Garcia, Elizabeth Miranda, Rodrigo Ribeiro, Bruno Rezende, Simone Becho, Patrícia Pereira, Alexandre Barros, Alexandre Magno, Victor Bortolo, Karem Torres, Flávia Lanna, Nancy, Lucélia, Patrícia Couto, Geisilaine Soares.

Aos alunos da iniciação científica, Guilherme Pimenta, Marina Melo e Érika Hansen, que tanto contribuíram ao longo de vários anos de trabalho. Aos mais novos, Samara Canguçu, Thiago Heilbuth, Satomi Shikanai e Jemima Sant`Anna que abdicaram das férias, dos feriados, dos finais-de-semana...para alcançarmos os resultados.

Ao responsável pela consolidação do enorme banco de dados, Daniel Vilela.

Ao Professor Rodrigo Nicolato, pela inestimável ajuda com seus conhecimentos de psicogeriatricia.

Ao Professor Leandro Malloy e seus alunos, Jonas, Mariana e Lafaiette, pela enorme contribuição na avaliação neuropsicológica.

Aos residentes e especializandos em geriatricia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, que facilitaram a coleta dos dados e tornaram mais agradável a realização desse trabalho.

À Maura pelo apoio, cuidado e carinho dispensado aos idosos e a todos nós.

À Flávia Lanna, pelo apoio e amizade.

À Rosária e Lígia, pelos “mutirões” permanentes na geriatricia.

A todos os idosos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do nosso trabalho.

Meus **especiais** agradecimentos a pessoas tão **especiais**, meus amigos do laboratório e jovens cientistas, Daniela Valadão, Luciana Rodrigues e Renan P Souza, que se dedicaram e estiveram presentes nos momentos mais difíceis da conclusão deste trabalho. Muito obrigada!!!

À Deus, por tudo....

RESUMO:

A doença de Alzheimer (DA) e o transtorno depressivo maior são doenças altamente prevalentes na população idosa e que determinam elevadas taxas de incapacidades. As duas doenças encontram-se intimamente relacionadas e estudos prévios sugerem que a depressão, principalmente a depressão de início tardio, possa representar um fator de risco para a DA ou uma manifestação precoce da mesma. Depressão e DA, habitualmente, apresentam co-morbidades associadas principalmente fatores de risco vasculares, como diabetes mellitus (DM), dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e doença arterial coronariana. A DA e a depressão são doenças complexas que envolvem múltiplos mecanismos fisiopatológicos. Vários polimorfismos parecem estar implicados na fisiopatologia de ambas as doenças. O único polimorfismo inquestionavelmente envolvido com a DA é o alelo $\epsilon 4$ do gene da Apolipoproteína E (*APOE*). Entretanto diversos estudos sugerem a participação de outros genes na DA. Por tratar-se de doença cujo tratamento ainda apresenta eficácia modesta, de elevado custo e com efeitos colaterais significativos, aliado ao fato de acometer um número significativo de indivíduos idosos, determinando incapacidade irreversível, faz-se necessário esclarecer melhor os mecanismos envolvidos na origem e progressão da doença.

Realizamos um estudo transversal envolvendo 406 idosos, subdivididos em: grupo controle (97 indivíduos), DA sem sintomas comportamentais e psicológicos da demência (*Behavioral Psychological Symptoms of Dementia* - BPSD) (75 indivíduos), DA com BPSD (94 indivíduos), depressão de início tardio (140 pacientes). Analisamos co-variáveis sócio-demográficas, clínicas e genotipagem dos polimorfismos funcionais dos genes *BDNF*, *APOE*, *COMT* e *5-HTTLPR*. Analisamos as frequências alélicas, genotípicas, haplotípica e interações entre os genes comparando os três grupos de pacientes com o grupo controle.

Nossos resultados mostraram associação entre o sexo feminino e as duas doenças; entre baixa escolaridade e DA; DA e depressão; forte associação entre DA e depressão; DM e dislipidemia correlacionaram-se apenas com DA com BPSD. A *APOE* $\epsilon 4$ associou-se fortemente com o diagnóstico de DA com e sem BPSD e com idade de início mais precoce da doença.

Observamos que a depressão está associada ao alelo *Met* do *rs6265* e apresentou interação sinérgica entre *5-HTTLPR* e *rs4680*. Na DA ocorreu interação

sinérgica entre *rs6265* e *rs429358* e apenas uma tendência ao sinergismo (estatisticamente não significativa) entre *rs6265* e *rs7124442*. Os fatores psicossociais estavam associados com DA com BPSD e depressão de início tardio.

Esse estudo nos permite relacionar alguns fatores sócio-demográficos, psicossociais, genéticos e clínicos envolvidas no binômio depressão-demência no idoso.

Palavras chave: Doença de Alzheimer; Transtorno depressivo maior; polimorfismo genético; idoso; fatores de risco.

ABSTRACT:

Alzheimer's disease (AD) and major depressive disorders are highly prevalent diseases in the population with high rates of disability. These two diseases are closely related and previous studies suggest that depression, particularly late-onset depression, may represent a risk factor for AD or an early manifestation of disease. Depression and AD usually have comorbidities associated with vascular risk factors such as diabetes mellitus (DM), dyslipidemia, hypertension (HBP) and coronary artery disease. AD and depression are complex diseases that involve multiple causes. Several polymorphisms seem to be implicated in the pathophysiology of both diseases. The only polymorphism unquestionably involved with the AD is the APOE ϵ 4. However, several studies suggest the involvement of other genes in AD. Because it is a disease whose treatment is still very inefficient, with high cost and significant side effects, and the fact that affects a significant number of elderly individuals, determining irreversible disability, it is necessary to clarify the mechanisms involved in its etiology and disease progression. We conducted a cross-sectional study involving 406 elderly divided into control group (97 subjects), AD without behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD) (75 subjects), DA with BPSD (94 individuals), late onset depression (140 patients). We analyzed the socio-demographic and clinical co-variables, as well as genotyping of functional polymorphisms of *BDNF*, *APOE*, *COMT* and *5-HTTLPR* genes. We analyzed allele frequencies, genotypes, haplotypes and interactions between genes by comparing the three groups of patients with the control group. Our results showed an association between female sex and the two diseases; between low schooling and DA; smoking DA and depression; a strong association between AD and depression; diabetes and dyslipidemia were correlated only with AD with BPSD. The *APOE* ϵ 4 was strongly associated with the diagnosis of AD with and without BPSD and earlier age of onset. We observed that depression is associated with the *Met* allele of *rs6265* and showed synergistic interaction between *5-HTTLPR* and *rs4680*. There was an association between DA and *rs6265* and *rs429358* and only a tendency for synergism (not statistically significant) between *rs6265* and *rs7124442*. Psychosocial factors were associated with AD with BPSD and late onset depression. This study allows us to correlate some socio-demographic, psychosocial, genetic and clinical data involved in depression-dementia in the elderly.

Key words: Alzheimer`s disease; depressive disorder, major; polymorphism, genetic elderly; aged; risk factors.

LISTA DE FIGURAS		Página
Figura 1	Evolução da população geral segundo os censos demográficos e projeção 1950-2050	24
Figura 2	A hipótese das neurotrofinas	32
Figura 3	Modelo fisiopatológico de depressão geriátrica com disfunção cerebral	35
Figura 4	Processamento da Proteína Precursora Amilóide (APP)	38
Figura 5	Formação dos emaranhados neurofibrilares a partir da proteína <i>tau</i>	40
Figura 6	Incidência de BPSD encontrada por Vega e cols. (2007)	43
Figura 7	Heterogeneidade etiológica da depressão na DA	45
Figura 8	Gene do transportador de serotonina (<i>5-HTT</i>) polimorfismos e sua função	50
Figura 9	Meta-análise da associação entre <i>Val66Met</i> e transtornos psiquiátricos	57
Figura 10	Representação esquemática da <i>APOE</i> humana e os SNPs <i>rs429358</i> e <i>rs7412</i>	61
Figura 11	Estrutura tridimensional do sítio de ligação da <i>APOE2</i> e <i>APOE3</i> ao receptor	62

Figura 12	Papel das isoformas da <i>APOE</i> em cérebros saudáveis e na patogênese da DA	64
Figura 13	Estrutura da <i>Catecol-o-metiltransferase</i> (<i>COMT</i>) e a localização dos principais polimorfismos	68
Figura 14	Fluxograma de seleção dos indivíduos para o estudo	75
Figura 15	Inventário Neuropsiquiátrico (NPI)	78
Figura 16	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida do PCR do 5- <i>HTTLPR</i>	85
Figura 17	Gel de Poliacrilamida do RFLP de trialélico do 5- <i>HTTLPR</i>	88
Figura 18	Resultado de PCR em tempo real	89
Figura 19	Dendrograma da interação gene-gene DA comparado com controles	101
Figura 20	Dendrograma da interação gene-gene DA/BPSD comparado com controles	101
Figura 21	Dendrograma da interação gene-gene DA comparado com controles	101

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Classificação do transtorno depressivo maior de acordo com a gravidade dos sintomas	27
Tabela 2	Escala de Depressão Geriátrica – 15 pontos (GDS-15)	29
Tabela 3	Frequências alélica e genotípica de <i>Val66Met</i> nas diversas populações	55
Tabela 4	Frequências alélica e genotípica do <i>rs712442</i> nas diversas populações estudadas	56
Tabela 5	Variantes genéticas determinadas pelos polimorfismos da <i>APOE</i> (<i>rs429358</i> e <i>rs7412</i>)	60
Tabela 6	Frequências alélica e genotípica do <i>rs429358</i>	65
Tabela 7	Frequências alélica e genotípica do <i>rs7412</i>	66
Tabela 8	Frequências alélica e genotípica do <i>rs4680</i>	68
Tabela 9	Bateria de testes cognitivos e de transtornos psiquiátricos utilizados no Centro de Atenção ao Idoso	77
Tabela 10	Protocolo de coloração pela prata	86
Tabela 11	Polimorfismos funcionais do <i>BDNF</i>	90
Tabela 12	Polimorfismos funcionais do <i>COMT</i>	90
Tabela 13	Polimorfismos funcionais do <i>APOE</i>	90
Tabela 14	Proporção de indivíduos participantes separados de acordo com o gênero	94

Tabela 15	Resultados das comparações das variáveis sócio-demográficas entre os grupos do estudo (valores de p)	95
Tabela 16	Equilíbrio de Hardy-Weinberg da amostra para todos os marcadores (valores de p)	96
Tabela 17	Resumo dos SNPs e respectivos alelos	97
Tabela 18	Comparação dos resultados das distribuições genotípicas dos grupos depressão de início, DA e DA com <i>BPSD</i> comparados ao grupo controle	98
Tabela 19	Análise haplótipo <i>BDNF</i> <i>rs7124442</i> e <i>rs6265</i> , <i>rs429358</i> e <i>rs7412</i> - DA comparada aos controles	99
Tabela 20	Análise haplótipo <i>BDNF</i> <i>rs7124442</i> , <i>rs6265</i> ; <i>rs429358</i> e <i>rs7412</i> - DA <i>BPSD</i> comparada aos controles	99
Tabela 21	Análise haplótipo <i>BDNF</i> <i>rs7124442</i> e <i>rs6265</i> , <i>rs429358</i> e <i>rs7412</i> - depressão início tardio comparada aos controles	100
Tabela 22	Resultados das interações genéticas pelo MDR após análise de permutação	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

ABRAZ - Associação Brasileira de Alzheimer

ACTH - hormônio adrenocorticotrópico

AMPc - monofosfato de adenosina cíclica (*Cyclic Adenosine Monophosphate*)

APA – Associação Americana de Psiquiatria (*American Psychiatric Association*)

APOE – apolipoproteína E

APP – proteína precursora amilóide (*Amyloid Precursor Protein*)

Arg - arginina

AVD – atividades de vida diária

AVE - acidente vascular encefálico

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*)

BPSD – sintomas comportamentais e psicológicos da demência (*Behavioural and Psychological Symptoms in Dementia*)

C - cisteína (aminoácido)

CDR – escala clínica de demência (*Clinical Dementia Rating*)

CERAD – Consórcio para estabelecimento de Registro para a Doença de Alzheimer (*Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*)

CID - Classificação Internacional de Doenças

COEP: Conselho de Ética em Pesquisa

COMT - *Catecol-O-metiltransferase*

Cr - cromossomo

CREB - elemento ligante responsivo ao AMPc (*Response Element Binding Protein*)

CRF - fator liberador de corticotropina (*Corticotropin Releasing Factor*)

Cys- cisteína

DA – Doença de Alzheimer

DAC - doença arterial coronariana

DE - desvio padrão

DIT – depressão de início tardio

DM – diabetes melitus

DNA - ácido desoxirribonucléico

dATP – desoxi-adenosinatrifosfato

dCTP –desoxi-citosinatrifosfato

dGTP – desoxi-guanidinatrifosfato

dNTP - desoxi-nucleotídeo trifosfato
dTTP – desoxi-timidinatrifosfato
ddNTP - dideoxi-nucleotídeo trifosfato
DSM-IV - *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*
EUA - Estados Unidos da América
g - gramas
GDS - escala de depressão geriátrica (Geriatric Depression Scale)
GR - receptor de glicocorticóide (Glucocorticoid receptor)
Glu - ácido glutâmico (aminoácido)
EDTA - ácido tetra etileno diamínico
FAB - *Frontal and Assessment Battery*
HF - história familiar
HHA - hipotálamo-hipófise-adrenal
5-HT - 5-hidroxitriptamina
5-HTT- transportador da serotonina (*5- hydroxytryptamine transporter*)
5-HTTLPR - polimorfismo da região promotora do gene 5-HTT
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDE - enzima degradadora de insulina (insulin-degrading enzyme)
 K^+ - íon potássio
Kb - kilobase
KCl - cloreto de potássio
LCR - Líquido céfalo-raquidiano
LD - desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium*)
mBDNF - BDNF maduro
MDMA - 3,4-metilenodioximetanfetamina (“ecstasy”)
MDRD - *Modification of Diet in Renal Disease*
 $MgCl_2$ - cloreto de magnésio
mg - miligramas
ml - mililitros
mM - milimolar
mRNA - ácido ribonucléico (RNA) mensageiro
 μl - microlitro
 Na^+ - íon sódio
NIMH - *National Institute of Mental Health*

NINCDS - *National Institute Of Neurological and Communicative Disorders and Stroke*

Ng - nanogramas

OMS - Organização Mundial de Saúde

OR - *odds ratio*

PA - Pressão Arterial

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

pb - pares de bases

PCR - reação da polimerase em cadeia (*polimerase chain reaction*)

PKA - *cAMP-dependent protein kinase* (proteína kinase dependente de AMPc)

PE - tomografia com emissão de pósitron

pmoles- picomoles

RFLP - polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição (*restriction fragment length polymorphism*)

RR - risco relativo

SERT - transportador de serotonina

SES - Secretaria Estadual de Saúde

SLC6A4 - transportador de serotonina (*solute carrier family 6 member 4*)

SNC - sistema nervoso central

SNP - polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*)

SUS – Sistema único de Saúde

SSRI - inibidores seletivos da recaptação de serotonina (*selective serotonin reuptake inhibitors*)

T - treonina (aminoácido)

TDM - transtorno depressivo maior

TrekB - receptor da tirosina kinase B (*tyrosine receptor kinase B*)

TSR - *template supression reagent*

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

VNTR - repetição em tandem em número variável (*variable number tandem repeats*)

SUMÁRIO

RESUMO	8	
ABSTRACT	10	
LISTA DE FIGURAS	12	
LISTA DE TABELAS	14	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	16	
1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Envelhecimento populacional, depressão e demência	23
1.2	Depressão Geriátrica	24
1.2.1	Teoria das monoaminas	31
1.2.2	Hipótese das neurotrofinas	31
1.2.3	Sistema hipotálamo-hipófise-adrenal	32
1.3	Doença de Alzheimer	35
1.4	Depressão e Demência	43
1.5	Os genes candidatos	48
1.5.1	O gene do transportador da serotonina	48
1.5.2	<i>BDNF</i>	52
1.5.3	<i>Apolipoproteína E</i>	59
1.5.4	<i>COMT</i>	66

2	OBJETIVOS	70
3	MATERIAIS E MÉTODOS	72
3.1	Desenho do estudo	73
3.2	Seleção da amostra	74
3.3	Variáveis analisadas	79
3.3.1	Dados sócio-demográficos	79
3.3.2	Dados sobre Demência de Alzheimer	79
3.3.3	Dados sobre Depressão Maior de Início Tardio	80
3.3.4	Dados do grupo controle	80
3.3.5	Variáveis Clínicas Analisadas	80
3.3.6	Variáveis genéticas	81
3.4	Considerações éticas	82
3.5	Genotipagem	83
3.5.1	Extração do DNA a partir de leucócitos pelo método da solução salina concentrada	83
3.5.2	Amplificação do DNA pela técnica do PCR	83
3.5.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida	85
3.5.4	Coloração pela Prata	86

3.5.5	PCR - RFLP - Análise do tamanho do fragmento de restrição	87
3.5.6	PCR em tempo real (<i>Real time PCR</i>)	88
3.5.7	Ensaio de <i>TaqMan</i>	89
3.6	Análise dos dados	91
4	RESULTADOS	93
4.1	Caracterização da amostra	94
4.2	Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE)	96
4.3	Resultados das genotipagens	97
4.4	Resultados das características clínicas e psicossociais dos grupos associadas à genotipagem	102
5	DISCUSSÃO	104
6	CONCLUSÃO	117
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

	ANEXOS	148
Anexo 1	Critérios diagnósticos para demência (DSM IV) - Critérios diagnósticos da NINCDS-ADRDA para o diagnóstico de doença de Alzheimer	149
Anexo 2	Escala de Cornell para o diagnóstico de depressão na demência de Alzheimer	154
Anexo 3	Critérios diagnósticos de depressão na demência de Alzheimer do National Institute of Mental Health (NIMH)	156
Anexo 4	Critérios diagnósticos de hipertensão arterial sistêmica segundo as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial Sistêmica	158
Anexo 5	Parecer do Conselho de Ética em Pesquisa	159
Anexo 6	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	160
Anexo 7	Protocolo de extração de DNA dos leucócitos pelo método da solução salina concentrada	162
Anexo 8	Soluções utilizadas na reação de PCR	164
Anexo 9	Soluções utilizadas para Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	165
Anexo 10	Soluções utilizadas na coloração pela Prata	166
Anexo 11	Declaração de aprovação	167
Anexo 12	Ata de defesa de tese do programa de pós graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular	168

INTRODUÇÃO

1.1- ENVELHECIMENTO POPULACIONAL, DEPRESSÃO E DEMÊNCIA:

No século XX, principalmente após a década de 50, ocorreu uma mudança na pirâmide etária mundial. O processo de envelhecimento que antes era restrito aos países desenvolvidos está ocorrendo rapidamente nos países em desenvolvimento. Segundo projeção do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2025 o Brasil possuirá a sexta população mundial em número absoluto de idosos.

Desde os anos 60, a taxa de crescimento da população brasileira vem experimentando paulatinos declínios intensificados pelas quedas pronunciadas na taxa de fecundidade. No período 1950 a 1960 a taxa de crescimento da população recuou de 3.04% ao ano para 1.05% em 2008. Mas, em 2050 a taxa de crescimento cairá para 0.291%, o que representa uma população de 215.3 milhões de habitantes. Segundo as projeções atuais, o país apresenta um potencial de crescimento populacional até 2039. A partir de então serão registradas taxas de crescimento negativas, o chamado “crescimento zero”, que correspondem à queda no número da população (IBGE, 2008). A Figura 1 demonstra a evolução da população geral segundo os censos demográficos e projeção 1950 a 2050.

A síntese de indicadores sociais do IBGE aponta que a expectativa de vida passou de 69.3 em 1997 para 72.9 anos em 2008, o que contribui para o aumento da população idosa no país (IBGE, 2008).

Dentre os diversos transtornos que afetam os idosos a saúde mental merece especial atenção. Os transtornos mentais, principalmente depressão e demência, comprometem 20% da população idosa. Estas patologias levam à perda de independência e autonomia e consequentemente, determinam aumento das taxas de idosos incapacitados.

No Brasil existem cerca de 15 milhões de pessoas acima de 60 anos de idade. A demência acomete 7.1% da população acima de 65 anos de idade. Dados do Ministério da Saúde (2006) indicam que a prevalência de depressão entre idosos varia de 4.7 a 36.8, demonstrando a importância dessa entidade entre a população idosa.

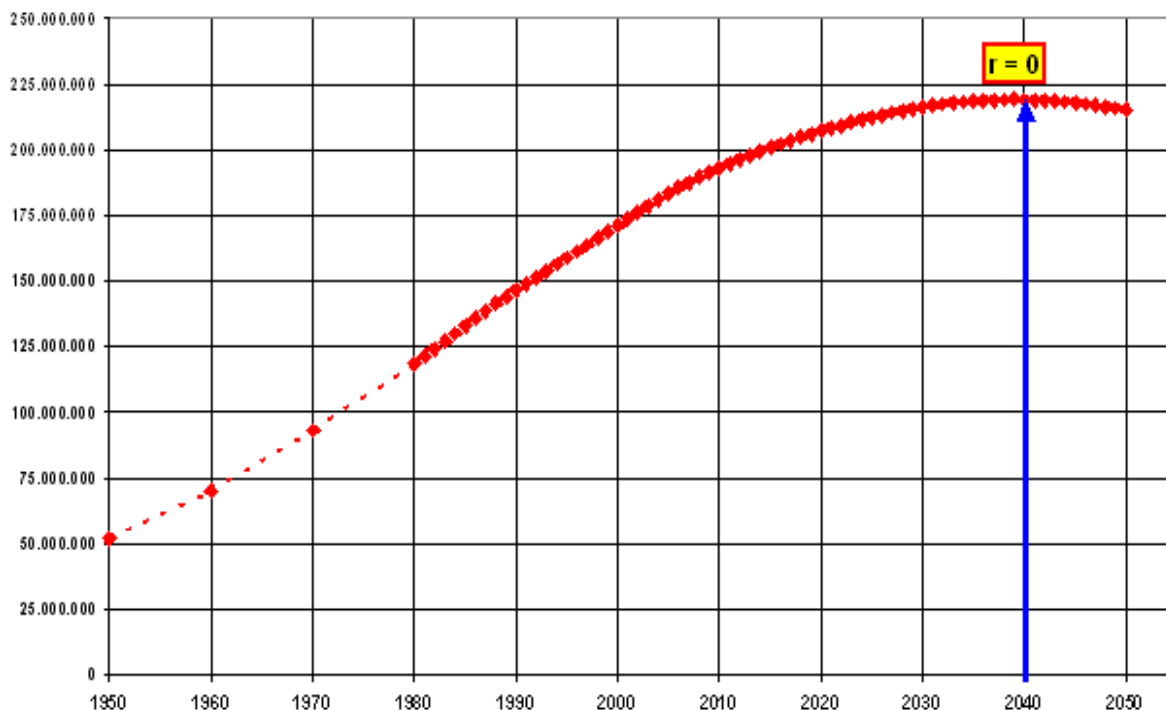


Figura 1: Evolução da população geral segundo os censos demográficos e projeção 1950-2050.

Fonte: IBGE, 2008.

Portanto, o envelhecimento populacional brasileiro, assim como ocorre em outros países, tem determinado uma transição epidemiológica com aumento da incidência de doenças como depressão e demência na população geriátrica.

1.2- DEPRESSÃO GERIÁTRICA:

Para os próximos 20 anos, estima-se que o transtorno depressivo unipolar venha a assumir a segunda posição como causa de incapacidade em todo o mundo e a primeira causa nas nações com renda per capita elevada (Gonzalez e cols., 2010).

Vários estudos comprovam que indivíduos portadores de uma ou mais doenças crônicas apresentam risco aumentado para desenvolverem depressão. O envelhecimento populacional e o consequente aumento na prevalência de doenças crônicas determinam uma elevação concomitante na taxa de prevalência dessa doença. Ela compromete mais o estado de saúde do indivíduo do que qualquer outra doença. Além disso, tanto o estado de saúde quanto a qualidade de vida de portadores de doenças crônicas, principalmente diabetes melitus (DM), são

agravados pelos transtornos depressivos. Apesar desses dados, a depressão é frequentemente subdiagnosticada neste grupo de indivíduos e, conseqüentemente, não é adequadamente tratada, constituindo-se em um importante problema de saúde pública mundial (Moussavi e cols., 2007).

O fardo econômico para a sociedade é considerável e comparável àquele determinado por doenças como a doença arterial coronariana (DAC). Compromete indivíduos relativamente jovens, determinando elevada perda econômica durante períodos prolongados acarretando um impacto significativo na produtividade.

Indivíduos com depressão maior também apresentam um risco elevado de apresentarem co-morbidades psiquiátricas, como abuso de substâncias e distúrbio de ansiedade (Weissman e cols., 1996).

Portadores de depressão frequentemente tentam suicídio. O suicídio representa aproximadamente 0.9% das causas de morte em todo o mundo. Estima-se que 85 a 90% das vítimas de suicídio apresentem um transtorno psiquiátrico, sendo a depressão grave considerada como o mais frequente. Aproximadamente 21% dos pacientes com transtorno depressivo recorrente tentará suicídio (OMS, 2001). E, quinze por cento dos indivíduos com transtorno depressivo maior grave morre por suicídio (DSM IV) (Trémeau e cols., 2005; Viana e cols., 2006).

A taxa de depressão maior é de aproximadamente 5% na população geral. Entretanto, a prevalência ao longo da vida chega a 20%. O risco para transtorno depressivo maior durante a vida tem variado de 10 a 25% para as mulheres e de 5 a 12% para os homens. Estudo epidemiológico populacional envolvendo 10 países mostrou uma taxa de depressão ao longo da vida variando de 1.5 a 19 casos a cada 100 adultos e uma taxa anual de 0.8 a 5.8 casos para cada 100 adultos (Weissman e cols., 1996).

Pelo menos 20% dos pacientes portadores de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares e DM, sofre de transtornos depressivos, embora o diagnóstico seja realizado em apenas um terço destes pacientes (Wong & Licinio, 2001). Estima-se que um terço dos pacientes evoluía com depressão maior num período de 12 meses após o infarto agudo do miocárdio. Dentre os portadores de câncer, um quarto sofre de depressão. Acomete principalmente indivíduos hospitalizados (10 a 12%), institucionalizados (12 a 14%) e durante processo de recuperação de doenças agudas. Aproximadamente metade dos pacientes com doenças neurológicas apresenta sintomas depressivos (Costa e Silva, 2005;

Ebmeier e cols., 2006, Alexopoulos & Kelly, 2009). A incidência da depressão está aumentando e a faixa etária de acometimento reduzindo (Wong & Licinio, 2001).

No Brasil, a prevalência de depressão entre idosos varia de 4,7 a 36,8%, dependendo fundamentalmente dos instrumentos diagnósticos utilizados e de seus pontos de corte, além da gravidade dos sintomas. A prevalência e a incidência da depressão dobram após 70 a 85 anos. É um dos transtornos psiquiátricos mais comuns em idosos (Ministério da Saúde, 2006) e caracteriza-se por uma tríade de sintomas: humor deprimido, anedonia e fadiga (Alexopoulos, 2005).

O transtorno depressivo maior apresenta curso clínico caracterizado por um ou mais episódios depressivos maiores e ausência de episódios maníacos, mistos ou hipomaníacos¹.

Nos episódios típicos de cada um dos três graus de depressão (leve, moderada ou grave) (tabela 1), o paciente apresenta um rebaixamento do humor, redução de energia e diminuição da atividade. Existe redução da capacidade de experimentar prazer (anedonia), perda de interesse e diminuição da concentração associadas em geral à fadiga importante, mesmo após um esforço mínimo. Esses sintomas são denominados somáticos. Observam-se em geral alterações do sono, com despertar matinal precoce e redução do apetite. A insônia e a perda de energia estão presentes na maioria dos pacientes com depressão. Existe quase sempre uma diminuição da auto-estima e da autoconfiança e, frequentemente idéias de culpa e/ou indignidade, mesmo nas formas leves (Weissman e cols., 1996).

¹Episódios hipomaníacos - transtorno caracterizado pela presença de uma elevação ligeira, mas persistente do humor, da energia e da atividade associada em geral a um sentimento intenso de bem-estar físico e psíquico.

Tabela 1: Classificação do transtorno depressivo maior de acordo com a gravidade dos sintomas:

Depressão maior	≥ 5 sintomas depressivos, incluindo humor deprimido ou anedonia, durante período ≥ duas semanas;
Leve	Poucos sintomas além daqueles necessários para o diagnóstico; mínima alteração funcional;
Moderada	Maior número e intensidade dos sintomas depressivos, moderada alteração funcional;
Grave	Intensidade marcante e persistência dos sintomas depressivos, substancial alteração funcional.

Adaptado de: Whooley & Simon (2000)

Segundo o manual de estatística e diagnóstico de doenças mentais (DSM IV) (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), a Depressão Maior é diagnosticada quando se satisfazem os seguintes critérios:

- Cinco ou mais dos sintomas descritos abaixo presentes durante o mesmo período de duas semanas, representando uma alteração a partir do funcionamento anterior; sendo pelo menos um dos sintomas (1) humor deprimido ou (2) perda de interesse ou prazer.
- Sintomas nitidamente secundários a condição médica geral ou alucinações não relacionadas ao distúrbio do humor não devem ser incluídos.

A seguir relacionamos os sintomas que permitem o diagnóstico:

1. Humor deprimido na maior parte do dia, durante quase todos os dias, indicado por relato subjetivo (por exemplo, sente-se triste ou vazio) ou observação feita por outros (chora muito);
2. Interesse ou prazer acentuadamente diminuído por todas ou quase todas as atividades na maior parte do dia, durante quase todos os dias (indicado por relato subjetivo ou observação feita por outros);
3. Perda ou ganho significativo e involuntário de peso (por exemplo, mais de 5% do peso corporal em um mês) ou, diminuição ou aumento do apetite durante quase todos os dias. Em crianças, considerar ausência do ganho ponderal esperado;

4. Insônia ou hipersonia durante quase todos os dias;
 5. Agitação ou retardo psicomotor durante quase todos os dias (observáveis por outros; não significando sensações subjetivas de inquietação ou lentidão);
 6. Fadiga ou perda de energia durante quase todos os dias;
 7. Sentimento de inutilidade ou culpa excessiva ou inadequada (que pode ser delirante), durante quase todos os dias (não meramente auto-incriminação ou culpa por estar doente);
 8. Capacidade diminuída de pensar ou concentrar-se, ou indecisão, durante quase todos os dias (por relato subjetivo ou observação feita por outros);
 9. Pensamentos de morte recorrentes (não apenas medo de morrer), ideação suicida recorrente sem um plano específico, tentativa de suicídio ou plano específico para cometer suicídio;
- Os sintomas não satisfazem os critérios para um episódio misto;
 - Os sintomas não se devem aos efeitos fisiológicos diretos de determinadas substâncias (por exemplo, abuso de drogas ou medicamentos) ou de uma condição médica geral (por exemplo, hipotireoidismo);
 - Os sintomas não se devem ao luto, ou seja, após o óbito de um ente querido eles persistem por mais de dois meses ou se caracterizam por acentuado prejuízo funcional, preocupação mórbida com desvalia, ideação suicida ou retardo psicomotor.

Em idosos o padrão de sintomas depressivos é absolutamente diferente daquele manifestado por outros grupos etários. Relato espontâneo de problemas como “ansiedade, stress e depressão” é menos freqüente. O reconhecimento dos sintomas depressivos é, muitas vezes, dificultado pela presença de doenças orgânicas. Além disso, sintomas de depressão em idosos podem ser equivocadamente considerados como consequências naturais do envelhecimento e de eventos adversos da vida (Stek, 2004; Yang & George, 2005).

A depressão geriátrica refere-se às síndromes depressivas definidas pela APA (*American Psychiatric Association*) no DSM IV e na Classificação Internacional de Doenças (CID-10) que comprometem o indivíduo após os 65 anos de idade. Em idosos, as síndromes depressivas frequentemente acometem portadores de doenças crônicas, declínio cognitivo e incapacidades. Além do sofrimento pessoal e familiar, a depressão piora a evolução das co-morbidades clínicas e promove

incapacidades (Alexopoulos, 2005).

Muitas dificuldades diagnósticas são superadas pela utilização de instrumentos diagnósticos específicos para idosos, como a escala de depressão geriátrica (*Geriatric Depression Scale* - GDS) versão 15 itens (Sheikh & Yesavage, 1986). Esta escala foi validada para a língua portuguesa (Almeida & Almeida, 1999) e é utilizada para o diagnóstico e monitoramento da gravidade dos sintomas durante a evolução da depressão maior em idosos. A versão em português dessa escala encontra-se descrita na tabela 2. O ponto de corte 4/5 (não caso/caso) apresenta sensibilidade de 86.5% e especificidade de 71.1% (Almeida & Almeida, 1999; Paradela e cols., 2005).

Baseado nos critérios do DSM IV, a depressão geriátrica subdivide-se em depressão de início precoce ou de início tardio, considerando a época do primeiro episódio antes ou após os 65 anos, respectivamente.

Tabela 2: Escala de Depressão Geriátrica – 15 pontos (GDS-15)

Perguntas	Sim	Não
1- Você está basicamente satisfeito com sua vida?	0	1
2- Você se aborrece com frequência?	1	0
3- Você se sente um inútil nas atuais circunstâncias?	1	0
4- Você prefere ficar em casa a sair e fazer coisas novas?	1	0
5- Você sente que sua situação não tem saída?	1	0
6- Você tem medo que algum mal vá lhe acontecer?	1	0
7- Você acha que sua situação é sem esperança?	1	0
8- Você acha maravilhoso estar vivo?	0	1
9- Você sente que sua vida está vazia?	1	0
10- Você sente que a maioria das pessoas está melhor que você?	1	0
11- Você se sente com mais problemas de memória do que a maioria?	1	0
12- Você perdeu muitos de seus interesses e atividades?	1	0
13- Você se sente de bom humor a maior parte do tempo?	0	1
14- Você se sente cheio de energia?	0	1
15- Você se sente feliz a maior parte do tempo?	0	1
Pontuação		

Idosos não dementes portadores de depressão frequentemente apresentam dificuldades na concentração, velocidade do processamento mental e nas funções executivas. A depressão em idosos pode ser um sintoma de demência incipiente (Skoog, 2004). Os sinais e sintomas de depressão frequentemente precedem o declínio cognitivo e a demência. Muitos idosos manifestam quadro de incapacidade cognitiva reversível durante um episódio de depressão (“pseudodemência”),

principalmente na depressão de início tardio. Entretanto, uma grande proporção de indivíduos com demência reversível mantém algum grau de incapacidade cognitiva após remissão do episódio depressivo e cerca de 40% desenvolve demência irreversível dentro de três anos de seguimento. A prevalência pontual de depressão em pacientes portadores de doença de Alzheimer (DA) é de 17% e é ainda mais frequente nas demências subcorticais². Desta forma, a demência reversível pode representar uma manifestação precoce e frequente de um transtorno irreversível (Alexopoulos, 2005).

A depressão de início precoce também é um possível fator de risco para demência. A depressão crônica recorrente e o transtorno depressivo maior cujo primeiro episódio ocorreu mais de 10 anos antes do quadro de demência associam-se a um aumento de risco para o desenvolvimento de DA (Alexopoulos, 2005).

A depressão é considerada como uma desordem multifatorial, que envolve múltiplos genes. Os fatores genéticos são complexos, poligênicos e epistáticos³ (Lesch, 2004). Segundo Urani e cols. (2005), os episódios depressivos desenvolvem-se quando fatores patogênicos alcançam dimensões extremas ou ocorrem simultaneamente. Estes fatores induzem disfunções transitórias ou persistentes em várias regiões ou sistemas cerebrais.

Três teorias principais tentam definir seus mecanismos bioquímicos e moleculares: hipóteses das monoaminas, das neurotrofinas e do sistema hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA).

² Demência subcortical – síndrome clínica que apresenta como características principais: bradifrenia (lentificação do pensamento), anormalidades de memória, perda da habilidade em manipular o conhecimento previamente adquirido e alterações do humor e personalidade (especialmente apatia, depressão e irritabilidade). Pode ocorrer na doença de Parkinson, doença de Huntington, paralisia supranuclear progressiva, calcificação idiopática dos núcleos da base, síndromes degenerativas talâmicas e espinocerebelares, entre outras.

³ Epistático- de epistasia - epistasia é a interação entre genes. A epistasia ocorre quando a ação de um gene é modificada por um ou diversos genes que se associam independentemente. Epistasia e interação gênica se referem ao mesmo fenômeno. Entretanto, epistasia é amplamente utilizado na genética de populações e se refere especialmente a propriedades estatísticas do fenômeno.

1.2.1- TEORIA DAS MONOAMINAS:

As monoaminas agem através de mudanças bioquímicas complexas nos neurônios pós-sinápticos do sistema nervoso central (SNC), através da interação com proteínas sinalizadoras (proteínas G) nas membranas celulares pós-sinápticas. As proteínas G ligadas aos receptores estimulados pelas monoaminas produzem mudanças na forma como os neurônios pós-sinápticos respondem aos neurotransmissores clássicos (glutamato e ácido aminobutírico).

A depressão seria resultante de uma alteração na neurotransmissão de serotonina, noradrenalina e dopamina. A deficiência monoaminérgica poderia resultar de vários mecanismos, tais como a redução da síntese ou aumento da degradação de neurotransmissores, alteração da função dos receptores dos neurotransmissores e alteração dos sistemas de transcrição ativados pelos receptores pós-sinápticos (Urani e cols., 2005).

1.2.2- HIPÓTESE DAS NEUROTROFINAS:

O Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (*BDNF*) (*Brain-derived neurotrophic factor*) e outras neurotrofinas influenciam a plasticidade estrutural e apresenta efeitos tróficos nos neurônios. A deficiência de *BDNF* está envolvida na fisiopatologia da depressão.

A figura 2 resume a via *CREB* (elemento ligante responsivo ao *AMPC* - *response element binding protein*) - *BDNF-TrkB* (receptor da tirosina kinase B - *tyrosine receptor kinase B*), que encontra-se envolvida na fisiopatologia e no tratamento da depressão. A geração de monofosfato de adenosina cíclica (*AMPC*) resulta na ativação da proteína kinase dependente de *AMPC* (*PKA*) que, por sua vez, ativa o fator de transcrição *CREB*, através de sua fosforilação. *CREB*, uma vez ativado, aumenta a transcrição de muitos genes alvos, incluindo o *BDNF*, que exerce seu efeito através da ativação de seu receptor específico – *TrkB* (Shelton, 2007).

O stress crônico e o subsequente aumento dos níveis séricos de corticosteróides são considerados fatores de risco importantes para o desenvolvimento de um episódio depressivo. O stress ou a corticoterapia, através da ativação de receptores de glicocorticóides, causa redução de RNA mensageiro

(mRNA) do *BDNF* no hipocampo e em outras regiões cerebrais consideradas importantes na patogênese da depressão. O stress e a depressão determinam redução da atividade da via *CREB-BDNF-TreKB*, enquanto os antidepressivos levam a uma ativação desta cascata de sinalização (Groves, 2007).

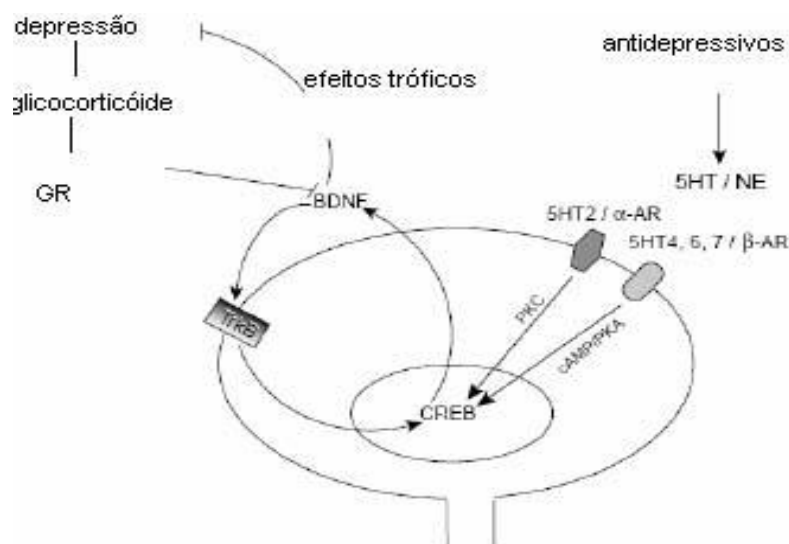


Figura 2: A hipótese das neurotrofinas:

GR - receptor de glicocorticóide; NE - noradrenalina; 5HT - serotonina
Modificado de: Urani e cols.(2005).

1.2.3- SISTEMA HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL:

O stress é considerado como um importante fator patogenético para o desenvolvimento de episódios depressivos. Sob condições fisiológicas, o sistema HHA é ativado por estressores internos e externos, de forma a regular as necessidades energéticas em situações críticas ou ameaçadoras ao organismo. O hipotálamo produz fator liberador de corticotropina (CRF) que estimula a produção de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela hipófise, determinando assim, a síntese e liberação de glicocorticóides pelas supra-renais. A liberação de cortisol exerce um *feedback* negativo no hipotálamo para manter o equilíbrio do sistema (Shelton, 2007).

Muitos pacientes com episódios depressivos graves apresentam alteração da secreção circadiana do cortisol, determinando níveis séricos significativamente maiores do que em indivíduos normais. Esses níveis usualmente retornam ao

normal com a remissão do quadro depressivo. Os mecanismos envolvidos na hiperatividade do sistema HAA na etiologia dos transtornos do humor parecem envolver vários níveis anatômicos de regulação, dos centros cerebrais mais altos à supra-renal. Os receptores de glicocorticóides apresentam papel fundamental na regulação do sistema HHA, pois eles acionam o *feedback* negativo dos glicocorticóides no hipotálamo e hipocampo. Uma disfunção desses receptores poderia explicar a superativação do eixo observada em pacientes deprimidos (Young, 2006). Alternativamente, uma super-regulação primária do CRF poderia levar a desinibição do sistema HHA e sub-regulação do receptor de corticosteróide, resultando em hipercortisolemia (Blazer & Hybels, 2005).

A hipercortisolemia secundária ao stress crônico leva a redução da neurogênese e à morte neuronal o que determina redução do volume do hipocampo (Alexopoulos, 2005; Alexopoulos e cols., 2005).

A depressão cursa com um aumento da ativação das amígdalas resultante da inibição inadequada das estruturas pré-frontais e do hipercortisolismo. Este hipermetabolismo das amígdalas associa-se à acentuação dos sintomas depressivos e das emoções negativas (Alexopoulos e cols., 2005).

As disfunções fronto-estriatais, amigdalíanas e hipocámpais podem ser causadas por vários processos – degenerativos, vasculares, imunes e inflamatórios – envolvidos na disfunção das estruturas subcorticais. Estas disfunções conferem vulnerabilidade para depressão e determinam maior predisposição para cronicidade e recaída. Desta forma, permitem que outros fatores (condições clínicas, incapacidades, adversidades psicossociais, história de doença psiquiátrica prévia) contribuam para o desenvolvimento da síndrome depressiva e influenciem seu curso clínico (Alexopoulos e cols., 2005).

Em idosos, a depressão maior é uma síndrome heterogênea quanto à etiologia e aos aspectos relacionados ao tratamento. Assim como em adultos mais jovens, sua causa frequentemente é multifatorial e fatores biológicos e psicossociais desempenham papel fundamental. As adversidades psicossociais – luto, desemprego, isolamento, institucionalização, incapacidade, dificuldades econômicas - contribuem para as mudanças fisiopatológicas. Processos relacionados à idade e às doenças, incluindo aterosclerose e inflamação, alterações endócrinas e imunológicas comprometem a integridade das vias fronto-estriatais (associadas à

disfunção executiva⁴), amígdala e hipocampo e aumentam a vulnerabilidade para a depressão (Alexopoulos, 2005).

A depressão apresenta uma associação bidirecional com as doenças vasculares. A agregação plaquetária encontra-se aumentada sugerindo que a depressão aumente o risco de doenças cardiovasculares. Outras alterações sistêmicas incluem hipercortisolismo, aumento da gordura abdominal, redução da massa óssea, e aumento do risco de Hipertensão Arterial Sistêmica e DM. Idosos não demenciados, portadores de depressão maior, frequentemente apresentam dificuldades de concentração, processamento de linguagem e, função executiva. Essas alterações melhoram, mas não resolvem completamente após remissão da depressão geriátrica (White e cols., 2001; Thomas e cols., 2004; Alexopoulos & Kelly, 2010). A figura 3 demonstra um modelo fisiopatológico de depressão geriátrica associada à disfunção cerebral.

Quando comparados com indivíduos portadores de depressão maior de início precoce, os portadores da forma de início tardio apresentam história familiar menos prevalente para transtorno do humor e mais prevalente para demência; pior desempenho nos testes neuropsicológicos; maior taxa de evolução para demência; maior comprometimento auditivo neurossensorial, alargamento de ventrículos laterais e hiperintensidade de sinal em T2 em substância branca (leucoaraiose⁵) à ressonância nuclear magnética (Thomas e cols., 2004; Alexopoulos, 2005; Alexopoulos & Kelly, 2010).

O termo “depressão vascular” propõe que as doenças vasculares predisõem, precipitam ou perpetuam a depressão e esta, através de um ciclo vicioso, agrava as doenças vasculares. Assim, existe uma íntima relação entre depressão e doença vascular. As doenças vasculares associam-se à depressão e a depressão é um fator de risco independente para DAC e acidente vascular encefálico (AVE). O conceito “depressão vascular” deve incluir a idéia que a depressão por si só induz e piora a doença vascular. Indivíduos que apresentam depressão em associação com doença vascular fazem parte de um grupo de pior prognóstico evolutivo. Estes indivíduos

⁴ Disfunção executiva – expressão clínica das anormalidades fronto-estriatais, caracteriza-se por retardo psicomotor, anedonia, comprometimento das atividades instrumentais de vida diária, redução do insight (habilidade de um indivíduo para encontrar soluções para os seus problemas) e sintomas vegetativos.

⁵ Leucoaraiose - rarefação da substância branca por degeneração arteriolar levando a infartos incompletos. Associada a doença cerebrovascular, doença cardíaca, tabagismo, HAS, redução do fluxo sanguíneo cerebral, disfunção executiva e incapacidade.

apresentam maior incapacidade cognitiva global, comprometimento da nomeação e da fluência verbal; retardo psicomotor mais significativo; maior perda de insight⁶; menos agitação e menos sentimento de culpa (Thomas e cols., 2004; Smith e cols, 2007; Alexopoulos & Kelly, 2010).

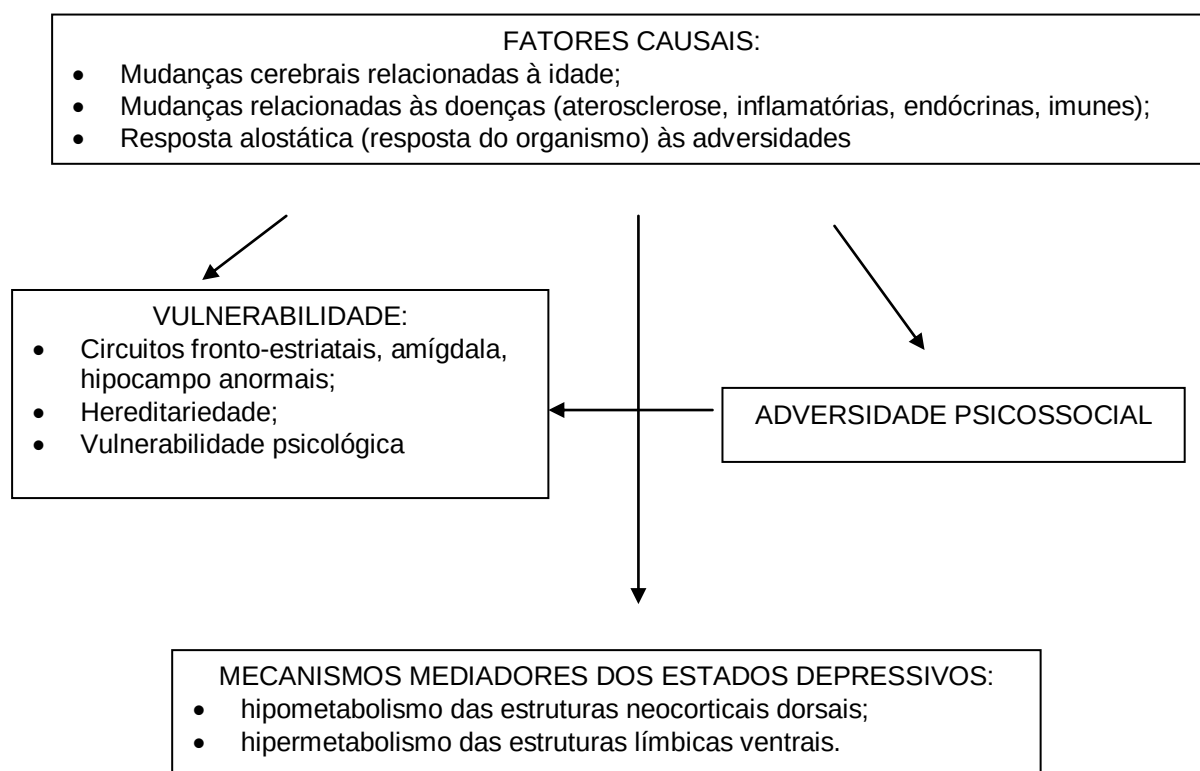


Figura 3: Modelo fisiopatológico de depressão geriátrica com disfunção cerebral. Modificado de: Alexopoulos, 2005.

1.3- DOENÇA DE ALZHEIMER

Demência – *dementia* - palavra de origem latina que significa “mente distante” ou estar fora da própria mente. Trata-se de uma síndrome clínica decorrente de doença ou disfunção cerebral, usualmente de natureza crônica e progressiva, caracterizada por alteração de múltiplas funções cognitivas, incluindo memória, atenção e aprendizado, pensamento, orientação, compreensão, cálculo, linguagem e julgamento. O comprometimento das funções cognitivas é comumente

⁶ *Insight* – indica o conhecimento, pelo paciente, de que os sintomas de sua doença são anormalidades ou fenômenos mórbidos.

acompanhado, e ocasionalmente precedido, por deterioração do controle emocional, comportamento social ou motivação. A demência produz um declínio apreciável no funcionamento intelectual e interfere com as Atividades de Vida Diárias (AVD). É uma importante causa de incapacidade e, apresenta custo elevado para o sistema de saúde e para a sociedade como um todo (Scazufca e cols., 2008; Aprahamian e cols., 2009).

Em três de novembro de 1906, Alois Alzheimer apresentou à comunidade científica a descrição clínica e neuropatológica do caso de uma paciente, Auguste D., que havia falecido aos 55 anos com quadro de demência progressiva com 4 anos de evolução. Os achados patológicos observados incluíam placas e emaranhados. Alzheimer não foi o pioneiro a descrever os achados clínicos da doença. Entretanto, parece ter sido o primeiro a relatar as alterações neuropatológicas da doença. Desta forma, descreveu a doença na sua integralidade (Hardy, 2006).

Em todo o mundo, 35 milhões de pessoas possuem Doença de Alzheimer (MIM # 104311), sendo 5.5 milhões nos Estados Unidos da América (EUA). É a principal causa de demência, responsável por 50 a 56% dos casos em autópsia e séries clínicas. DA combinada à doença vascular cerebral é responsável por 13 a 17% dos casos de demência. Em estudo populacional realizado no município de Catanduva, São Paulo, onde 25% dos idosos foram avaliados, Herrera e cols. (1998) encontraram uma prevalência da doença semelhante à da população mundial. Na população acima de 65 anos, a prevalência de demência foi de 7.1%, com uma taxa de incidência anual de 7.7 casos/100.000 habitantes. Em 2008 no Brasil existiam cerca de 21 milhões de pessoas acima de 60 anos de idade (IBGE, 2010). Considerando-se a taxa de prevalência de demência como de 7.1%, o Ministério da Saúde estima que no Brasil existam cerca de 1.1 milhões de indivíduos portadores de demência e que 55% dos casos são atribuídos à DA. Também, foi observada maior prevalência entre as mulheres, apresentando uma razão média masculino-feminino de 0.54 (Herrera e cols., 1998). Após o diagnóstico, a evolução para o óbito ocorre dentro de três a nove anos (Querfurth & LaFerla, 2010).

A DA pode ser dividida em dois grupos, baseado na data do início dos sintomas: familiar ou de início precoce (antes dos 60 anos) e, esporádica ou de início tardio (após os 60 anos). Os achados neuropatológicos são semelhantes nas duas formas da doença. Entretanto, elas apresentam características epidemiológicas

e etiológicas distintas. A forma de início precoce é extremamente rara e causada por defeitos monogênicos (*APP*⁷, *PSEN 1* e *PSEN 2*⁸) que seguem um padrão autossômico dominante. Por outro lado, a forma tardia manifesta-se tipicamente após os 60 anos de idade, sendo responsável por 97% de todos os casos e apresenta etiologia complexa.

O principal fator de risco para DA esporádica é a idade. Dessa forma, o aumento da expectativa de vida na população brasileira resulta em um incremento considerável de casos de doenças neurodegenerativas, dentre elas a DA. A incidência da doença dobra a cada cinco anos após os 65 anos, atingindo 40 a 50% da população aos 85 anos (Querfurth & LaFerla, 2010). Outros fatores de risco são: história familiar positiva, presença do alelo $\epsilon 4$ da Apolipoproteína E (*APOE*), baixa escolaridade, traumatismo crânio-encefálico, hipertensão arterial sistêmica, hipercolesterolemia, hiperhomocisteinemia, DM e história de depressão maior (Lindsay e cols., 2002; Scazufca e cols., 2008; Aprahamian e cols., 2009).

A DA tem como substrato neuropatológico a presença de placas amilóides extracelulares (placas senis) e emaranhadas neurofibrilares. Também são observadas perdas sinápticas, apoptose neuronal, infiltrado inflamatório e angiopatia amilóide. A principal causa de disfunção cerebral é a degeneração/desconexão das sinapses, com comprometimento da plasticidade sináptica. Essas alterações se devem à alteração do metabolismo da proteína precursora amilóide (*APP*) e determinam desordem do ciclo celular e morte neuronal (Selkoe, 2001; Small & Gandy, 2006; Jellinger, 2009).

As placas neuríticas (ou placas senis ou placas amilóides) são focos microscópicos de deposição amilóide extracelular. Associam-se a lesão axonal e dendrítica e, geralmente, são encontradas em grande quantidade nos córtex do sistema límbico e áreas associadas. Tais placas contêm depósitos extracelulares de proteína β -amilóide ($A\beta$) que ocorrem principalmente sob a forma de filamentos. Neuritos distróficos ocorrem tanto dentro quanto ao redor dos depósitos amilóides. Também estão intimamente associadas com antígenos de superfície expressos na

⁷ *APP*- proteína precursora amilóide é uma proteína transmembrana tipo I. O gene da *APP* localiza-se no cromossomo 21. Mutações na *APP* podem causar DA de início precoce ou amiloidose cerebrovascular hereditária.

⁸ *PSEN 1* e *PSEN 2* (Presenilinas 1 e 2) - localizadas nos cromossomos 14 e 1, respectivamente. Mutações nas presenilinas 1 e 2 alteram o processamento da *APP* pela mudança na relação entre a taxa de formação dos tipos de proteína β -amilóides ($A\beta$), com aumento da relação $A\beta_{42}/A\beta_{40}$.

micróglia e circundados por astrócitos reativos (Selkoe, 2001; Small & Gandy, 2006; Jellinger, 2009; Querfurth & LaFerla, 2010) (Figura 4).

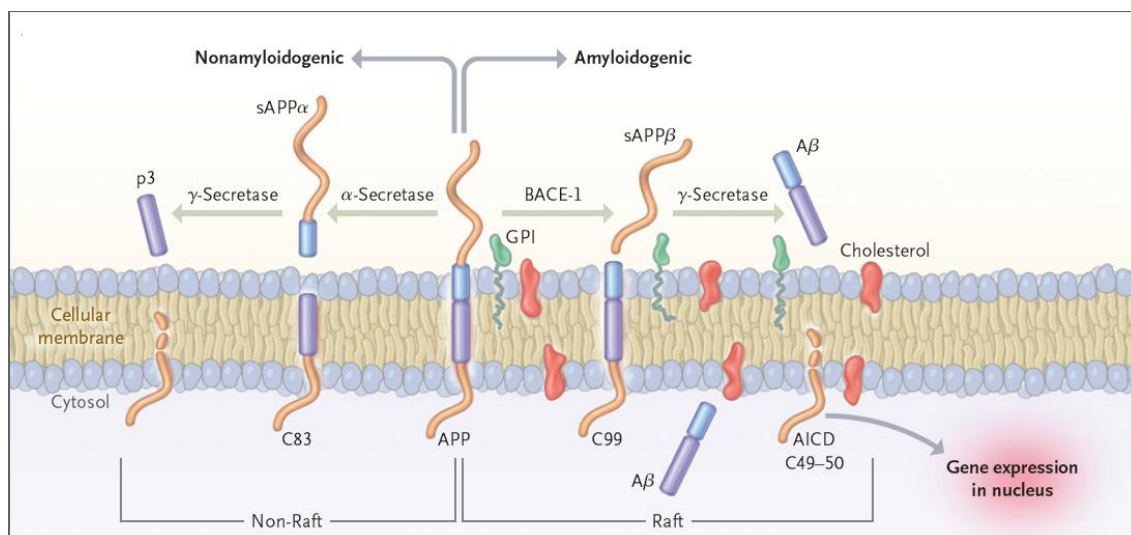


Figura 4: Processamento da Proteína Precursora Amilóide (APP):

Nonamyloidogenic: não amiloidogênico; amyloidogenic: amiloidogênico; cellular membrane: membrana celular; cytosol: citosol; gene expression in nucleus - expressão gênica no núcleo; Aβ42 insoluble: Aβ42 insolúvel; cholesterol – colesterol.

A sequência de clivagem de Aβ pela α-secretase inicia o processo não amiloidogênico. Um grande ectodomínio da APP (sAPPα) é liberado, deixando um fragmento carboxi-terminal de 83 resíduos. C83 é, então, digerido pela γ-secretase, liberando um Domínio Intracelular Amilóide (AICD) e p3 extracelular. O processamento amilóide é iniciado pelo sítio beta da enzima 1 de clivagem da APP (BACE 1) β-secretase, liberando um sAPPβ curto. O C99 retido também é um substrato para a γ-secretase, gerando Aβ e AICD. A clivagem pela γ-secretase ocorre dentro da membrana celular num processo único. sAPPα e sAPPβ são fragmentos de APP secretados após a clivagem pela α-secretase e β-secretase, respectivamente. AICD apresenta uma cauda curta de aproximadamente 50 aminoácidos que é liberada no citoplasma após a clivagem pela γ-secretase. Ativa a sinalização da transcrição no núcleo celular. Aβ solúvel é predisposta à agregação.

Modificado de: Querfurth & LaFerla, 2010.

Os peptídeos Aβ são produtos naturais do metabolismo constituídos por 36 a 43 aminoácidos. Monômeros de Aβ₄₀ são muito mais prevalentes do que os Aβ₄₂. Os monômeros são passíveis de agregação. Peptídeos Aβ originam-se da proteólise da APP por meio de ações enzimáticas sequenciais da Enzima 1 de Clivagem da APP ou da β-secretase (*BACE-1*) e γ-secretase. Um desequilíbrio entre a produção e a remoção (*clearance*) e a agregação de peptídeos causa o acúmulo de Aβ. Este acúmulo de Aβ pode ser o fator inicial da DA. Aβ pode se agrupar e formar as fibras insolúveis das placas amilóides. Os dímeros e trímeros de Aβ são tóxicos para as sinapses (Querfurth & LaFerla, 2010).

Estudos anatomopatológicos comprovam que a deposição β-amilóide no córtex temporal de indivíduos normais correlaciona-se com a evolução para DA nos

próximos dois a três anos e a intervenção com agentes que previnam a deposição poderia retardar ou prevenir a evolução da doença (Sunderland e cols., 2009).

Os emaranhados neurofibrilares são agregados intracitoplasmáticos de filamentos helicoidais pareados compostos pela proteína *tau* hiperfosforilada. A proteína *tau* normalmente encontra-se solúvel nos axônios e promove a estabilidade dos microtúbulos e o transporte vesicular. A proteína hiperfosforilada é insolúvel, perde afinidade pelos microtúbulos e agrega-se em filamentos helicoidais pareados insolúveis, comprometendo o transporte intracelular (figura 5). Como os oligômeros de A β , os agregados intermediários das moléculas *tau* anormais são citotóxicos e comprometem a cognição. Existem evidências que a formação de emaranhados na DA represente uma das várias respostas citológicas dos neurônios ao acúmulo gradual de A β e moléculas associadas a A β . O número de emaranhados é uma marca patológica da gravidade da doença (Selkoe, 2001; Small & Gandy, 2006; Jellinger, 2009; Querfurth & LaFerla, 2010).

A DA é um transtorno primariamente de falência sináptica. Ocorre perda sináptica progressiva à medida que a doença evolui (Selkoe, 2001). A deficiência colinérgica está ligada ao acúmulo de A β e *tau*. Embora os inibidores da colinesterase melhorem a cognição e promovam um tratamento paliativo, eles perdem a eficácia ao longo do tempo (Querfurth & LaFerla, 2010).

As neurotrofinas promovem proliferação, diferenciação e sobrevivência de neurônios e células da glia e estão envolvidas no aprendizado, memória e comportamento. Os níveis, normalmente elevados, de receptores de neurotrofinas nos neurônios colinérgicos encontram-se bastante reduzidos no estágio avançado da DA. Tanto na DA quanto no Comprometimento Cognitivo Leve⁹, os níveis de *BDNF* encontram-se reduzidos (Connor e cols., 1997; Garzon & Fahnstock, 2007). O tratamento de roedores e primatas não humanos com *BDNF* favorece a sobrevivência neuronal, a função sináptica e a memória, sugerindo que a reposição de *BDNF* seria uma opção para o tratamento da DA (Nagahara e cols., 2009).

⁹ Comprometimento Cognitivo Leve- incapacidade cognitiva limitada que freqüentemente precede a demência.

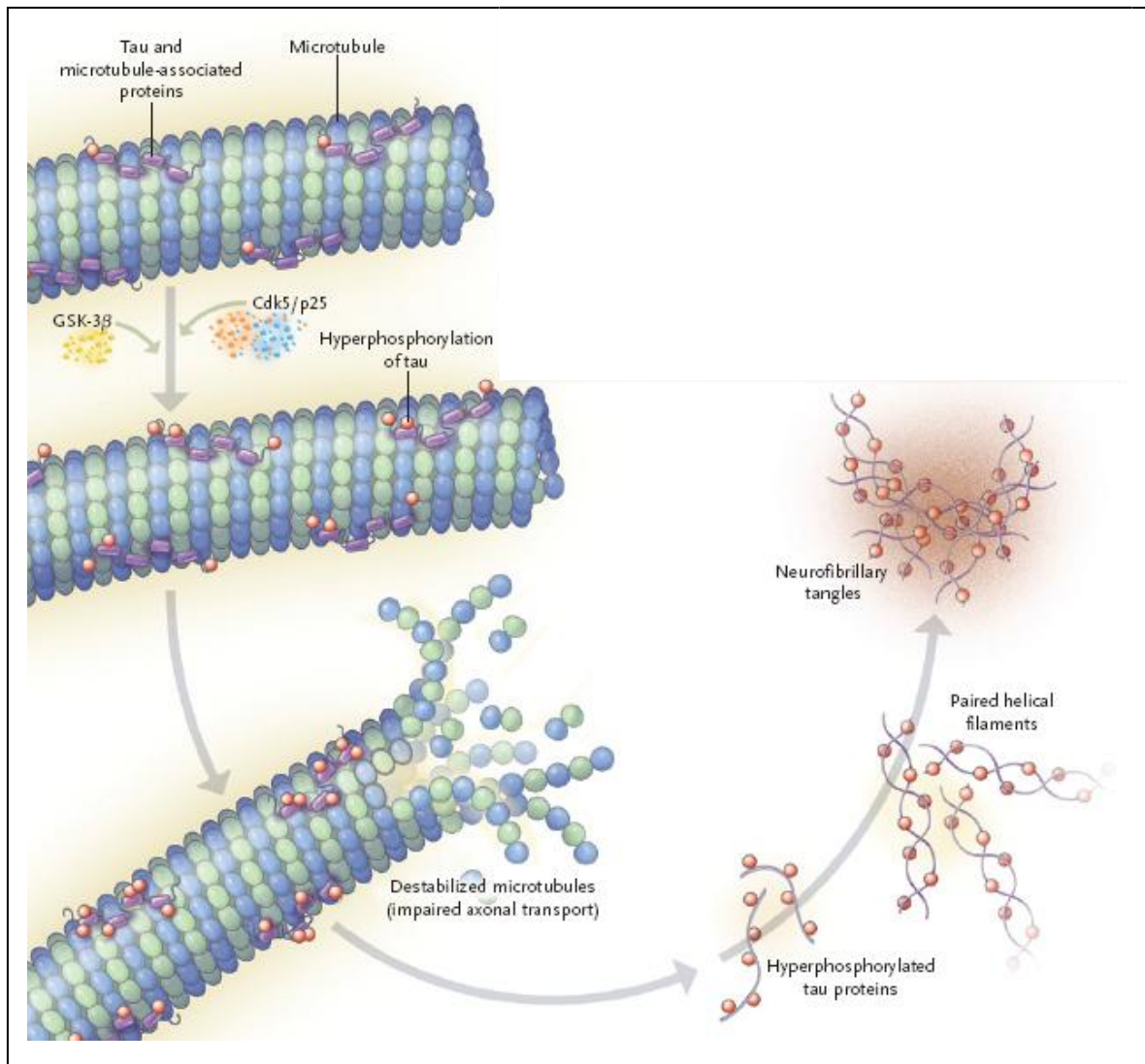


Figura 5: Formação dos emaranhados neurofibrilares a partir da proteína *tau*:

Tau and microtubule-associated protein-tau: proteína *tau* associada à microtúbulo; *microtubule-microtúbulo*; *hyperphosphorylation of tau*: hiperfosforilação da *tau*; *destabilized microtubules (impaired axonal transport)*: microtúbulos desestabilizados (comprometimento do transporte axonal); *hyperphosphorylated tau proteins*: proteínas *tau* hiperfosforiladas; *Paired helical filaments*: filamentos helicoidais pareados; *Neurofibrillary tangles*: emaranhados neurofibrilares.

Sequência de hiperfosforilação da proteína *tau* e formação dos emaranhados neurofibrilares.

Modificado de: Querfurth & LaFerla, 2010.

Aβ é um tóxico mitocondrial potente. O aumento na formação de radicais superóxido e sua conversão em peróxido de hidrogênio determinam stress oxidativo, liberação de citocromo c e apoptose (Querfurth & LaFerla, 2010).

Diabetes melitus tipo 2 e intolerância à glicose são fatores de risco para DA. A sinalização da insulina no cérebro está envolvida na homeostase sináptica e energética. Os receptores de insulina, proteínas de transporte da glicose e outros componentes da via da insulina no cérebro encontram-se reduzidos na DA. Níveis elevados de glicose lesam diretamente as estruturas do hipocampo, hiperregulam a *tau*-cinase e a glicogênio-sintase cinase 3β e reduzem os níveis de enzima

degradadora de insulina (IDE) no cérebro com DA (Selkoe, 2001; Small & Gandy, 2006).

A doença isquêmica afeta 60 a 90% dos pacientes portadores de DA. As lesões vasculares e a inflamação parenquimatosa perpetuam o ciclo de agregação protéica e oxidação. Os processos isquêmicos e as lesões da substância branca contribuem para o declínio cognitivo. A angiopatia microvascular é caracterizada por fibrilas amilóides localizadas na membrana basal luminal das pequenas arteríolas, vênulas e capilares e afeta 90% dos portadores da doença (Selkoe, 2001).

Também podemos observar uma alteração inflamatória profunda no córtex do sistema límbico e outras áreas cerebrais. A micróglia¹⁰ torna-se ativada pelos agregados de A β e/ou proteínas associadas e desencadeia a via clássica do complemento. Ela também é fonte de interleucina 1 β e citocinas pró-inflamatórias. A resposta inflamatória poderia ser um importante mediador da lesão neuronal/neurítica subsequente (Selkoe, 2001).

O quadro clínico envolve declínio cognitivo associado a comprometimento funcional. Normalmente, o início é insidioso e a progressão é lenta. À medida que a doença progride ocorre deterioração cognitiva e maior comprometimento das AVD. Os testes cognitivos mostram comprometimento da memória episódica, linguagem, função executiva, atenção e concentração e, habilidades visuo-espaciais. Observam-se mudanças na personalidade, apatia, inquietude e hiperatividade. Mais de 30% dos indivíduos desenvolvem depressão, que pode ser a primeira manifestação da doença. Em estágios avançados, os indivíduos evoluem com agravamento da confusão mental, comprometimento da marcha, quedas repetidas e disfagia, até o quadro de total dependência funcional. Muitos pacientes apresentam alterações comportamentais, como agressão, agitação, hostilidade verbal ou física.

O diagnóstico de DA é eminentemente clínico e baseia-se na exclusão de outras causas de incapacidade cognitiva. A Academia Brasileira de Neurologia recomenda seguir os critérios da *American Psychiatric Association* (APA) (DSM IV TR) e do *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke e Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA)

¹⁰ Micróglia – representa células derivadas de monócitos/macrófagos no sistema nervoso, capaz de responder rapidamente ao incremento de material estranho extracelular.

(Anghinah, 2005). Eles são traduzidos para vários idiomas, inclusive o português (Anexo 1).

Em 1986 estabeleceu-se o *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease* (CERAD) do *National Institute on Aging* (NIA) com o objetivo de padronizar a avaliação e o diagnóstico da DA. Os instrumentos padronizados desenvolvidos pelo CERAD são usados atualmente pelos principais centros do mundo, pelos médicos na prática clínica e nos estudos com base populacional. Através da padronização, o diagnóstico clínico é confirmado em 87% dos casos de necropsia.

Um aspecto relevante da doença é a presença de vários sintomas comportamentais e psicológicos - *Behavioural and Psychological Symptoms in Dementia* (BPSD) – além da incapacidade cognitiva progressiva.

Aproximadamente 50 a 80% dos portadores de DA apresentam alterações comportamentais e psiquiátricas, tais como psicose, depressão, agitação, desinibição, agressão, hiperatividade e comportamentos socialmente inadequados. Na maioria dos casos, o mesmo paciente desenvolve mais do que um sintoma comportamental. Estes sintomas podem ser onerosos para médicos e cuidadores, levam a institucionalização precoce e aumentam os custos sociais e econômicos. Podem ser divididos em sintomas psicóticos, agitação psicomotora e sintomas depressivos (Lyketsos e cols., 2001). Os sintomas psicóticos parecem estar associados com polimorfismos genéticos distintos (Borroni e cols., 2010). Os genes envolvidos poderiam estar associados a outros transtornos neurodegenerativos e do desenvolvimento do SNC. A psicose na DA ocorre em 41% dos pacientes e associa-se à maior incidência de comorbidades e outras alterações psiquiátricas e comportamentais assim como a um declínio cognitivo mais rápido (Ropacki & Jeste, 2005).

Estudo realizado na população brasileira (Vega e cols., 2007) demonstrou que apatia foi a principal forma de apresentação, seguida por alterações motoras e depressão (figura 6). Estes resultados são concordantes com os dados da literatura mundial (Sweet e cols, 2003).

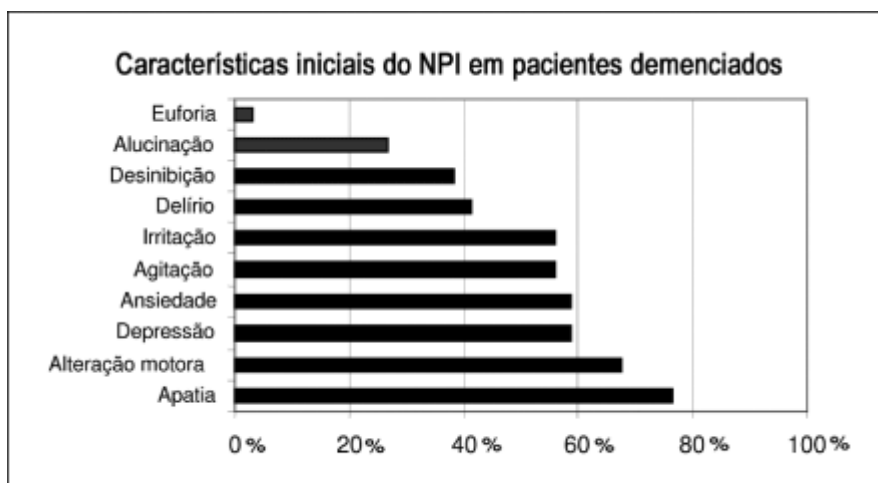


Figura 6: Incidência de BPSD encontrada por Vega e cols. (2007)
 NPI – Inventário Neuropsiquiátrico (Cummings e cols., 1994)
 Fonte: Vega e cols., 2007

1.4- DEPRESSÃO E DEMÊNCIA

Depressão e demência podem coexistir. A depressão é uma das comorbidades psiquiátricas mais frequentes na DA, com taxa de prevalência de 30 a 50%. Associa-se a piora da qualidade de vida, maior dificuldade para desempenho das AVD, maior declínio cognitivo, elevadas taxas de institucionalização, mortalidade relativamente mais elevada e maior incidência de depressão e fardo do cuidador. Raramente ocorre isoladamente. Habitualmente encontra-se associada a outros sintomas comportamentais ou psicológicos, como ansiedade, apatia, desinibição, irritabilidade, dentre outros. A definição do diagnóstico é difícil. O diagnóstico diferencial com apatia é especialmente complexo e as duas entidades podem coexistir. É habitualmente subdiagnosticada e a maioria dos pacientes com demência não são tratados ou usam doses subterapêuticas de antidepressivos. A incidência aumenta à medida que a demência progride da forma leve para moderada (Lee & Lyketsos, 2003).

Além disso, as duas patologias podem apresentar associação etiológica. Os sintomas ou as síndromes depressivas frequentemente precedem o declínio cognitivo e a demência. Depressão de início tardio e declínio cognitivo geralmente são concomitantes, sugerindo uma íntima relação entre os mesmos. Idosos portadores de transtorno depressivo maior, principalmente depressão de início tardio com comprometimento cognitivo associado, apresentam maior probabilidade de

evoluir para demência dentro de poucos anos após o início do quadro depressivo. Entretanto, a relação entre a depressão e a subsequente evolução para demência não está completamente esclarecida. A depressão pode se relacionar com a demência como um pródromo ou como um fator de risco para a doença. Os resultados dos estudos são conflitantes e ainda não foi possível esclarecer todos os questionamentos apontados sobre esta intrincada relação (Vinkers e cols., 2004; Alexopoulos, 2005; Baldwin e cols., 2005; Ownby e cols., 2006; Wilson e cols., 2008).

É importante diferenciar transtorno depressivo maior precoce ou tardio da depressão especificamente associada à DA. Esta frequentemente difere da primeira condição com relação ao curso clínico e evolução. Com relação ao diagnóstico, o NIMH (*National Institute of Mental Health*) propôs critérios padronizados para depressão na DA (Olin e cols., 2002), demonstrados no anexo 2. Estes são semelhantes aos critérios do DSM IV para o diagnóstico de depressão maior, acrescidos de irritabilidade e com substituição de anedonia por isolamento social e, perda do prazer em resposta ao contato social. São necessários três ou mais critérios para estabelecimento do diagnóstico e não é necessário que os sintomas estejam presentes durante a maior parte do dia (Lee & Lyketsos, 2003; Starkstein e cols, 2008).

É provável que a depressão na DA seja heterogênea em sua etiologia (figura 7). Estudos de neuropsicologia, neuroimagem e neuropatologia na depressão geriátrica têm revelado alterações secundárias ao processo de envelhecimento normal, doenças cerebrovascular e neurodegenerativa (Smith e cols., 2007). Pelo menos quatro subtipos de síndromes depressivas podem ser classificados sob os critérios adotados pelo NIMH (Lee & Lyketsos, 2003):

- Reação emocional ao declínio cognitivo da DA;
- Recorrência de depressão maior ou menor;
- Doença vascular associada com DA, causando sintomas depressivos (“depressão vascular”) e depressão de início tardio;
- Processo neurodegenerativo causando sintomas depressivos – depressão de início tardio.

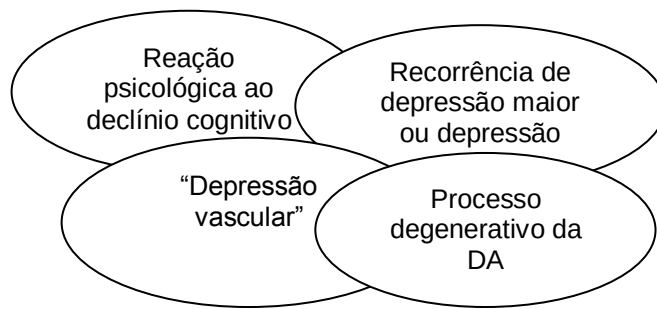


Figura 7: Heterogeneidade etiológica da depressão na DA
Modificado de: Lee & Lyketsos, 2003.

Neste contexto, é importante lembrar o conceito de “pseudodemência”. Idosos com depressão são frequentemente considerados como portadores de demência ao diagnóstico inicial, em função das alterações cognitivas presentes. Entretanto, o sucesso do tratamento antidepressivo determina uma recuperação cognitiva parcial, mas não completa. Muitos destes indivíduos que se apresentam inicialmente com quadro de “pseudodemência” evoluirão posteriormente para demência irreversível. Estas observações retratam uma possível “reserva cognitiva” reduzida. E, dessa forma, esses pacientes são mais predispostos a evoluírem para demência e desenvolverem sinais de incapacidade cognitiva durante episódios de depressão (Karczyn & Halperin, 2009). À disfunção cognitiva que permanece após a remissão de um quadro depressivo denomina-se Declínio Cognitivo Após Depressão (*Post Depression Cognitive Decline*). Este poderia representar um risco elevado para o desenvolvimento de demência no idoso e/ou poderia ser o primeiro sinal de comprometimento nas reservas neuronais e cognitivas cuja evolução culmina com a demência (Karczyn & Halperin, 2009).

A depressão de início precoce também pode associar-se à demência. Idosos portadores de depressão de início precoce são mais susceptíveis para evoluírem com quadro demencial, principalmente no primeiro ano após o episódio depressivo (Ownby e cols., 2006). Entretanto, Green e cols. (2003) demonstraram, a partir do estudo MIRAGE (*Multi-Institucional Research in Alzheimer’s Genetic Epidemiology*), que a associação entre depressão de início precoce e demência pode existir mesmo nos casos cujos sintomas depressivos precederam em até 25 anos o quadro demencial. Esses resultados sugerem que a depressão se associa com DA, como fator de risco para a doença e não como pródromo da doença.

Entretanto, inúmeros estudos têm demonstrado um risco elevado para demência apenas para episódios depressivos que se desenvolvem pela primeira vez em proximidade ao início da demência. Além disso, estudos observacionais prospectivos demonstram associação entre sintomas depressivos e evolução do declínio cognitivo através do aumento da incidência de Comprometimento Cognitivo Leve e DA. Uma possível explicação seria que os sintomas depressivos não constituem um verdadeiro fator de risco, mas uma consequência da doença. Concluindo, esses fatos sugerem que a depressão poderia se associar à demência não como um fator de risco para esta, mas como um pródromo, um “sintoma” precoce da mesma (Wilson e cols., 2008; Brommelhoff e cols., 2009).

Na depressão geriátrica, além das alterações do humor, ideação e comportamento, também são observadas alterações sistêmicas importantes que incluem alterações vegetativas, hipercortisolemia, aumento da gordura abdominal, redução da massa óssea e aumento do risco de DM tipo 2 e HAS. Nestes pacientes, as anormalidades no funcionamento dos sistemas neurais, disfunções das vias fronto-estriatais, amígdalas e hipocampo são acompanhadas por incapacidade cognitiva (Alexopoulos, 2005; Alexopoulos, Schultz & Barry, 2005; Blazer & Hybels, 2005).

A depressão crônica pode acelerar o dano cerebral através de dois mecanismos fisiopatológicos principais. O primeiro relaciona-se às alterações vasculares no cérebro, principalmente na forma de leucoaraiose e, o outro através da liberação excessiva de corticosteróide que determina dano ao hipocampo. Anormalidades em mais de uma região cerebral predisõem à depressão. Além disso, alterações em uma região cerebral influenciam outra região funcionalmente conectada (Alexopoulos, Schultz & Barry, 2005; Blazer & Hybels, 2005).

A depressão encontra-se associada ao stress crônico, manifestada por níveis elevados de corticosteróides circulantes. Receptores de corticosteróides no cérebro são encontrados no hipocampo e a capacidade para regular a liberação de corticóide encontra-se comprometida na depressão, levando ao hipercortisolismo. A estimulação excessiva destes receptores hipocampais é deletéria e leva à morte neuronal por apoptose. Esse dano pode ser inespecífico determinando redução neuronal e da reserva cognitiva. Contudo, é possível que as manifestações do processo neurotóxico ocorram na forma de degeneração neurofibrilar, a marca das alterações da DA no hipocampo. Provavelmente, esta deve ser a alteração

neuropatológica mais precoce da doença, progredindo ao longo dos anos para outras áreas cerebrais. Praticamente todos os pacientes com DA apresentam alterações no hipocampo, sugerindo que esta estrutura represente um possível elo entre as duas patologias (Jorm, 2001; Karczyn & Halperin, 2009).

O hipocampo apresenta papel central na memória. Anormalidades do hipocampo são relevantes na população idosa, pois essa estrutura é particularmente vulnerável ao envelhecimento e às mudanças associadas à idade. A idade avançada está associada à atrofia do hipocampo. A região hipocampal CA1 e o *subiculum* são particularmente vulneráveis à isquemia e aos efeitos da hipercortisolemia secundária ao stress crônico e às comorbidades clínicas (Alexopoulos e cols., 2005).

Indivíduos portadores de depressão apresentam redução do volume hipocampal à ressonância nuclear magnética. A duração da doença e a idade de início da depressão geriátrica podem influenciar nos volumes hipocampais destes indivíduos (Bell-McGynty, 2002). Ballmaier e cols. (2008) observaram volumes hipocampais reduzidos tanto na depressão de início tardio quanto na de início precoce em comparação aos controles saudáveis. Todavia, indivíduos portadores de depressão de início tardio apresentavam redução de volume regional mais pronunciado e estas alterações se correlacionavam com um pior desempenho cognitivo.

Os fatores genéticos são responsáveis por cerca de 40% das variações do volume do hipocampo, o restante é determinado por fatores ambientais. Conforme detalharemos posteriormente, a variante longa da região promotora do gene transportador de serotonina (*5-HTTLPR*) associa-se a menores volumes hipocampais na depressão de início tardio (Frodl e cols., 2008; Taylor e cols., 2005). Indivíduos homozigotos para este alelo podem apresentar fatores de risco vasculares maiores (Whyte e cols., 2001) e vulnerabilidade aumentada aos efeitos neurotóxicos dos glicocorticóides induzidos pelo estresse, capazes de levar a anormalidades hipocampais estruturais. Inúmeros estudos têm procurado associar uma causa genética ao desenvolvimento de depressão na DA. Os resultados com relação à associação entre o alelo $\epsilon 4$ da APOE ainda são conflitantes (Lee & Lyketsos, 2003).

1.5- OS GENES CANDIDATOS:

1.5.1- O GENE DO TRANSPORTADOR SEROTONINA (SLC6A4, 5-HTT)

O humor, a cognição e as funções motoras, bem como ritmo circadiano e neuroendócrino, incluindo apetite, sono e atividade reprodutiva são modulados pelo sistema serotoninérgico e encontram-se alterados nos transtornos do humor e na ansiedade. A serotonina controla um sistema altamente complexo de comunicação neuronal mediado por vários subtipos de receptores serotoninérgicos pré e pós-sinápticos. Entretanto, o seu transporte na região pré-sináptica e, portanto, a manutenção de seu estoque para posterior liberação, é controlado por uma única proteína - o transportador de serotonina (5-HTT, SERT). Esta é considerada como o local de ação inicial dos antidepressivos e de vários componentes potencialmente neurotóxicos, como a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA - “ecstasy”) (Lesch & Gutknecht, 2005; Gerretsen & Pollock, 2008).

A neurotransmissão serotoninérgica está envolvida em inúmeras funções fisiológicas do SNC e sistema nervoso periférico. Como neurotransmissor, a serotonina (5-HT) apresenta importante papel nas funções cerebrais. Inúmeros transtornos neuropsiquiátricos, tais como depressão, esquizofrenia, autismo, agressão e comportamento suicida associam-se à disfunção serotoninérgica no SNC. Medicamentos que agem em neurônios serotoninérgicos e seus receptores são utilizados no tratamento de doenças como depressão, transtorno de ansiedade e esquizofrenia (Lesch, 2004; Malhotra e cols., 2004).

Nos tecidos periféricos, 5-HT além de regular o tônus vascular, controla a motilidade intestinal, a hemostasia primária e a resposta imune celular. É uma substância hidrofílica e como tal não atravessa a barreira hematoencefálica. Assim, seu isolamento no cérebro indica sua síntese local (Murphy e cols., 2004).

A serotonina pode determinar vasoconstrição na presença de lesões ateroscleróticas e existem evidências de seu envolvimento na fisiopatologia da HAS essencial, hipertensão pulmonar, agregação plaquetária, formação de trombo e ateroma. Essas alterações fisiopatológicas poderiam explicar a relação entre o aumento da mortalidade das doenças cardiovasculares na presença de depressão. (Whyte e cols., 200; Ramasubbu, 2003).

O transportador da serotonina (SERT, 5-HTT, SLC6A4) é responsável pelo transporte ativo de 5-HT nos neurônios, células enterocromafins, plaquetas e outras células. No cérebro, situa-se nas membranas pré-sinápticas dos terminais nervosos e nas árvores dendríticas, em proximidade aos corpos celulares contendo serotonina. Consequentemente, a atividade da serotonina nos receptores é inversamente proporcional ao número de moléculas funcionais de 5-HTT presente na membrana pré-sináptica. A atividade do 5-HTT regula a concentração de 5-HT na sinapse e, por sua vez, influencia a transmissão sináptica (Murphy e cols., 2004; Sibille & Lewis, 2006).

O gene *5-HTT* (MIM: *182138) localiza-se no braço longo do cromossomo 17 (17q11.2) e é composto por 14 exons que codificam uma proteína de 630 aminoácidos. Apresenta vários loci polimórficos que alteram sua expressão e função. Mais recentemente, duas raras mutações funcionais (com ganho de função) codificantes, *Ile425Val* e *Gly56Ala*, foram descobertas. Entretanto, existem dois polimorfismos funcionais não codificantes comuns no gene: o polimorfismo de repetição em *tandem* em número variável (*VNTR*) localizado no íntron 2 e; uma deleção-inserção de extensão variável na região 5', localizada há aproximadamente uma kilobase do início da zona de transcrição, denominada região de polimorfismo ligada ao gene *5-HTT* (*5-HTTLPR*), na região de controle transcricional. Em células embrionárias, o polimorfismo *VNTR* no íntron 2 que contém nove (STin2.9), 10 (STin2.10) ou 12 (STin2.12) repetições em *tandem* pode afetar a atividade transcricional. O *5-HTTLPR* é normalmente subdividido em alelo curto ("S"), que apresenta redução da expressão e longo ("L"), com ganho de expressão, baseado na presença de um *indel*¹¹ de 43pb (pares de base) - inicialmente descrito como 44pb. Raramente ocorrem alelos com um número maior de elementos repetitivos ("super - longo", "XL" e "XXL", com até 20 repetições). A frequência alélica observada nas populações caucasiana é a seguinte: 55 a 63% para o alelo "L" e 36 a 45% para o alelo "S" (Ramasubbu, 2003); com uma distribuição genotípica de 32% "LL", 49% "LS" e 19% "SS" (Murphy e cols., 2004).

Nakamura e cols. (2000) e Hu e cols. (2005) observaram um SNP A/G dentro da região de inserção do alelo L, que tem A como alelo ancestral (La) correspondente ao alelo 16-A. La determina níveis mais elevados de *5-HTT* RNAm

¹¹ *Indel* – polimorfismos bialélicos de inserção-deleção

do que a variante G. Desta forma, Lg comporta-se como o alelo S de baixa expressão. A figura 8 mostra o gene do *5-HTT* com seus SNPs e a alteração funcional determinada pelos diferentes alelos.

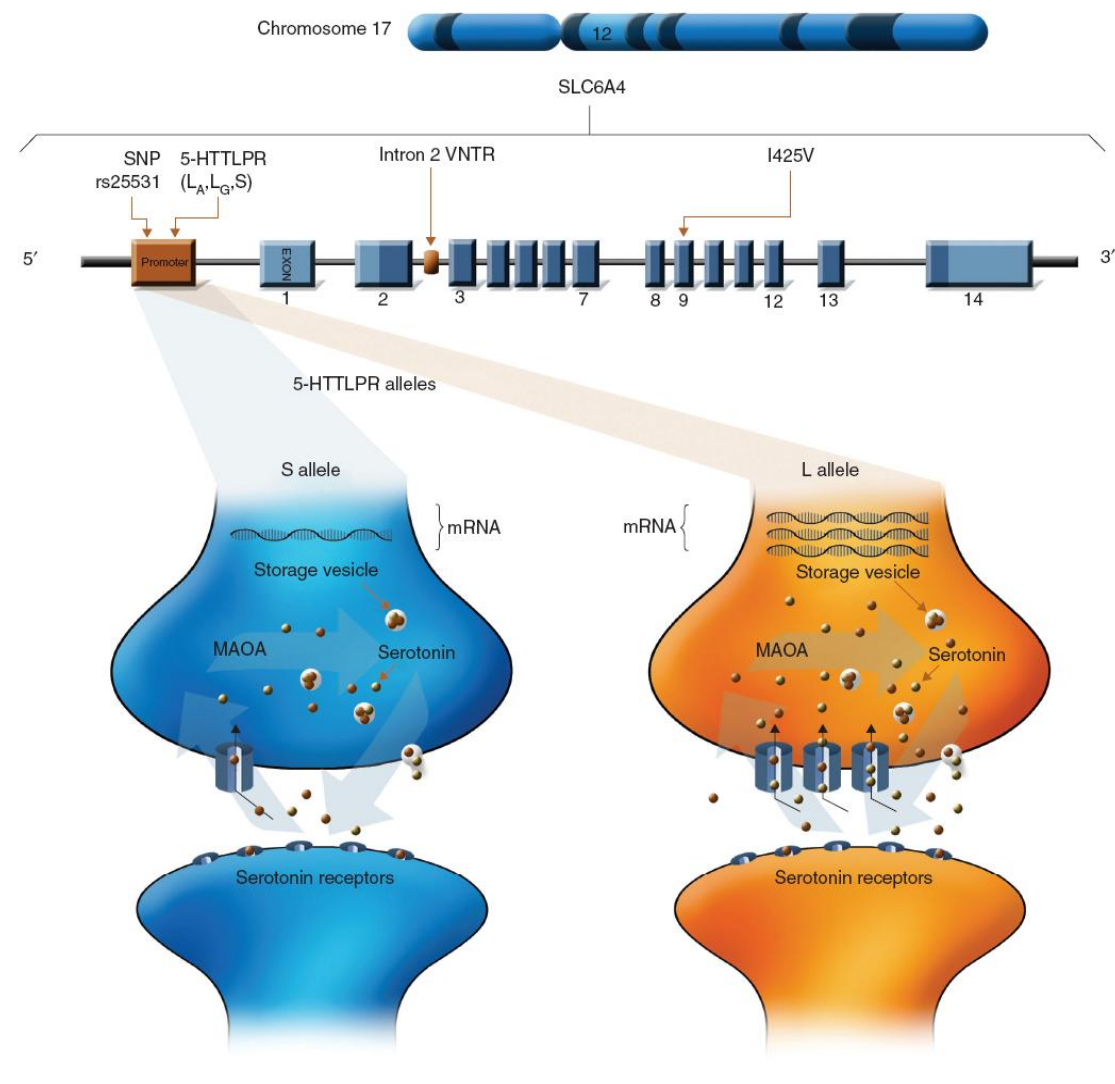


Figura 8: Gene do transportador de serotonina (*5-HTT*), polimorfismos e função. *Chromossome*: cromossomo; *allele*: alelo; *Storage vesicle*: vesícula de estoque; *serotonin*: serotonina; *serotonin receptors*: receptores de serotonina; *5-HTT*: transportador de serotonina; *5-HTTLPR*: região de polimorfismo ligada ao transportador de serotonina; *MAOA*: monoaminooxidase; *SNP*: polimorfismo de nucleotídeo único; *VNTR*: repetição em tandem em número variável. Variação alélica do *5-HTT*, incluindo o *5-HTTLPR*, *VNTR* do íntron 2, *rs25531* e uma variante funcional *Ile425Val*. O alelo longo (L) (laranja) do *5-HTTLPR* produz mais RNAm do *5-HTT* do que o alelo curto (S) (azul), determinando concentrações maiores de serotonina na fenda sináptica. Extraído de: Gerretsen & Pollock, 2007.

O alelo “S” associa-se a uma redução de aproximadamente 50% na expressão da proteína transportadora de serotonina, assim como maior vulnerabilidade para desenvolvimento de transtornos do humor (ansiedade e

depressão) e resposta inadequada aos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRI).

Caspi e cols. (2003) demonstraram em indivíduos jovens que o alelo curto estava associado a uma maior incidência de depressão e suicídio na presença de fatores ambientais estressores. Interações genético-ambientais em associação com o desenvolvimento de depressão também foram observadas em outros grupos populacionais (Eley e cols., 2004; Grabe e cols., 2005; Kendler e cols., 2005; Sjöberg e cols., 2006; Wilhelm e cols., 2006; Zalsman e cols., 2006). Esses resultados sugerem que a resposta do indivíduo aos insultos ambientais seria modificada por sua carga genética. Entretanto, outros estudos apresentam resultados conflitantes. Taylor e cols. (2006) encontraram associação entre o alelo “L” (e não o “S”) e o desenvolvimento de sintomas depressivos em interação com fatores ambientais (ou eventos estressores de vida). Surtees e cols. (2005) não observaram interação genético-ambiental em associação com o desenvolvimento de depressão.

Correa e cols. (2004) não observaram relação entre o comportamento suicida e o alelo S em famílias de suicidas portadoras de depressão maior e esquizofrenia. Entretanto, no transtorno bipolar, Neves e cols. (2007) demonstraram associação entre a presença do alelo S e o comportamento suicida.

Inúmeros trabalhos têm demonstrado uma associação entre o alelo S e pior resposta terapêutica aos SSRI, assim como maior incidência de efeitos adversos aos mesmos (Lotrich & Pollock, 2004; Murphy e cols., 2004; Gerretson & Pollock, 2007).

Murphy e cols. (2004) observaram que o alelo “S” do *5-HTTLPR* associa-se a maior incidência de efeitos adversos e menor adesão terapêutica à paroxetina, em pacientes idosos. Neste mesmo estudo, um segundo grupo de pacientes recebeu mirtazapina. Dentre estes, os portadores do alelo “L” apresentaram maior incidência de efeitos colaterais. Considerando-se que a mirtazapina induz à liberação central não apenas de serotonina (como ocorre com a paroxetina), mas também de noradrenalina, esses resultados sugerem que as diferenças nos mecanismos de ação das duas substâncias, associadas ao polimorfismo de *5-HTTLPR*, podem determinar diferentes padrões de efeitos adversos. Estudo de meta-análise comparando os dois alelos confirmou a associação significativa da variante L com melhor resposta aos SSRI. Indivíduos portadores do alelo S apresentaram

difficuldade para alcançar a remissão além de necessitarem de tempo maior para responderem à medicação (Serretti e cols., 2007).

Taylor e cols. (2005) observaram que indivíduos portadores de depressão de início tardio, homozigotos para o alelo “L”, exibiam menor volume do hipocampo, enquanto portadores de depressão de início precoce apresentavam menores volumes de hipocampo em associação com o alelo “S”. Possíveis explicações para esses achados incluem as interações entre o sistema serotoninérgico e os fatores neurotróficos ou a resposta do cortisol ao stress, cada um deles podendo afetar os volumes do hipocampo.

Whyte e cols. (2001) observaram que idosos deprimidos portadores do genótipo LL apresentavam aumento da agregação plaquetária, possivelmente em função do maior estoque de serotonina nas plaquetas destes indivíduos, com maior liberação posterior de serotonina e ativação plaquetária. Tais achados poderiam explicar, pelo menos em parte, a associação entre depressão e doença vascular. Outros fatores, como tabagismo e imobilidade também contribuem com esta associação (Alexopoulos & Kelly, 2010).

Na DA, *5-HTTLPR* tem sido associado com alterações psiquiátricas e comportamentais e, geralmente em associação com outros genes (Nishimura e cols., 2005; Borroni e cols., 2006a; Borroni e cols., 2006b).

1.5.2- BDNF

A família das neurotrofinas consiste das seguintes proteínas: fator de crescimento dos nervos (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-derived neurotrophic factor* – BDNF), neurotrofina-3, neurotrofina 4/5 e neurotrofina 6. Todos esses fatores são derivados de um gene ancestral comum e apresentam estrutura semelhante. Dentre elas, o *BDNF* é a neurotrofina mais abundante e amplamente distribuída no SNC.

As neurotrofinas exercem seus efeitos celulares individuais através da interação com dois receptores estruturalmente não relacionados que diferem na especificidade pelo ligante e nas atividades de transdução do sinal. A família de receptores Trk consiste de três receptores específicos tirosina-quinase – TrkA, TrkB

e TrkC – os quais exibem seletividade de ligação. TrkB liga-se especificamente ao BDNF.

As neurotrofinas estão envolvidas na embriogênese e organogênese. Elas regulam a atividade sináptica, síntese de neurotransmissores e controle da plasticidade neural e conectividade em cérebros de adultos. Elas também são fundamentais nos processos de sobrevivência neuronal; regeneração, migração e diferenciação fenotípica dos nervos; crescimento dendrítico e axonal e, formação das sinapses. A depleção de neurotrofinas determina a indução de apoptose. A atividade neuronal repetitiva aumenta a secreção e ação das neurotrofinas nas sinapses, modificando a transmissão e a conectividade sináptica (Martinowich & Lu, 2008; Schulte-Herbrüggen e cols., 2008).

O BDNF está amplamente envolvido no desenvolvimento neuronal e apresenta função neuroprotetora sob condições neurotóxicas como estimulação glutamatérgica, isquemia cerebral e hipoglicemia. Em adultos, sua principal função é de regulação da plasticidade sináptica ao invés de mediação da sobrevivência e crescimento celular (Martinowich & Lu, 2008). Apresenta papel nas funções cognitivas, notadamente na aquisição e consolidação da memória. Está envolvido na formação e consolidação da memória de curto prazo. No hipocampo, modula a plasticidade e a memória dependente desta estrutura em modelos celulares e animais (Egan e cols, 2003; Thomas & Davies, 2005; Monfils e cols., 2007;). Polimorfismos do *BDNF* têm sido associados a déficits de memória e menor volume do hipocampo (Egan e cols., 2003; Hariri e cols., 2003; Pezawas e cols. 2004).

O BDNF parece ser um dos fatores relevantes na fisiopatologia da depressão (Chen e cols., 2001; Karege e cols., 2002; Shimizu e cols., 2003; Duman e cols., 2004). Níveis reduzidos de BDNF no hipocampo associam-se ao comportamento depressivo, principalmente na depressão geriátrica, sugerindo um papel importante do *BDNF* nesta patologia (Diniz e cols., 2010). O stress reduz a expressão de mRNA *BDNF* no hipocampo, enquanto o tratamento antidepressivo aumenta sua expressão, através da ação em alguns promotores da transcrição. Níveis reduzidos de BDNF no SNC contribuem para atrofia e morte das células do hipocampo e córtex pré-frontal. Os antidepressivos podem exercer efeito terapêutico através do aumento da expressão de BDNF, determinando reversão da atrofia neuronal e morte celular (Schumacher e cols., 2005; Duman & Monteggia, 2006; Groves 2007; Martinowich e cols., 2007).

BDNF também determina suporte trófico para neurônios colinérgicos, dopaminérgicos e colinérgicos, conforme revisto por Gratacòs e cols. (2007).

As pró-neurotrofinas exercem um efeito deletério nos neurônios colinérgicos através de sua ligação com os receptores $p75^{NTR}$ enquanto as neurotrofinas maduras exercem ação biológica oposta através da ligação com TrkB. Esses conceitos deram origem à “hipótese *yin-yang*”. Esta hipótese poderia explicar alguns dos resultados conflitantes provenientes dos estudos de associação entre BDNF e transtornos do humor (Martinowich e cols., 2007).

O gene *BDNF* (MIM *113505) localiza-se no cromossomo 11 (11p13). É altamente complexo, com oito exons, múltiplos *splices*¹² e sítios de poliadenilação alternados, conferindo potencial para múltiplos transcritos de *BDNF*. Vários promotores *upstream*, cada um regulado individualmente, determinam um exon 5' curto que sofre *splicings* alternativos¹³, determinando um exon 3' comum, que codifica a proteína precursora (*pro-BDNF*). A região codificante do gene encontra-se no último exon (exon 8). Existem evidências indicando que promotores dos transcritos individuais são regulados por vários estímulos fisiológicos e que eles estão distribuídos em diversas regiões cerebrais, diferentes tipos celulares e mesmo diferentes partes da célula. Apesar dos múltiplos transcritos descritos, a sequência da proteína madura é altamente conservada (Lu, 2003; Pattabiraman e cols., 2005; Martinowich & Lu, 2008).

O RNA mensageiro é traduzido em *pro-BDNF*, com 247 aminoácidos, que é proteoliticamente clivado para formar a proteína madura (*mBDNF*), com 153 aminoácidos e esta é estocada nas vesículas secretoras. O *mBDNF* corresponde à porção C-terminal de seu precursor. O *BDNF* é liberado através de liberação espontânea ou, mais frequentemente, pela via secretora (liberado por meio de estímulo).

BDNF apresenta vários polimorfismos descritos. Um polimorfismo funcional (*rs6265*) consiste na substituição G196A que determina uma troca de aminoácido de valina por metionina (*Val66Met*). Apesar de estar presente na sequência 5' do pró-

¹² *Splices* – resultam do processo de *splicing*. *Splicing* é um processo que remove os íntrons e liga os éxons durante a transcrição do RNA. Ele consiste na retirada dos íntrons de um mRNA precursor, sendo um dos processos necessários para formar um mRNA maduro funcional.

¹³ *Splicing* alternativo é um processo pelo qual os exons do RNA produzidos pela transcrição do gene (transcrito primário do gene ou pré-RNA) são reconectados de múltiplas formas durante o *splicing* do RNA. Os mRNA resultantes são traduzidos em diferentes isoformas da proteína. Desta forma, um único gene pode codificar múltiplas proteínas.

BDNF e não alterar a função da proteína madura, *Val66Met* altera o tráfego dendrítico e a localização vesicular do *BDNF*. Portadores deste polimorfismo apresentam redução da secreção de *BDNF* dependente de atividade (Egan e cols., 2003). Apesar destas alterações intracelulares, os níveis totais de *BDNF* e a secreção constitutiva permanecem normais. Entretanto, em estudo recente, Lang e cols. (2009) demonstraram redução dos níveis de *BDNF* sérico em indivíduos *Val/Val* saudáveis comparados a indivíduos *Val/Met*. Clinicamente, os portadores deste polimorfismo apresentam déficit na memória episódica e atividade hipocampal anormal (Egan e cols., 2003; Martinowich e cols., 2007). As frequências alélica e genotípica variam nas diversas populações, conforme descrito na tabela 3, segundo dados do *hapmap project*.

Tabela 3: Frequências alélica e genotípica de *Val66Met* nas diversas populações:

População		Genótipo (frequência)			Alelo (frequência)	
		G/G	G/A	A/A	G	A
CEU	Europeu	0.683	0.283	0.033	0.825	0.175
CHB	Asiáticos	0.190	0.357	0.452	0.369	0.631
JPT	Asiáticos	0.488	0.347	0.163	0.633	0.337
YRI	Africanos	1.0	-	0	1.0	0
Sub-Saara						

CEU: residentes de Utah, ancestralidade do norte e região ocidental da Europa; CHB: chineses Han de Pequim; JPT: japoneses de Tóquio; YRI: yoruba de Ibadan, Nigéria.

Fonte: *International HapMap Project*, disponível em: www.hapmap.org.

O *rs7124442* é um *TagSNP*¹⁴ localizado no *BDNF*, cujo polimorfismo consiste na substituição da base C por T e que apresenta frequências alélica e genotípica muito variáveis, dependendo da população estudada (tabela 4) (*Hapmap Project*, www.hapmap.org). Encontra-se em LD com outros SNPs que se localizam em uma região com 59 kb no gene do *BDNF*, do exon III ao exon VIII, como por exemplo *rs11030121* (exon III), *rs2049045* (exon IV), *C270T* (exon V), *rs2049046* (exon VI),

¹⁴ Tag SNP - é um SNP representativo de uma região do genoma com elevado linkage disequilibrium. É possível identificar variações genéticas e uma região cromossômica sem genotipar qualquer SNP. Podem ser usados como representantes dos outros SNPs daquela região. É útil em estudos de *whole genome*, nos quais milhares de SNPs são genotipados ao longo de todo o genoma. Utilizado para descobrir genes responsáveis pelas doenças.

rs11030104 (exon VII), *rs8192466*, *rs6265* (exon VIII – região codificante), *rs1048218*, *rs1048220*, *rs1048221*. O *rs7124442* localiza-se no exon VIII após o sítio de poliadenilação (Huang e cols., 2007).

Val66Met associa-se com vários transtornos psiquiátricos, como transtornos de ansiedade, depressão, transtorno bipolar, esquizofrenia e alterações da função cognitiva (Sklar e cols., 2002; Hwang e cols, 2005; Jiang e cols., 2005; Lang e cols., 2005; Schumacher e cols., 2005; Ribeiro e cols, 2007; Kim e cols., 2008). Resultados conflitantes são comuns nas diversas publicações tipificados como ausência de replicação de associações positivas, provavelmente decorrentes de baixo poder estatístico; diferentes efeitos das variantes determinados por diferentes endofenótipos; associação de ambos os alelos ligados a processos de doença diversos.

Tabela 4: Frequências alélica e genotípica do *rs712442* nas diversas populações estudadas:

População		Genótipo			Alelo	
		C/C	C/T	T/T	C	T
CEU	Europeu	0.138	0.466	0.397	0.371	0.629
CHB	Asiáticos	0	0.089	0.911	0.311	0.689
JPT	Asiáticos	0	0.182	0.818	0.409	0.591
YRI	Africanos	0.271	0.542	0.186	0.559	0.441

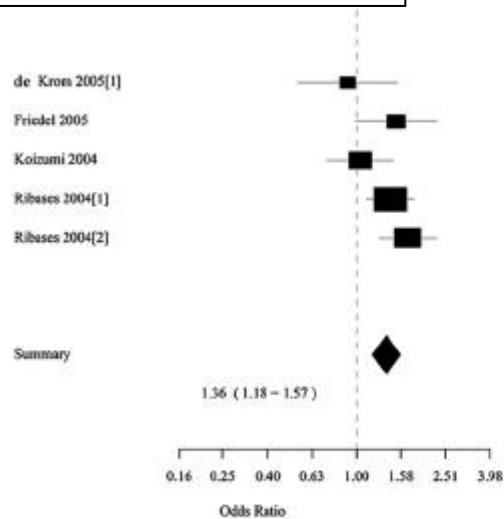
CEU: residentes de Utah, ancestralidade do norte e região ocidental da Europa; CHB: chineses Han de Pequim; JPT: japoneses de Tóquio; YRI: yoruba de Ibadan, Nigéria.

Fonte: *International HapMap Project*, disponível em: www.hapmap.org.

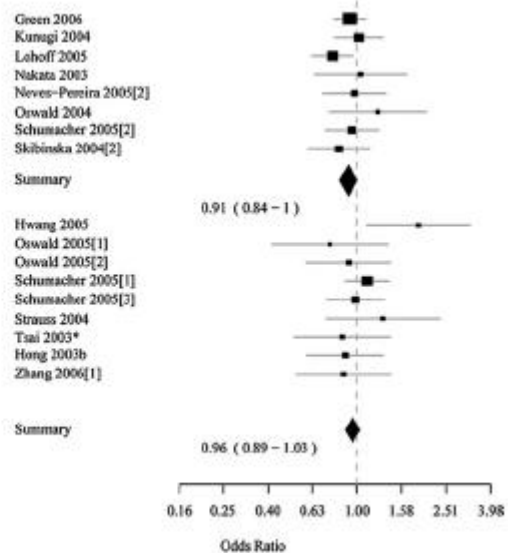
Gratacòs e cols. (2007) demonstraram, através de meta-análise, associação entre *Val66Met* e transtornos relacionados ao abuso de substâncias, transtornos alimentares e esquizofrenia, mas não observou associação com transtornos do humor (figura 9).

Na depressão maior, existem evidências da associação entre o alelo *Met* e a redução do volume do hipocampo (Szeszko e cols. 2005; Bueller e cols, 2006; Frodl e cols., 2007). A variante *Met* parece estar associada a um maior risco para o desenvolvimento de depressão em indivíduos idosos, assim como hiperintensidade em substância branca e maior período de latência para resposta aos antidepressivos (Hwang e cols., 2006; Taylor e cols., 2007; Diniz e cols., 2010; Taylor e cols., 2010).

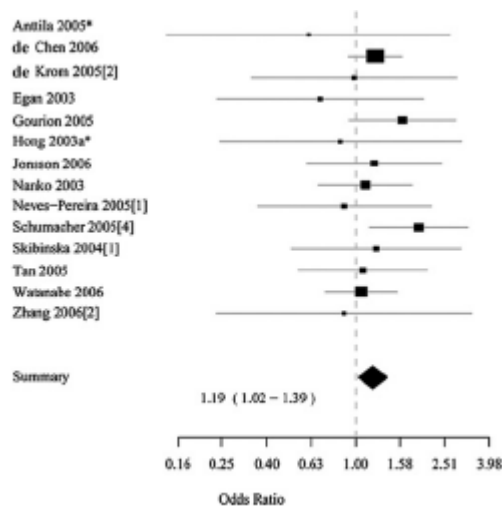
Transtornos alimentares
Val/Val x Val/Met + Met/Met



Transtornos do humor
Val/Val x Val/Met + Met/Met



Esquizofrenia
Val/Val + Val/Met x Met/Met



Transtornos relacionados ao abuso de
substâncias
Val/Val x Val/Met + Met/Met

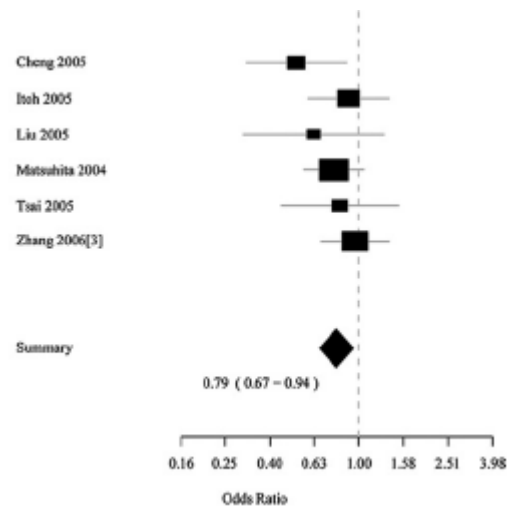


Figura 9: Meta-análise da associação entre Val/66Met e transtornos psiquiátricos. Modificado de: Gratacòs e cols, 2007.

O alelo *Met* está associado com pior desempenho nos testes de memória e redução de volume do hipocampo, mesmo em indivíduos saudáveis quando comparados aos indivíduos *Val/Val* (Egan e cols., 2003; Buellere cols., 2006; Frodl e cols., 2007). Através da emissão de projeções para o hipocampo e para o neocórtex,

a regulação negativa da secreção de *BDNF* pode contribuir para a perda neuronal na DA (Huang e cols., 2006). Existem relatos conflitantes da relação entre DA e *Val66Met*. Matsushita e cols (2005) e Féher e cols (2009) demonstraram que o alelo *Val* é mais frequente em portadores de DA.

Por outro lado, o alelo *Met* estaria associado à redução dos níveis de A β no líquido céfalo-raquidiano (LCR) (Kauwe e cols., 2009). Borroni e cols. (2009) observaram que este alelo também se encontra significativamente associado à depressão em portadores de doença de Alzheimer, independente da presença de *APO E* ϵ 4.

Portadores do alelo *Met* apresentam ativação anormal do hipocampo e maior atrofia desta estrutura quando comparado aos portadores do alelo *Val*. Considerando-se que o hipocampo apresenta um papel na depressão e está primariamente envolvido na fisiopatologia da DA. Estes achados sugerem que *BDNF* poderia ser considerado como uma ligação entre depressão e DA (Tsai, 2003).

Tanto o *BDNF* quanto a serotonina (5-HT) apresentam função reguladora na neurogênese, sobrevivência e plasticidade sináptica. Ambos regulam o desenvolvimento e a plasticidade dos circuitos neurais envolvidos nos transtornos do humor. Além disso, o *BDNF* promove a sobrevivência e diferenciação dos neurônios serotoninérgicos. Existem evidências de sinergismo entre os dois sistemas nos transtornos do humor e de epistasia¹⁵ entre *BDNF* e 5-HTT (Martinovick & Lu, 2008). Estes dois sistemas interagem entre si para regular o desenvolvimento e a plasticidade dos circuitos neurais envolvidos nos transtornos do humor. Galter & Unssicker (2000a, 2000b) observaram que existe uma alça de *feedback* na regulação serotoninérgica. A serotonina estimula a transcrição de *BDNF* e, então, a sinalização de *BDNF-TrkB* é crucial para liberação de serotonina.

Vários estudos têm demonstrado a existência de epistasia entre os dois genes. Entretanto, os resultados ainda são conflitantes. Por um lado a interação do alelo *Met* do *BDNF* com o alelo S do 5-HTTLPR associados a aumento do risco para depressão e depressão resistente ao tratamento (Kaufman e cols., 2006; Kim e cols., 2007; Bocchio-Chiaveto, 2008) e por outro, a interação do alelo S do 5-HTTLPR com o *Val/Val* do *BDNF* determinando aumento do risco para depressão (Pezawas, 2008).

¹⁵ Epistasia – fenômeno no qual os efeitos de um gene são modificados por um ou vários outros genes, os quais são chamados “genes modificadores”.

1.5.3- APOLIPOPROTEÍNA E

A apolipoproteína E (MIM +107741; APOE) é uma proteína de cerca de 32kDa que transporta colesterol e outros lípidos no plasma e no SNC através da ligação aos receptores *APOE* na superfície celular. É responsável pela ligação, internalização e catabolismo das partículas de lipoproteínas. Na periferia, a *APOE* transporta lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) sintetizadas no fígado e quilomícrons, sintetizados pelo intestino. No cérebro, a APOE é sintetizada pelos astrócitos e, em menor quantidade, pela micróglia. É essencial para o suprimento de colesterol necessário para o desenvolvimento dos neurônios e para manutenção da plasticidade e função neuronais. Torna-se estável no SNC quando associada aos lípidos (Jaeger & Piertrzik, 2008; Bu, 2009).

A APOE humana possui 299 resíduos de aminoácidos e é sintetizada por vários tecidos, incluindo fígado, cérebro, baço e rim. Apresenta elevada concentração no fígado e no cérebro. A região que interage com os receptores de APOE (resíduos 136-150) encontra-se no domínio N-terminal, enquanto a principal região de ligação aos lípidos (resíduos 244-272) encontra-se no domínio C-terminal (Bu, 2009).

O gene *APOE* (MIM +107741) localiza-se no cromossomo 19 (19q13.2) e possui 4 exons. Existem três alelos polimórficos diferentes ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) que são formados a partir da associação entre dois SNPs, *rs429358* e *rs7412*. Os diferentes alelos determinam seis diferentes genótipos ($\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 4/\epsilon 4$). A tabela 5 mostra as variantes da *APOE* determinadas por estes SNPs e a sua frequência na população geral. As três isoformas da proteína resultante diferem nos resíduos 112 e 158 de sua estrutura primária (figura 10). As mudanças de aminoácidos nas três isoformas alteram a estrutura protéica e influenciam sua associação com os lípidos e a ligação ao receptor (figura 11). As variações genéticas da *APOE* estão associadas a alterações nos níveis de lípidos plasmáticos e aumento do risco relativo para DAC e DA. A afinidade da ligação entre a proteína APOE3 e a APOE4 e o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR) é cerca de 50 vezes maior do que a afinidade da APOE2. Como resultado, a APOE2 transporta os lípidos de forma menos eficiente, associa-se a baixos níveis de LDL-

colesterol e elevação dos níveis de triglicérides e lipoproteínas remanescentes. Relaciona-se à hiperlipoproteinemia tipo III¹⁶. A APOE4 liga-se preferencialmente a grandes partículas de lipoproteína e associa-se a um risco moderadamente elevado para doenças cardiovasculares. A preferência da APOE4 pelas grandes partículas se deve à presença da arginina (Arg) na posição 112, o que afeta a conformação do sítio de ligação da Arg61, resultando em interação de domínio entre Arg61 e o domínio N-terminal e Glu255 (ácido glutâmico) e o domínio C-terminal (Mahley, Huang & Rall, 1999; Poirer, 1995; Zuo e cols., 2006; Ferreira e cols, 2010).

Tabela 5: Variantes genéticas determinadas pelos polimorfismos da APOE (*rs429358* e *rs7412*)

<i>rs429358</i>	<i>rs7412</i>	Alelo do gene APOE	Frequência alélica (%)
T (Cys)	T (Cys)	ε2	11
T (Cys)	C(Arg)	ε3	72
C(Arg)	C (Arg)	ε4	17

As variantes alélicas da APOE são determinadas pelos polimorfismos nas posições 112 e 158. Frequência alélica na população geral, em porcentagem. Cys: cisteína; Arg: arginina. Modificado de: Dias e cols., 2009.

O gene APOE é o único fator de risco genético definido como de susceptibilidade para DA esporádica e é considerado como um marcador de risco para DA. A frequência do alelo ε4 encontra-se em torno de 15% na população geral, mas aumenta para 40% em pacientes com DA. Indivíduos carreadores de um alelo ε4 apresentam aumento de três a quatro vezes no risco de apresentar DA quando comparados com indivíduos não carreadores deste alelo, enquanto a presença dos dois alelos eleva o risco em 19 vezes (Querfurth & LaFerla, 2010). Este *odds ratio* (OR) é muito maior do que o apresentado por qualquer outro fator de risco para a doença. Os efeitos do alelo ε4 no risco para DA são máximos por volta dos 60 a 70 anos de idade. O alelo ε4 também é um fator de risco para aterosclerose e outras doenças neurológicas, incluindo angiopatia amilóide, tauopatias¹⁷ e demência por

¹⁶ Hiperlipoproteinemia tipo III é um transtorno hereditário pouco frequente que conduz a valores elevados de colesterol VLDL e triglicérides. As análises de sangue mostram concentrações elevadas de colesterol total e triglicérides. O colesterol nestes indivíduos é na sua maior parte VLDL. Estes indivíduos têm com frequência diabetes e valores elevados de ácido úrico no sangue.

¹⁷ Tauopatia- Transtorno neurodegenerativo envolvendo o depósito anormal no cérebro das isoformas das proteínas *tau* nos neurônios e células da glia. As agregações patológicas das proteínas *tau* são associadas a mutações do gene *tau* no cromossomo 17 em pacientes com doença de

Corpos de Lewy, doença de Parkinson e esclerose múltipla. Estas observações sugerem que o alelo $\epsilon 4$ pode estar associado com a neurodegeneração acelerada e desenvolvimento e progressão de várias doenças neurodegenerativas. Apesar da *APOE4* representar um fator de risco definido para a doença, diferentes estudos apresentam resultados controversos com relação à interefência da *APOE4* na idade de início, progressão e curso clínico da doença (Bu, 2009; Dias e cols., 2009).

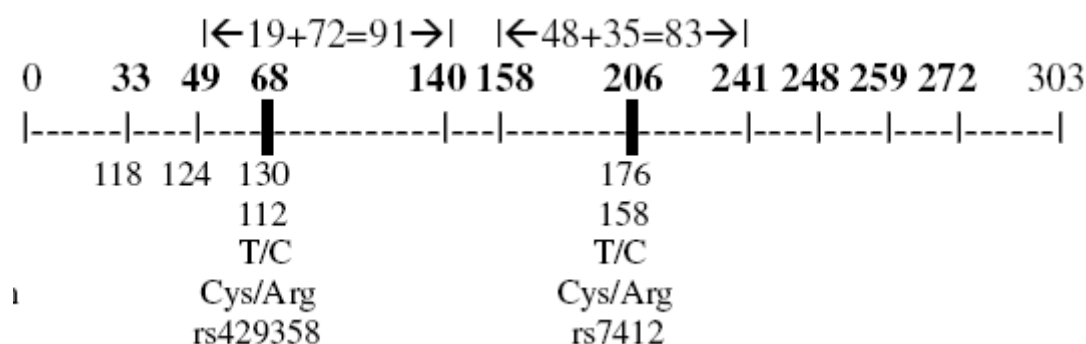


Figura 10: Representação esquemática da *APOE* humana e os SNPs *rs429358* e *rs7412*.

As isoformas da *APOE* são determinadas pelos aminoácidos nas posições 112 e 158: *APOE2* tem cisteína (Cys) em ambos os resíduos; *APOE4* possui Arg em ambos os resíduos e *APOE3* possui CYS na posição 112 e Arg na posição 158. A figura também mostra os sítios de clivagem da enzima HhaI.

Fonte: Zuo e cols., 2006.

Outros SNPs associados de forma consistente com DA em diferentes estudos, na realidade encontram-se em proximidade à *APOE* e, provavelmente refletem desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium*¹⁸ - LD) com alelo $\epsilon 4$ da *APOE* (Grupe e cols., 2007; Bertram & Tanzi, 2008; Li e cols., 2008; Butler AW, 2009; Feulner e cols., 2009; Harold e cols., 2009; Lambert e cols., 2009). Embora vários mecanismos tenham sido propostos para explicar a associação entre *APOE* e DA, eles ainda não se encontram completamente elucidados (Bu, 2009; Querfurth & LaFerla, 2010).

Alzheimer, transtornos parkinsonianos, paralisia supranuclear progressiva e degeneração corticobasal.

¹⁸ *Linkage disequilibrium*¹⁸ (Desequilíbrio de ligação) - associação randômica entre alelos de dois ou mais loci. É um indicador sensível das forças genéticas populacionais que estruturam o genoma (Slatkin, 2008).

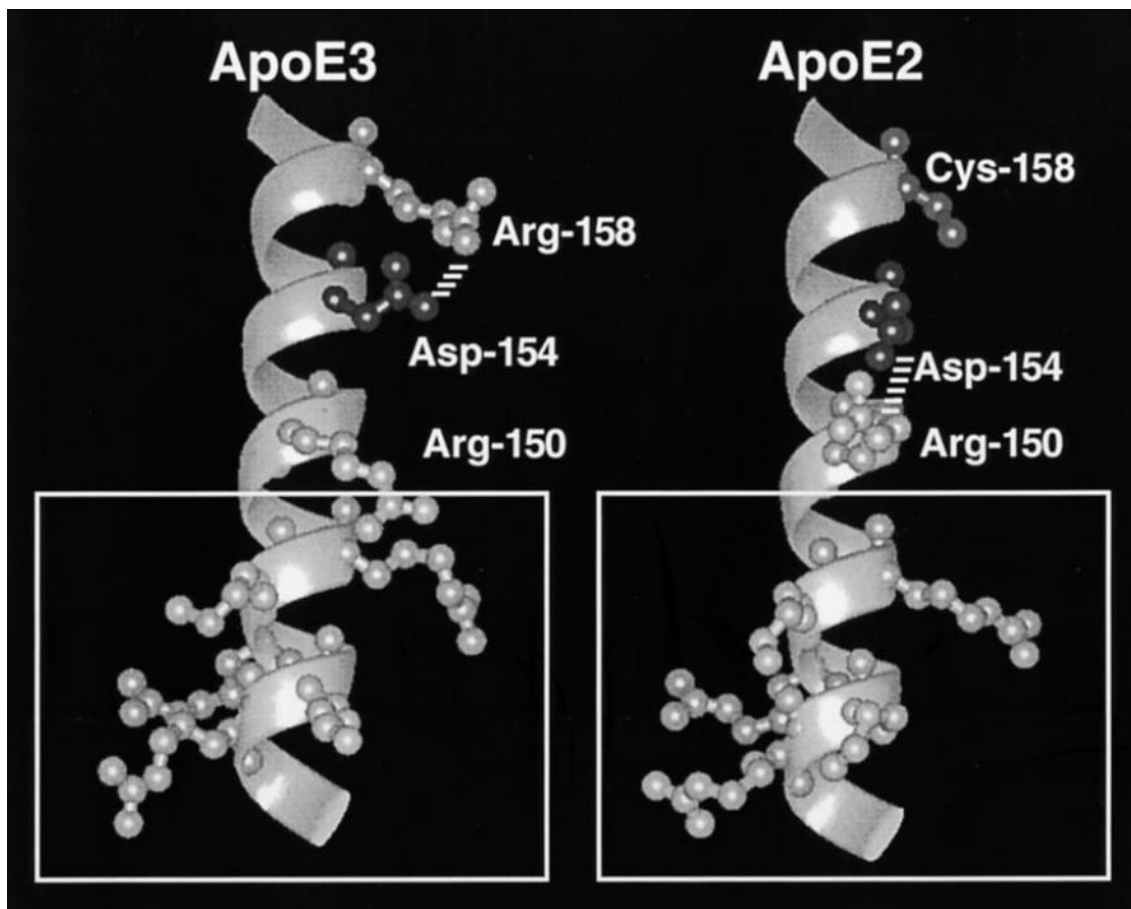


Figura 11: Estrutura tridimensional do sítio de ligação da *APOE2* e *APOE3* ao receptor.

A substituição de Arg-158 na *APOE3* por Cys-158 na *APOE2* causa um rearranjo na ligação envolvendo Arg-154, substituindo a ligação com Arg-158 na *APOE3* por Arg-150 na *APOE2*, o que altera o potencial de ligação com o receptor.

Fonte: Mahley, Huang & Rall, 1999.

O acúmulo, oligomerização e deposição de A β no cérebro são eventos centrais na patogenia da DA. Os níveis de A β no cérebro refletem um equilíbrio entre sua produção e eliminação. Desta forma, o acúmulo de A β pode refletir um excesso de produção e/ou uma remoção ineficiente. As evidências sugerem que tanto a *APOE* quanto seus receptores apresentam importante função em ambos os processos (Bu, 2009).

No SNC, a *APOE* está envolvida no consumo e redistribuição do colesterol. Suas diferentes isoformas modificam a homeostase do colesterol no cérebro através da ligação preferencial com partículas específicas de lipoproteínas. Sua função na modificação da homeostase do colesterol no cérebro pode contribuir para a relação entre *APOE* e DA. Além disso, *APOE* está presente dentro das placas amilóides, representando seu principal componente e interagindo diretamente com A β . A ligação com A β ocorre na região C-terminal da *APOE*, em sobreposição ao sítio de

ligação com lípidos, comprometendo sua função no metabolismo dos lípidos cerebrais e, assim contribuindo com a patogênese da DA. Os peptídeos A β ligam-se à *APOE3* com maior afinidade do que com a *APOE4*. Desta forma, a *APOE3* remove a A β mais eficientemente do que a *APOE4*. A β também pode ser removida do cérebro através de degradação proteolítica. As enzimas de degradação são produzidas pelos neurônios ou pela glia. A neprilisina e a enzima degradadora de insulina são as mais amplamente estudadas. O alelo $\epsilon 4$ está associado com a redução da expressão destas duas enzimas. A *APOE3* promove a degradação de A β pela neprilisina e pela IDE de forma mais eficiente do que a *APOE4* (Lane & Farlow, 2005; Jaeger & Pietrzik, 2008; Bu, 2009).

Os agregados de A β , particularmente os oligômeros A β , são altamente tóxicos para os neurônios. *APOE4* aumenta mais a neurotoxicidade induzida pelo oligômero A β 42 do que *APOE3* (Bu, 2009).

A função primária da *APOE* no cérebro é o transporte de colesterol, principalmente dos astrócitos para os neurônios. O colesterol é um componente essencial das membranas e bainhas de mielina para manutenção da integridade sináptica e função neuronal. O colesterol associado às partículas de lipoproteína-*APOE*, que são secretadas pelos astrócitos, é essencial para formação das sinapses, através de um mecanismo que envolve os receptores de *APOE*. Evidências sugerem que a *APOE4* é menos eficiente do que a *APOE3* no transporte cerebral de colesterol e, na promoção do efluxo de colesterol dos neurônios e dos astrócitos (Bu, 2009).

A *APOE* também pode estar envolvida na fisiopatologia da DA através da via *tau*. Os alelos 2 e 3 podem se ligar à proteína *tau* e prevenir sua hiperfosforilação. Embora o alelo 4 também se ligue à *tau*, ele não previne sua hiperfosforilação e pode determinar sua desestabilização. Este pode ser parte do mecanismo da *APOE* na etiologia da DA (Zuo e cols., 2006).

Além disso, a *APOE* também está envolvida na recuperação neuronal e sináptica, após uma lesão. A função primária do aumento da expressão da *APOE* induzida por uma lesão é provavelmente redistribuir lípidos e aumentar a sinalização para o reparo sináptico e neuronal. O alelo 4 é menos eficiente do que o alelo 3 na manutenção e no reparo neuronal e sináptico após um trauma (Lane & Farlow, 2005; Kim, Basak & Holtzman, 2009).

A figura 12 resume as funções cerebrais normais da *APOE* e na patogénia da DA e compara os alelos 3 e 4.

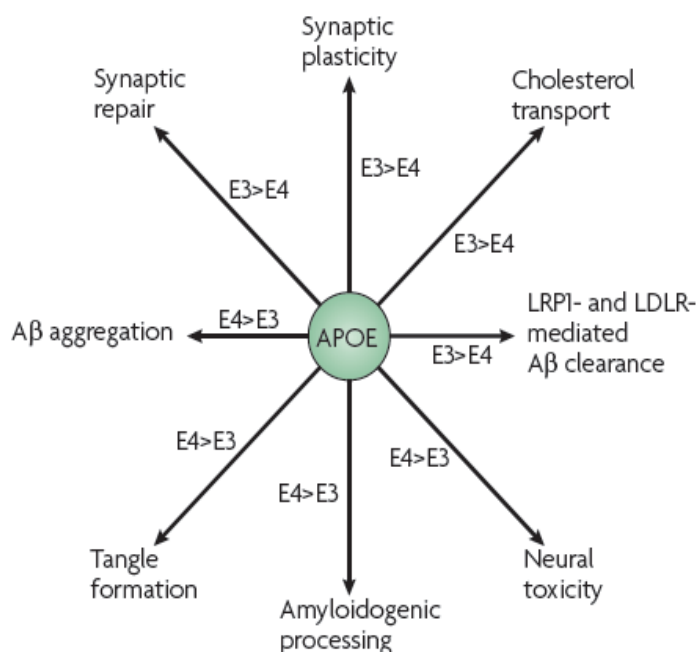


Figura12: Papel das isoformas da *APOE* em cérebros saudáveis e na patogénese da DA.

Aβ aggregation: agregação da proteína beta-amilóide; *Synaptic repair*: reparo sináptico; *Synaptic plasticity*: plasticidade sináptica; *Cholesterol transport*: transporte de colesterol; *LRP1 and LDLR-mediated Aβ clearance*: eliminação de Aβ mediada pelo receptor de proteína de baixa densidade (LDLR) e proteína 1 relacionada ao receptor de proteína de baixa densidade (LRP1); *Neural toxicity*: toxicidade neural; *Amyloidogenic processing*: processamento amiloidogénico; *Tangle formation*: formação dos emaranhados.

Fonte: Bu, 2009.

A presença da Apolipoproteína E alelo $\epsilon 4$ é um fator de risco para DA e para doença cerebrovascular, as quais são condições associadas à depressão de início tardio. Entretanto, a maioria das investigações não observou associação entre o alelo $\epsilon 4$ e a depressão de início tardio (Alexopoulos, 2005). Krishnan e cols. (1996) demonstraram que o alelo $\epsilon 4$ era mais frequente na depressão de início tardio e, que os indivíduos carreadores deste alelo apresentavam menor pontuação no Mini-Mental, sugerindo uma associação com o declínio cognitivo. Rigaud e cols. (2001) também observaram relação entre *APOE4* e depressão de início tardio. Irie e cols. (2008) observaram que a *APOE* não foi um fator de risco isolado para depressão. Entretanto, indivíduos deprimidos carreadores de *APOE4* apresentaram maior risco de evolução para demência quando comparados a indivíduos não deprimidos carreadores do alelo $\epsilon 4$. Pacientes deprimidos carreadores de *APOE4* também apresentaram anormalidades mais pronunciadas no hipocampo do que os não

carreadores (Qiu e cols., 2008). Apesar desses resultados, inúmeros estudos não demonstraram associação significativa entre depressão geriátrica e *APOE* (Zubenko e cols., 1996; Lyketsos e cols., 1997; Schmand e cols., 1998).

Com relação à depressão como manifestação psiquiátrica associada à demência, os resultados dos diversos trabalhos também apresentam inúmeras divergências. Alguns associam o alelo $\epsilon 4$ à depressão na DA (Ramachandran e cols., 1997), enquanto outros observaram associação entre o alelo 2 e depressão na DA (Holmes e cols., 1998). Vários estudos não demonstraram relação entre *APOE* e DA com depressão (Forsell e cols., 1997; Pritchard e cols., 2007, Slifer e cols., 2009).

Conforme previamente exposto, os alelos da *APOE* são definidos a partir da combinação de alelos dos SNPs *rs429358* e *rs7412* (tabela 5). O *rs429358* é um polimorfismo funcional que consiste na troca de T por C no resíduo 130 do precursor da *APOE*, determinando a mudança de uma cisteína por uma arginina na posição 112 da proteína. As frequências alélica e genotípica encontram-se demonstradas na tabela 6. O *rs7412* também é um polimorfismo funcional que consiste na troca de C por T no resíduo 176 do precursor da *APOE*, o que determina a substituição de arginina por cisteína na posição 158 da *APOE*. As frequências alélica e genotípica, em diferentes populações, encontram-se demonstradas na tabela 7.

Tabela 6: Frequências alélica e genotípica do *rs429358*:

População		Genótipo		Alelo	
		C/T	T/T	C	T
CHB	Asiáticos	0	1.0	0	1.0
JPT	Asiáticos	0.023	0.977	0.011	0.989
YRI	Africanos	0.033	0.967	0.017	0.983
	Sub-Saara				

CHB: chineses Han de Pequim; JPT: japoneses de Tóquio; YRI: yoruba de Ibadan, Nigéria.
Fonte: *International HapMap Project*, disponível em: www.hapmap.org.

Tabela 7: Frequências alélica e genotípica do *rs7412*:

População		Genótipo			Alelo	
		C/C	C/T	T/T	C	T
ASW	Africanos EUA	0.788	0.192	0.01	0.885	0.115
CHB	Asiáticos	0.783	0.217	0	0.892	0.108
CHD	Chineses EUA	0.833	0.167	0	0.917	0.083
GIH	Índios EUA	0.908	0.080	0.01	0.948	0.052
JPT	Asiáticos	0.893	0.107	0	0.946	0.054
LWK	Africanos	0.895	0.105	0	0.948	0.052
MEX	Mexicanos	0.875	0.125	0	0.938	0.062
TSI	Europeu	0.918	0.082	0	0.959	0.041
YRI	Africanos	0.809	0.191	0	0.905	0.095

ASW: ancestralidade africana no sudeste dos EUA; CHB: chineses Han de Pequim; CHD: chineses em Denver, Colorado; GIH: índios Guajaratí em Houston, Texas; JPT: japoneses de Tóquio; LWK: Luhya em Webuye, no Quênia; MEX: mexicanos; MKK: Maasai em Kinyawa, no Quênia; TSI: Toscana, na Itália; YRI: yoruba de Ibadan, Nigéria.

Fonte: *International HapMap Project*, disponível em: www.hapmap.org.

1.5.4- COMT

A dopamina é um neurotransmissor crítico para as funções executivas definidas pelo córtex pré-frontal. Os níveis de dopamina no lobo pré-frontal são determinados pela biosíntese e liberação deste neurotransmissor, assim como pela taxa de difusão, recaptação e degradação. A *Catecol-O-Metiltransferase* (COMT) é uma importante enzima de metilação que metaboliza a dopamina liberada e a converte em 3-metoxitiramina e o metabólito ácido diidroxifenilacético em ácido homovalínico (Lotta e cols., 1995).

A dopamina apresenta um importante papel na modulação da atividade dos circuitos pré-frontais durante as atividades que envolvem a memória de trabalho. Pelo fato da COMT metabolizar a dopamina livre, mesmo existindo outras proteínas envolvidas no metabolismo da dopamina, ela parece desempenhar um papel importante nas tarefas mediadas pelo circuito pré-frontal. Apesar de sua ampla distribuição nos neurônios não dopaminérgicos e na glia, o fluxo catabólico sináptico da dopamina através da COMT é característico do córtex pré-frontal. Desta forma,

variações na atividade da COMT podem determinar efeitos neurobiológicos específicos no córtex pré-frontal (Egan e cols., 2001).

Existem duas formas distintas de COMT, a COMT solúvel (S-COMT) e a COMT ligada à membrana (MB-COMT) (figura 13). Ambas são codificadas por um único gene, usando dois promotores separados. A S-COMT contém 271 aminoácidos, enquanto a MB-COMT apresenta um resíduo longo de 50 aminoácidos na extensão amino-terminal que contém a região de ancoragem hidrofóbica na membrana (Lotta e cols., 1995).

O gene *COMT* (MIM +116790) localizado no cromossomo 22 (22q11.21), apresenta 6 exons com 27 kilobases. O polimorfismo funcional no exon 4, *rs4680*, é relativamente comum e observado apenas em humanos. Este SNP constitui na troca de uma base G por A, determinando a substituição de valina (*Val*) por metionina (*Met*) no locus 108/158 na sequência peptídica (*Val*^{108/158}*Met*). É responsável por mais de 95% das variações da atividade da *COMT* em humanos. A tabela 8 mostra as diferenças alélicas e genotípicas em diferentes populações. A figura 13 mostra a estrutura da *COMT* e seus principais polimorfismos. A enzima contendo o alelo *Met* é instável a 37°C e apresenta um quarto da atividade da enzima contendo *Val*. Assim, as variações geneticamente determinadas na atividade da *COMT* podem afetar a atividade cortical pré-frontal, especialmente em tarefas que envolvam as funções executivas e a memória de trabalho. A atividade aumentada da enzima contendo o alelo *Val* determina um aumento do catabolismo da dopamina e, por consequência, altera as funções pré-frontais (Lotta e cols., 1995; Mayada e cols., 2003). Dessa forma, o alelo *Met* pode intensificar um importante componente da função cognitiva normal. Indivíduos *Met/Met* apresentam melhor desempenho em tarefas executivas, indivíduos *Val/Val* apresentam o pior desempenho e os heterozigotos apresentam desempenho intermediário. Além das modificações das funções pré-frontais, também ocorreria uma super-regulação da atividade da dopamina estriatal. Há evidências de que carreadores do alelo *Val* estariam mais predispostos a esquizofrenia (Egan e cols., 2001; Mayada e cols., 2003).

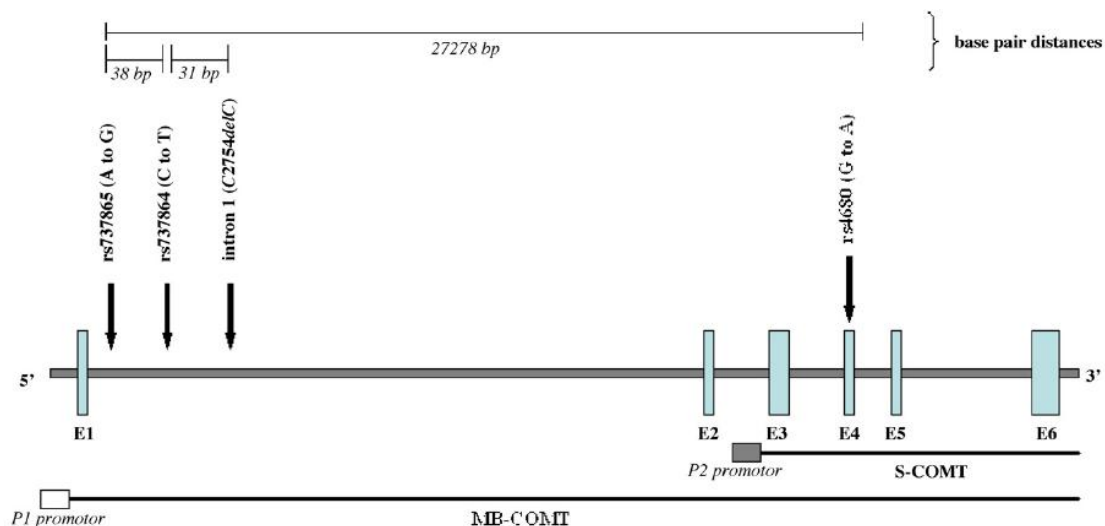


Figura 13: Estrutura da *Catecol-o-metiltransferase* (*COMT*) e a localização dos principais polimorfismos.

P1 promotor: promotor 1; P2 promotor: promotor 2; MB-COMT: enzima de membrana; S-COMT: enzima solúvel; E: exon; bp: pares de base; base pair distances: distancia em pares de base.

Fonte: Borroni e cols., 2007.

Tabela 8: Frequências alélica e genotípica do rs4680:

		Genótipo			Alelo	
		G/G	A/G	A/A	G	A
ASW	Africanos EUA	0.604	0.283	0.113	0.745	0.255
CEU	Europeu	0.292	0.460	0.248	0.522	0.478
CHB	Chineses	0.512	0.381	0.107	0.702	0.298
CHD	Chineses EUA	0.447	0.506	0.047	0.700	0.300
GIH	Índios EUA	0.375	0.409	0.216	0.580	0.420
JPT	Asiáticos	0.500	0.403	0.07	0.715	0.285
LWK	Africanos	0.472	0.427	0.101	0.685	0.315
MEX	Mexicanos	0.380	0.460	0.160	0.610	0.390
TSI	Europeu	0.284	0.511	0.205	0.540	0.460
YRI	Africanos	0.460	0.451	0.088	0.686	0.314

ASW: ancestralidade africana no sudeste dos EUA; CEU: residentes de Utah, ancestralidade do norte e região ocidental da Europa; CHB: chineses Han de Pequim; CHD: chineses em Denver, Colorado; GIH: índios Gujarati em Houston, Texas; JPT: japoneses de Tóquio; LWK: Luhya em Webuye, no Kênia; Mex: mexicanos; MKK: Maasai em Kinyawa, no Kênia; TSI: Toscana, na Itália; YRI: yoruba de Ibadan, Nigéria.

Fonte: *International HapMap Project*, disponível em: www.hapmap.org.

Val158Met tem sido objeto de estudo da epidemiologia molecular e tem sido apontado como fator de risco para inúmeras doenças psiquiátricas, incluindo esquizofrenia (Egan e cols., 2001; Glatt e cols., 2003) e susceptibilidade para psicose na DA. Martínéz e cols. (2009) observaram que *Val158Met* não constitui um fator de risco independente para DA ou transtorno cognitivo leve, mas apresenta interação sinérgica com o alelo $\epsilon 4$ da *APOE* e esta interação seria mais importante nas mulheres, provavelmente resultante da participação da *COMT* no metabolismo do estrógeno¹⁹. Borroni e cols. (2006) demonstraram que o alelo *Val* da *COMT* e alelo S do *5-HTTLPR* correlacionam-se isoladamente com endofenótipos de BPSD em DA, enquanto a *APOE* não está associada a estes endofenótipos. Em 2007, Borroni e cols. demonstraram a associação entre haplótipos da *COMT* e psicose na DA.

Os resultados dos estudos envolvendo depressão e *Val158Met* são controversos; alguns estudos não demonstraram associação entre o polimorfismo e o desenvolvimento de depressão (Baekken e cols, 2008; Wray e cols., 2008), enquanto outros demonstram associação do alelo *Val* com depressão e com pior resposta ao tratamento antidepressivo (Massat e cols, 2005; Baune e cols., 2008). Pan e cols. (2009) observaram redução do volume do hipotálamo em idosos deprimidos no grupo que apresentava *Val158Met* em associação com *C677T* (polimorfismo da metilenotetraidrofosfatorredutase) em comparação com idosos sem depressão. Potter e cols. (2009) não observaram associação entre *Val158Met* e o desempenho cognitivo em idosos portadores de depressão quando comparados a controles sem depressão.

Considerando as possíveis relações entre depressão e DA e dos polimorfismos funcionais do *5-HTT*, *BDNF*, *APOE* e *Val158Met* da *COMT*, optamos por estudar estas relações em uma população de idosos brasileira.

¹⁹ O estrógeno exerce um efeito protetor sobre o SNC para a DA, através de sua interação com *APOE* e da redução da apoptose neuronal e da resposta inflamatória. A *COMT* participa do metabolismo do estrógeno. Alteração de sua atividade enzimática pode levar a redução do efeito neuroprotetor do estrógeno (Martínéz e cols., 2009).

OBJETIVOS

Considerando os dados da literatura, delineamos um estudo que visa estabelecer as relações genéticas, ambientais e clínicas envolvidas no processo de depressão-demência no idoso. Nossos objetivos são:

- Avaliar a existência de associação entre os polimorfismos funcionais do 5-*HTT*, Apolipoproteína E (*APOE*), *BDNF* e *COMT* no binômio depressão-demência em idosos brasileiros.
- Avaliar a existência de associação entre os polimorfismos funcionais do 5-*HTT*, *APOE*, *BDNF* e *COMT*, co-morbididades clínicas e fatores sócio-demográficos e a depressão de início tardio;
- Avaliar a existência de associação entre os polimorfismos funcionais do 5-*HTT*, *APOE*, *BDNF* e *COMT*, co-morbididades clínicas e fatores sócio-demográficos e a doença de Alzheimer;
- Avaliar a existência de associação entre os polimorfismos funcionais do 5-*HTT*, *APOE*, *BDNF* e *COMT*, co-morbididades clínicas e fatores sócio-demográficos e a doença de Alzheimer com BPSD.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- DESENHO DO ESTUDO:

Realizamos um estudo observacional transversal com 406 indivíduos com idade acima de 60 anos. Os participantes foram separados em quatro grupos distintos: controles, pacientes portadores de depressão maior de início tardio, pacientes portadores de demência de Alzheimer de início tardio e, portadores de DA com BPSD. Os grupos foram comparados com relação aos dados sócio-demográficos, variáveis clínicas e polimorfismos genéticos.

Os indivíduos selecionados são pacientes do Centro de Referência em Atenção ao Idoso Instituto Jenny de Andrade Faria de Atenção à Saúde do Idoso e da Mulher do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Este serviço é referência em diagnóstico e tratamento de transtornos de memória em Belo Horizonte e utiliza protocolo padronizado para avaliação dos pacientes. Também foram incluídos dez pacientes institucionalizados no Lar Cidade Ozanan²⁰, com aplicação dos mesmos instrumentos de avaliação.

O Centro de Referência em Atenção ao Idoso Instituto Jenny de Andrade Faria de Atenção à Saúde do Idoso e da Mulher do HC-UFMG é um centro especializado no atendimento ao idoso pelo Sistema Único de Saúde no Estado de Minas Gerais. Trata-se de um serviço multiprofissional de assistência integrada a idosos, que prioriza o atendimento a idosos frágeis e portadores de síndromes demenciais. Em 2002, o centro foi credenciado como o primeiro Centro de Referência em Atenção ao Idoso do Estado de Minas Gerais (Portaria GM/MS nº 703 /2002)²¹. É responsável pela implementação do Programa de Assistência aos Portadores da Doença de Alzheimer (Portaria nº 843, de 2002) em Minas Gerais, permitindo o acesso gratuito à medicação específica. Realiza aproximadamente 500 novos atendimentos por mês.

²⁰ Lar Cidade Ozanan - instituição de longa permanência, situado no bairro Ipiranga em Belo Horizonte. Possui 100 internos que recebem assistência multiprofissional de profissionais do Centro de Referência em Atenção ao Idoso Instituto Jenny de Andrade Faria.

²¹ Portaria nº 703/2002 - cria mecanismos para organização e implantação de Redes Estaduais de Assistência à Saúde do Idoso e determina às Secretarias de Saúde dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios a adoção das providências necessárias para a implantação de redes de assistência ao idoso, composta de hospitais gerais e de centros de referência.

O Centro de Referência recebe pacientes encaminhados pelos serviços de atenção primária. O agendamento das consultas é realizado através da Central de Marcação da Secretaria Municipal de Saúde de BH.

3.2- SELEÇÃO DA AMOSTRA:

Os participantes foram selecionados em dois períodos distintos: de janeiro de 2005 a julho de 2006 e de outubro de 2007 a dezembro de 2009.

A seleção, por conveniência, dos participantes foi realizada por profissionais capacitados para a realização da avaliação cognitiva. Os casos eram discutidos e revistos periodicamente entre as equipes de geriatria, de psicogeriatria e de neuropsicologia do Centro de Referência.

Para assegurar a validade psicométrica do estudo foi realizado o treinamento dos avaliadores que aplicaram os instrumentos. Os pesquisadores foram responsáveis pelo treinamento na aplicação dos testes e na pontuação de escores nos instrumentos específicos. Uma vez treinados, a confiabilidade dos novos avaliadores foi estabelecida por comparação com avaliadores experientes. Assuntos concretos relacionados à avaliação foram discutidos em reuniões semanais, com a participação dos investigadores responsáveis pela aplicação dos instrumentos específicos e da equipe clínica responsável pelos pacientes.

Após aplicação dos testes diagnósticos, os indivíduos foram divididos em três grupos distintos: controle (97 indivíduos), portadores de depressão maior de início tardio (140) e portadores de demência de Alzheimer (DA) de início tardio (169 indivíduos). Dentre os portadores de DA, foram selecionados pacientes portadores de BPSD (94 indivíduos). Destes, 53 apresentavam depressão associada à DA. Os portadores de DA sem BPSD constituíram 75 pacientes. O fluxograma da figura 14 demonstra os grupos de participantes.

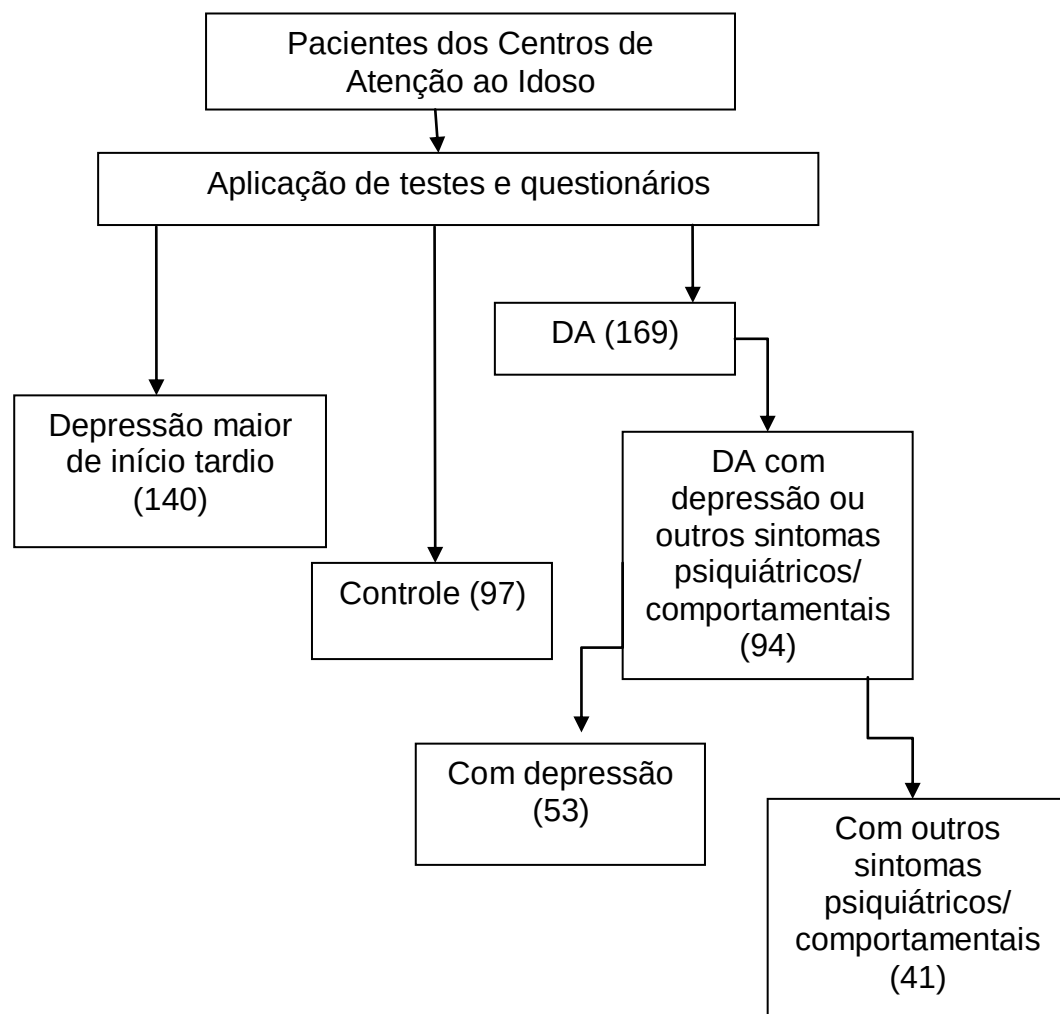


Figura 14: fluxograma de seleção dos indivíduos para o estudo.

Os indivíduos pertencentes ao grupo controle foram selecionados com extremo rigor entre os pacientes em acompanhamento clínico no Centro de Atenção ao Idoso. Estes indivíduos realizavam controle clínico em função de outras condições médicas. Foram considerados como controles, indivíduos com ausência de história pessoal, atual e pregressa, e história familiar - em parentes de primeiro grau - de doenças neuropsiquiátricas. Para exclusão de doenças psiquiátricas, eles foram submetidos ao *Mini-international Neuropsychiatric Interview* (MINI-PLUS) versão em português (Amorim P, 2000). O MINI-PLUS é uma entrevista psiquiátrica estruturada de curta duração desenvolvida para aplicação em triagem clínica multicêntrica e estudos epidemiológicos (Sheeran e cols., 1998).

O diagnóstico de transtorno depressivo maior de início tardio foi realizado baseado nos critérios do DSM IV e da Escala de Depressão Geriátrica (GDS) validada em português (Sheikh & Yesavage, 1986; Almeida & Almeida, 1999). Foi

considerado 6/15 o ponto de corte para o diagnóstico de depressão através do GDS. Todos os indivíduos apresentaram o primeiro episódio depressivo após os 60 anos de idade. Foram excluídos pacientes que apresentavam outros transtornos psiquiátricos associados, sintomas depressivos secundários ao luto e à condições clínicas e ou medicamentosa e, indivíduos portadores de doenças neurológicas, como Doença de Parkinson, Coreia de Huntington, epilepsia, passíveis de associações com os polimorfismos genéticos selecionados para estudo.

Seguindo as recomendações do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia, o diagnóstico de demência foi feito baseado nos critérios da APA (DSM IV) e o diagnóstico de demência de Alzheimer provável baseado nos critérios da *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke e Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) (Anexo 1). Foram selecionados apenas indivíduos portadores de doença de Alzheimer de início tardio. Foram excluídos pacientes portadores de outros tipos de demência.

Na tabela 9 listamos a bateria de testes utilizada para o diagnóstico de DA. Estes testes são parte integrante do protocolo utilizado no centro de diagnóstico para liberação de medicamentos excepcionais da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Minas Gerais e são essenciais para a dispensação dos anticolinesterásicos²² padronizados para o tratamento de DA. Além dos testes clínicos foram realizados exames complementares para exclusão de outras possíveis causas de demência e avaliação de indicação e contra-indicações da terapêutica. A avaliação por neuroimagem, através de tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética, foi realizada nos casos em que havia indicação clínica para investigação de outras etiologias para a síndrome demencial, suspeita de demência mista²³ ou de complicações (associadas ou não à DA), como hematoma subdural.

²² Anticolinesterásicos – medicamentos que agem através da inibição da colinesterase na fenda sináptica determinando assim, aumento da transmissão colinérgica. Na DA existe redução da síntese de acetilcolina no SNC, o que determina uma redução da função colinérgica cortical.

²³ Demência mista - corresponde a um quadro resultante da associação da doença de Alzheimer e do comprometimento cognitivo vascular/demência vascular.

Tabela 9: Bateria de testes cognitivos e de transtornos psiquiátricos utilizada no Centro de Atenção ao Idoso:

Avaliação cognitiva e dos transtornos psiquiátricos	
Mini mental	Folstein e cols., 1975; Brucki e cols., 2003.
Fluência verbal	Brucki e cols., 1997
Lista de palavras CERAD	Morris e cols., 1989; Bertolucci e cols., 1998.
Reconhecimento de figuras	Nitrini e cols., 1994
Teste do relógio	Nitrini e cols., 1994
Inventário neuro-psiquiátrico	Cummings e cols., 1994
CDR	Morris e cols., 1993
FAB	Dubois e cols., 2000
Avaliação funcional Pfeffer	Pfeffer e cols., 1982
Avaliação funcional Lawton	Lawton & Brody, 1969
Avaliação funcional Katz	Katz e cols., 1963
Crítérios diagnósticos para depressão	DSM IV (APA, 1994)
GDS	Almeida & Almeida, 1999
MINI PLUS	Amorim P, 2000
Escala de depressão de Hamilton	Hamilton M, 1960
Escala de Cornell	Alexopoulos GA, 1988; Carthery-Goular, 2007.

CERAD: *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*; CDR- *Clinical Dementia Rating*; FAB: *Frontal and Assessment Battery*; MINI-PLUS: *Mini International Neuropsychiatric Interview*; GDS: Escala de depressão Geriátrica.

Para excluir demências de causas reversíveis foram realizados exames complementares como TSH, ácido fólico, vitamina B12, uréia, creatinina, VDRL, anti-HIV, avaliação de funções hepática e renal, conforme avaliação clínica. Outros exames complementares foram solicitados de acordo com a indicação clínica.

Todos os indivíduos portadores de depressão de início tardio e demência foram acompanhados durante um período mínimo de dois anos. Os controles foram rigorosamente selecionados.

Todos os pacientes portadores de DA foram submetidos ao Inventário Neuropsiquiátrico (NPI - *Neuropsychiatry Inventory*) (figura 15), aplicação da Escala de Cornell (anexo 2) para diagnóstico de depressão associada à DA e aos Critérios Diagnósticos para Depressão na Doença de Alzheimer do NIMH (anexo 3) para avaliação dos sintomas psiquiátricos associados à DA (BPSD). Para o diagnóstico de BPSD, os sintomas deveriam estar presentes, pelo menos de forma intermitente, durante o período mínimo de um mês e com gravidade suficiente para provocar ruptura e/ou outras alterações funcionais nos pacientes. Baseado nos critérios

diagnósticos os pacientes portadores de DA eram subclassificados como portadores ou não de sintomas psiquiátricos.

INVENTÁRIO NEUROPSIQUIÁTRICO (NPI – CUMMINGS <i>et al.</i> , 1994)								
Intensidade: <i>1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave;</i>	Frequência: <i>1 = ocasionalmente, menos de uma vez por semana; 2 = pouco frequentemente, cerca de uma vez por semana; 3 = frequentemente, várias vezes por semana, mas não todo dia; 4 = Muito frequentemente, uma ou mais vezes por dia ou continuamente</i>							
SINTOMATOLOGIA	NÃO	SIM						
		INTENSIDADE			FREQUÊNCIA			
		1	2	3	1	2	3	4
Delusão: idéias de cunho persecutório, de furto ou infidelidade.								
Alucinações: visuais/ auditivas/ táteis/ olfativas								
Agitação, inquietude, agressividade								
Disforia: baixa de humor, tristeza								
Ansiedade								
Euforia								
Apatia: comportamento passivo, falta de iniciativa,								
Desinibição								
Irritabilidade/Labilidade emocional								
Atividade motora aberrante: perambulação,...								

Figura 15: Inventário Neuropsiquiátrico (NPI).

Fonte: Protocolo de Avaliação Multidimensional do Idoso - Centro de Referência Jenny de Andrade Faria.

Foram excluídos indivíduos com história de outras doenças neuropsiquiátricas, incluindo doença de Parkinson; portadores de síndromes demenciais que não preencheram critérios para DA; indivíduo com evidência de retardo mental ou transtorno importante de desenvolvimento.

Todos os indivíduos foram submetidos à avaliação geriátrica completa, através do Protocolo de Avaliação Multidimensional do Idoso (disponível no site: www.hc.ufmg.br/geriatria/pdf/protocolo_avaliacao_idoso.pdf). Além disso, realizamos revisão de prontuário de todos os casos.

3.3- VARIÁVEIS ANALISADAS:

3.3.1- DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS:

Foram avaliados dados como: idade (em anos), gênero (masculino ou feminino), escolaridade, estado civil, eventos estressores de vida (fatores psicossociais ou ambientais) e comorbidades clínicas.

Optamos por não analisar a variável cor da pele na nossa amostra, pois já foi demonstrado que na população brasileira a cor da pele determinada através da avaliação física é um mau preditor da ancestralidade genômica estimada por meio de marcadores moleculares (Parra e cols., 2003).

A escolaridade foi avaliada por meio do levantamento do número de anos de estudo de cada participante. Desta forma, foi feito um agrupamento dos pacientes em relação a este número, sendo categorizados em inferior a quatro anos de estudo; de quatro a oito; de nove a 11 anos de estudo; acima de 11 anos de estudo.

Aplicamos um questionário semi estruturado com avaliação de 12 categorias de “eventos adversos da vida”– *List of Threatening Experiences - Questionnaire version* (LTE-Q) (Brugha & Cragg, 1990): 1- óbito de parente; 2- óbito de ente querido; 3- doença própria; 4- doença grave em parente próximo ou amigo; 5- separação; 6- dificuldades de relacionamento; 7- qualquer problema sério com ente querido; 8- aposentadoria; 9- desemprego; 10- problemas financeiros significativos; 11- problemas legais; 12- perda ou roubo de um objeto de valor. Consideramos também, outras quatro variáveis a este questionário em função dos problemas próprios da faixa etária do grupo populacional estudado: 1- dependência física de qualquer espécie; 2- estado de cuidador; 3- institucionalização; 4- solidão. Foram considerados os eventos ocorridos nos últimos cinco anos. O número total de fatores psicossociais foi categorizado como: zero, 1, 2, 3 e 4 ou mais.

3.3.2-DADOS SOBRE A DEMÊNCIA DE ALZHEIMER

Foram incluídos apenas pacientes portadores de demência de Alzheimer de início tardio ou esporádica que foram subdivididos em: portadores de sintomas

psiquiátricos e/ou comportamentais (incluindo depressão associada à DA) e ausência de sintomas psiquiátricos e/ou comportamentais. Foi considerada, para efeito de análise estatística, a idade do participante baseada na data do diagnóstico de demência. Foram excluídos indivíduos portadores de DA de início precoce ou familiar e portadores de síndromes demenciais de outras etiologias.

3.3.3- DADOS SOBRE A DEPRESSÃO MAIOR DE INÍCIO TARDIO

Foram incluídos no estudo apenas portadores de transtorno depressivo maior de início tardio, baseado nos critérios do DSM IV e da Escala de Depressão Geriátrica. Foram excluídos indivíduos portadores de depressão maior de início precoce, de doenças neurológicas e de outros transtornos psiquiátricos, baseado nos resultados do *Mini International Neuropsychiatric Interview* (MINI-PLUS) versão em português (Amorim, 2000).

3.3.4- DADOS SOBRE OS PARTICIPANTES PERTENCENTES AO GRUPO CONTROLE:

O protocolo aplicado foi o mesmo dos grupos DA e depressão de início tardio, com avaliação dos mesmos fatores sócio-demográficos, clínicos e genéticos dos pacientes pertencentes aos outros dois grupos.

A idade dos participantes pertencentes ao grupo controle foi calculada em relação à data de avaliação e aplicação dos testes.

3.3.5- VARIÁVEIS CLÍNICAS ANALISADAS:

Os grupos foram avaliados com relação às seguintes condições clínicas:

- Sintomas psiquiátricos e ou comportamentais da demência – baseado no NPI (figura 15). Os sintomas deveriam estar presentes durante o período mínimo de um mês e com gravidade suficiente para provocar ruptura e/ou outras alterações funcionais nos pacientes;

- Diagnóstico de depressão na DA - baseado na escala de Cornell (Anexo 2) e considerado 10 pontos como diagnóstico de depressão e nos critérios da NIMH - Critérios diagnósticos para depressão na doença de Alzheimer (Anexo 3);
- História prévia de depressão - de início precoce ou início tardio – diagnóstico definido através dos dados extraídos dos prontuários, baseado em critérios do DSM IV ou histórico de tratamento antidepressivo prévio;
- Dislipidemia - baseada nos critérios da IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemia e Prevenção da Aterosclerose (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007). O diagnóstico de dislipidemia também foi considerado quando o paciente encontrava-se em tratamento com hipolipemiante, uma vez que a Secretaria Estadual de Saúde obedece aos critérios da Sociedade Brasileira de Cardiologia para dispensação dos medicamentos (Anexo 4);
- Hipertensão arterial sistêmica - o diagnóstico baseado nas recomendações da V Diretriz Brasileira da Sociedade Brasileira de Cardiologia de Hipertensão Arterial (Anexo 4). O diagnóstico também foi considerado quando o paciente encontrava-se em tratamento anti-hipertensivo;
- Diabetes mellitus - diagnóstico baseado nas recomendações do *Expert Committee on Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997)* (Anexo 4). Também foi considerado como portador de diabetes mellitus o indivíduo em uso de hipoglicemiante;
- Doença arterial coronariana - paciente com história pregressa ou atual confirmada de infarto agudo do miocárdio ou angina estável ou instável segundo critérios da *American Heart Association* (Anderson e cols., 2007; Fraker & Fihn, 2007; Thygesen e cols., 2007).

3.3.6- VARIÁVEIS GENÉTICAS:

Foram analisados os seguintes polimorfismos (descritos com detalhes na seção 3.5):

- 5-HTTLPR (trialélico);

- *BDNF*: rs7124442 e rs6265;
- *APOE*: rs429358 e rs7412, que vão determinar as variantes genéticas (alelos ϵ 2, ϵ 3 e ϵ 4);
- *COMT*: rs4680

3.4- CONSIDERAÇÕES ÉTICAS:

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais – parecer ETIC 334/06 (Anexo 5). Cada potencial participante foi orientado quanto aos procedimentos envolvidos no trabalho - incluindo potenciais riscos e benefícios, possíveis implicações dos resultados encontrados e contato com os pesquisadores. Quanto aos participantes pertencentes ao grupo DA, estas orientações foram feitas ao familiar ou responsável legal com posterior assinatura do termo de consentimento, uma vez que estes pacientes não respondem juridicamente pelos atos assumidos. Durante este processo, os pesquisadores enfatizaram quanto à liberdade para decidir pela não participação e para abandonar o estudo a qualquer momento. Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 6), os participantes foram submetidos à entrevistas e coleta de material biológico (sangue).

O risco associado à aplicação dos testes (questionários, entrevistas) é o potencial desconforto emocional durante o processo de resposta às questões referentes à situação clínica e psicossocial. Todos os entrevistadores apresentavam experiência no trabalho com idosos e podiam oferecer suporte emocional imediato nesses casos. Identificado um problema clínico mais sério (por exemplo: ideação suicida, sintomas psicóticos), os entrevistadores se comunicavam com o médico assistente do paciente ou com o coordenador do serviço.

Quanto à coleta de sangue, feita para uso em experimentos de genética, o risco potencial está associado à dor, equimose no local da punção e, em raras ocasiões, tonturas e infecção. A coleta foi realizada por profissional treinado, em local apropriado e com material adequado, reduzindo assim os riscos aos participantes.

Durante todo o estudo foi mantido o sigilo das informações do paciente. Todos os registros foram codificados com um identificador para evitar cruzamento entre os dados. Em nenhum momento o nome do paciente esteve associado aos materiais de estudo. Apenas os pesquisadores responsáveis diretos pelo trabalho tinham acesso aos dados clínicos e resultados dos procedimentos laboratoriais realizados.

3.5- GENOTIPAGEM:

3.5.1- EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE LEUCÓCITOS PELO MÉTODO DE SOLUÇÃO SALINA CONCENTRADA

Após exame clínico, todos os participantes foram submetidos à coleta de aproximadamente 10 mililitros de sangue venoso periférico em tubos contendo o anticoagulante EDTA. Posteriormente o DNA genômico foi extraído dos leucócitos a partir do sangue total por meio do método de solução salina concentrada.

O método de extração de DNA (Miller e cols., 1988) encontra-se detalhado no Anexo 7.

3.5.2- AMPLIFICAÇÃO DO DNA PELA TÉCNICA DE REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR):

Realizamos a amplificação do *5-HTTLPR* a partir da técnica de PCR (*polimerase chain reaction*), descrita por Seiki e cols. (1988), que consiste na replicação “in vitro” de fragmentos específicos de DNA pela enzima *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polimerase. Para isso são utilizados pares de *primers* (oligonucleotídeos iniciadores), ou seja, sequências curtas de oligonucleotídeos (18-22), complementares às regiões 5' e 3', que delimitam o segmento de DNA a ser amplificado e funcionam como os iniciadores da reação. O método é programado para permitir a amplificação seletiva de uma sequência alvo de DNA a partir de uma

coleção heterogênea de sequências de DNA.

A amplificação pelo método de PCR consiste nos seguintes passos:

1. Desnaturação (separação da fita dupla) do DNA a 94°C ou 95°C;
2. Anelamento dos iniciadores - os *primers* formam híbridos com o DNA nas regiões de sequência complementar. A temperatura de anelamento é variável para cada par de iniciador;
3. Extensão da fita de DNA a partir dos *primers* anelados pela taq polimerase - após o anelamento, o material é aquecido até 72°C, temperatura ideal para a atividade da Taq polimerase. E, assim, os deoxi-nucleotídeos trifosfato (dNTPs) são incorporados aos *primers*, formando uma nova fita de sequência complementar à fita molde;
4. Repetição das etapas um a três. Estas etapas são repetidas geralmente entre 25 a 35 vezes. A cada ciclo sucessivo, duplica-se a quantidade de DNA sintetizada no ciclo anterior, resultando em um acúmulo exponencial (2^n) dos fragmentos a serem amplificados, em que n representa o número de ciclos;
5. Extensão final: esta etapa de incubação prolongada tem por objetivo assegurar que toda a população de DNA amplificada encontre-se como uma fita dupla e de tamanho completo;
6. Incubação a 4°C até análise dos resultados.

Desde que se utilizem condições adequadas, o produto de amplificação obtido é bastante específico para a região do DNA genômico a ser estudada.

Foram utilizados pares de *primers* específicos para gerar fragmentos com 469 pb (deleção) e 512pb (inserção). Os *primers* foram definidos usando o *software Primer 3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), manufaturados pela *Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)* e encontram-se descritos a seguir:

- *Primer 5-HTTLPR F*: 5'→3': CCG CTC TGA ATG GCA CCT AAC
- *Primer 5-HTTLPR R*: 5'→3': AGA GGA CTG AGC TGG ACA ACC AC

O DNA foi amplificado em volume final de 25µl de reação contendo: de 100 a 200 ng de DNA, 0.75 mM de dNTPs (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 10 picomoles de cada *primer*, 1.0 µl da enzima *Taq DNA* polimerase e, 10 % de volume final de tampão de incubação (tampão IIB).

As soluções utilizadas para a reação de PCR encontram-se descritas no

anexo 8.

A amplificação foi realizada em um termociclador (*Mastercycle gradient thermocycler, Eppendorf AG, Hamburg*) com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94°C durante 45 segundos, anelamento a 65°C durante 1 minuto, extensão a 72°C por 60 segundos e, uma extensão final com duração de 10 minutos a 72° C.

Para cada reação foi feito um controle negativo, contendo todos os componentes da reação, exceto a amostra de DNA.

A amplificação dos fragmentos de PCR foi confirmada através da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (figura16).

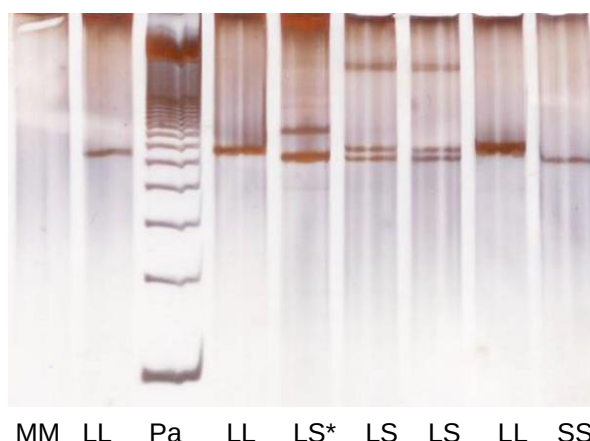


Figura 16: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida do PCR de 5-HTTLPR.

As bandas são identificadas de acordo com o número de pares de base após migração no gel.

MM (*master mix*): controle negativo; Pa: padrão; S: alelo curto; L: alelo longo; LS*: heterozigoto super longo/curto.

3.5.3- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE):

A eletroforese em gel de poliacrilamida consiste na migração do fragmento de DNA através de uma matriz inerte, sob a ação de um campo elétrico. A matriz é um polímero de acrilamida que confere resistência suficiente ao meio, dificultando a mobilidade do DNA em relação ao seu tamanho, sendo capaz de separar fragmentos de até 1 Kb. Foi utilizado gel na concentração de 6.5% para obter uma faixa de separação de 50-100 pares de bases, abrangendo a faixa de tamanho dos fragmentos em estudo.

Seis microlitros de cada produto de PCR, misturados a 1 µl de tampão de

corrida (*gel loading buffer*) foram aplicados em cada canaleta do gel. Foi aplicado em uma canaleta do gel, 1.0 µl de padrão de peso molecular (100 pb DNA *ladder* 0.06 µg/µl- Gibco BRL) para determinação do peso molecular do fragmento amplificado. A corrida foi realizada em tampão TBE 1X pH 8.3 a 100 V, durante cerca de 50 minutos, em gel de 8 x 10 x 0.75 cm , utilizando-se uma cuba específica (*mini vertical gel eletrophoresis unit, Sigma*) (Maniatis e cols., 1982).

As soluções utilizadas na eletroforese em gel de poliacrilamida encontram-se descritas no anexo 9.

3.5.4- COLORAÇÃO PELA PRATA:

Após o término da corrida, o gel foi submetido à coloração pela prata para visualização do material amplificado (adaptação do método descrito por Bassam e cols., 1991). Esse método baseia-se na capacidade da prata se ligar ao DNA fixo em uma matriz, sendo posteriormente oxidada, produzindo uma coloração que vai do amarelo escuro ao preto e permitindo a identificação de fragmentos de DNA que migram no gel, de acordo com o seu peso molecular.

O protocolo de coloração pela prata encontra-se descrito na tabela 10.

Tabela 10: Protocolo de coloração pela prata:

Soluções	Tempo	Condições
1. Ácido acético	10 minutos	Sob agitação
2. Solução de prata *	10 minutos	Sob agitação
3. Água destilada	30 segundos - 2vezes	Sob agitação
4. Revelador**	Até coloração aparecer	Sob agitação
5. Ácido acético	5 minutos	Agitação opcional
6. Água destilada	5 minutos	Agitação opcional
7. Secar em papel celofane	12-24 horas	

*8ml de solução de nitrato de prata: 20,38 mg/ml, 75 µl de formaldeído 37%, 50 ml de água destilada. **1,5 g de carbonato de sódio, 75 µl de formaldeído 37%, 20 µl de tiosulfato de sódio e 50 ml de água destilada.

As soluções utilizadas na coloração pela prata encontram-se descritas no Anexo10.

3.5.5- PCR - ANÁLISE DO TAMANHO DO FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (PCR – *restriction fragment length polymorphism* – RFLP)

Após a amplificação do segmento de interesse, realizamos a reação de digestão dos produtos de PCR com a enzima de restrição Hpa II com o objetivo de separar os fragmentos e definir os produtos finais através do tamanho das bandas. Posteriormente, realizamos a análise dos fragmentos resultantes através de PAGE.

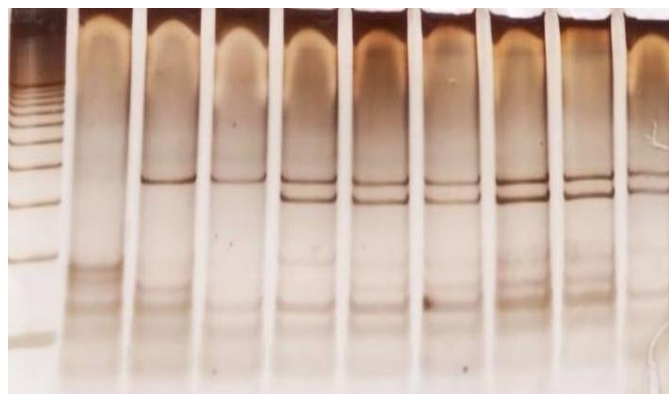
A desoxirribonuclease Hpa II é uma enzima de restrição proveniente do *Haemophilus parainfluenzae*. Reconhece e cliva o DNA nas sequências C/CGG e GGC/C.

Realizamos a reação de digestão para um volume final de 20µL, sendo 9.3µL de produto de PCR, 7 unidades de enzima (Hpa II, 10.000u/ml, New England Biolabs, Ipswich, MA), 2µL de tampão específico da enzima (fornecido pelo fabricante) e 8µL de água bidestilada. A seguir, o produto é incubado a 37° C durante 10 horas em termociclador (*Mastercycle gradient thermocycler, Eppendorf AG, Hamburg*) e, posteriormente sofre inativação pelo calor a 65°C durante 20 minutos (Nakamura e cols., 2000; Wendland e cols., 2006).

O tampão específico da enzima, fornecido pelo fabricante, encontra-se descrito no anexo 8.

Os produtos da reação de digestão são visualizados em gel de poliacrilamida 6.5% corados pela prata (figura 17).

- La: 62 pb, 127pb e 340pb;
- Lg: 62pb, 127pb, 166pb e 174bp;
- S: 62pb, 127pb e 300pb.



Pa LgLg LaLa LaLa LaS LaS LaS LaS LaS LaS

Figura 17: Gel de Poliacrilamida do RFLP de trialélico do 5-HTTLPR.

Pa: padrão; LaS: alelo longo/alelo curto; LaLa: alelo longo/alelo longo; LgLg: alelo mutante (Lg) - funcionalmente semelhante a S (alelo curto).

3.5.6- PCR EM TEMPO REAL (*Real time PCR*):

O *Real time PCR* (PCR em tempo real) é uma técnica de biologia molecular baseada na reação de PCR convencional que é usada para amplificar e, simultaneamente quantificar a molécula alvo de DNA. Possibilita tanto a detecção quanto a quantificação de uma ou mais seqüências específicas de amostra de DNA.

O procedimento segue os mesmos princípios gerais do PCR. Diferente do PCR convencional onde o produto é detectado ao final da reação, no *Real time PCR* o DNA é detectado enquanto a reação progride em tempo real.

Utilizamos a técnica de detecção dos produtos de DNA através de sondas (*probes*) específicas que consistem de oligonucleotídeos ligados a um revelador fluorescente que permite a detecção somente após hibridização da sonda (*probe*) com a fita de DNA complementar. Desta forma, a sonda fluorescente aumenta significativamente a especificidade e possibilita a quantificação do DNA (Livak e cols., 1995).

Para estudo dos polimorfismos dos genes *BDNF*, *COMT* e *APO E* realizamos a genotipagem através de PCR em tempo real.

A reação de PCR foi preparada com 1µL de DNA (50ng/µL); 0.1µL do ensaio de TaqMan e 3.9µL de *green ou red mix*, num total de 5µL de reação de (PCR) por amostra. As sondas foram fornecidas pela Applied Biosystems Inc. (Foster, CA). A reação de PCR foi realizada com um ciclo de 5 minutos de desnaturação a 95°C, 60

ciclos de anelamento e extensão cada um deles com 30 e 15 segundos. As reações foram realizadas em equipamento de PCR em tempo real (*Stratagene Mx3005, La Jolla, CA*).

Os produtos das reações de PCR foram analisados no modo de discriminação de alelos no mesmo equipamento. A discriminação dos alelos foi obtida (*MxPro QPCR- Software, 2007*) usando *TaqMan 5'-exonuclease assay* (Livak e cols., 1995).

Para controle da qualidade dos nossos resultados, o procedimento foi repetido em 10% da amostra selecionada aleatoriamente. Em cada placa com 96 amostras havia pelo menos três controles negativos para cada marcador utilizado. Os resultados foram analisados e comparados por pelo menos dois observadores diferentes.

3.5.7- ENSAIOS DE *TaqMan*

O *TaqMan*® é um tipo de ensaio fornecido pela ABI (*Applied Biosystems Inc., Foster, CA*) nas versões *assay-on-demand* e *assay-by-design* constituído por dois pares de oligonucleotídeos: *forward* e *reverse* (oligonucleotídeos na concentração de 900 µM), um marcador - 1 VIC® dye – detecta a presença do alelo 1 (marcadores com concentração final de 200µM), um marcador 2 FAM™ dye – detecta a presença do alelo 2 (marcadores com concentração final de 200 µM). A figura 18 mostra o resultado de PCR em tempo real.

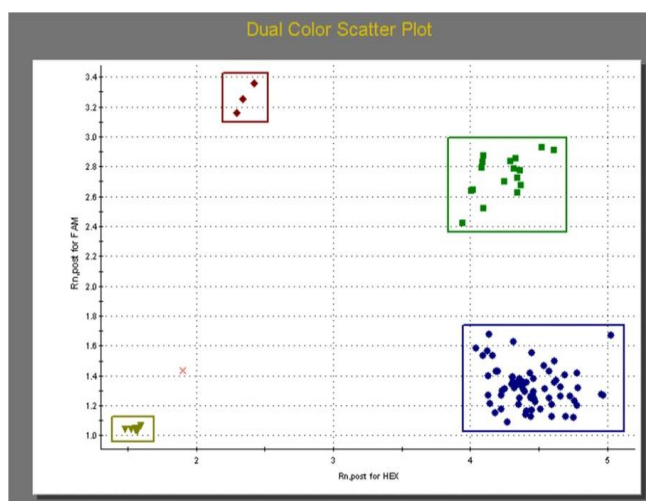


Figura 18: Resultado de PCR em tempo real.

Fluorescências: FAM em vermelho; VIC em azul e em verde o heterozigoto. Em amarelos, os controles negativos. O x corresponde à amostra sem fluorescência adequada para análise.

Nas tabelas (tabelas 11, 12, 13) a seguir, demonstramos as sequências correspondentes aos SNPs estudados e suas respectivas sondas.

Tabela 11: Polimorfismos do *BDNF*:

SNP e sonda <i>BDNF</i>	Sequência, polimorfismo e posição.
<i>rs7124442</i> C__27833027_10	AAGGAAGCTGCATAAAGTTGACATA[C/T]AGCAGATATTC CAAGCATTCCTTAC C: alelo ancestral. Cr. 11 - 27633617
<i>rs6265</i> (C__11592758_1 0)	TCCTCATCCAACAGCTCTTCTATCA[C/T]GTGTTCGAAAG TGTCAGCCAATGAT G: alelo ancestral. Cr. 11 - 27636492

Cr. – cromossomo

Tabela 12: Polimorfismo funcional da *COMT*:

SNP e sonda <i>COMT</i>	Sequência e polimorfismo
<i>rs 4680</i> C__25746809_50	CCAGCGGATGGTGGATTTCGCTGGC[A/G]TGAAGGACAAG GTGTGCATGCCTGA. G: alelo ancestral. Cr. 22 - 18331271

Cr. – cromossomo

Tabela 13: Polimorfismos da *APOE*:

SNP e sonda <i>APO E</i>	Sequência e polimorfismo
<i>rs429358</i> C__3084793_20	GGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTG[C/T]GCGGC CGCCTGGTGCAGTACCGCGG Alelo ancestral: T. Cr.: 19 - 1945411941
<i>rs7412</i> C__9045973_10	TCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAG[C/T]GCCTGG CAGTGTACCAGGCCGGGGC Alelo ancestral: C. Cr.: 19 - 1945412079

Cr. – cromossomo

3.6- ANÁLISE DOS DADOS

Após coletadas, as informações foram inseridas em um banco de dados desenvolvido utilizando-se o software Access® versão 2007 e os dados, posteriormente foram exportados para o Excel®. Os resultados descritivos apresentados foram obtidos utilizando frequências e porcentagens para as características das covariáveis categóricas e obtenção de medidas de tendência central (média e mediana) e medidas de dispersão (desvio-padrão) para as quantitativas.

As comparações entre as variáveis (controle, depressão de início tardio, DA e DA com BPSD) e covariáveis na forma categórica foram feitas a partir de tabelas de contingência sendo aplicado o teste qui-quadrado com correção de Yates para comparação de proporções quando existiam apenas duas categorias em cada variável. Caso existisse mais que duas categorias utilizamos o teste qui-quadrado de Pearson. Na presença de pelo menos uma frequência esperada menor do que 5 foi utilizado o teste exato de Fisher.

Na comparação entre as variáveis e as covariáveis quantitativas foi utilizado o teste t-Student quando as suposições usuais do modelo foram atendidas. Caso contrário foi utilizado o teste de Mann-Whitney. As suposições do teste t-Student foram verificadas utilizando o teste de Shapiro-Wilk e Levene (Triola, 1999).

A análise dos resultados das genotipagem foi realizada através de análise univariada utilizando o qui-quadrado para avaliar a associação entre os alelos e genótipos *5-HTTLPR*, *COMT*, *APOE* e *BDNF*. Para a *APOE* e o *BDNF* realizamos também análise de haplótipos. Utilizamos os softwares Unphased versão 3.0 (www.mrc-bsu.cam.ac.uk/personal/frank/software/unphased/) e Haploview 5.0 (<http://www.broadinstitute.org/>) para análise de frequências genotípica e alélica e análise de haplótipos. Para verificação da veracidade dos resultados, foi aplicada análise de permutação em todos os modelos. Utilizamos o programa SPSS® versão 16.0 modelo de análise LOGIT para avaliar as associações entre covariáveis clínicas e sócio-demográficas com as covariáveis genotípicas, comparadas às variáveis do estudo.

Para obter análise das interações genéticas (epistasia) estimamos o ganho de interação entre os SNPs, de acordo com a descrição de Moore (2004). Acurácia, sensibilidade, especificidade e precisão foram analisadas através de um sistema de

validação cruzada entre 10 modelos. O *software Multifactor Dimensionality Reduction* (MDR) version 2.0 beta 7.2 (www.sourceforge.net/projects/mdr/) foi utilizado para aplicação da análise estatística. Neste modelo também aplicamos a análise de permutação.

RESULTADOS

Participaram do estudo 406 indivíduos, que foram divididos de acordo com o diagnóstico em quatro grupos: controle, depressão maior de início tardio e DA com e sem BPSD. Realizamos análise comparativa entre os controles e cada um dos demais grupos, com relação às covariáveis sócio-demográficas (gênero, escolaridade, estado civil, idade e número de fatores psicossociais), clínicas (HAS, DM, dislipidemia, DAC, depressão e FA) e os polimorfismos funcionais de 5-*HTTLPR*, *BDNF*, *APOE* e *COMT*.

4.1- CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA:

Nossa amostra foi constituída por 406 indivíduos pertencentes a quatro grupos (tabela 14): controle (97 indivíduos); pacientes portadores de depressão maior de início tardio (DIT) (140 indivíduos) e, pacientes portadores de demência de Alzheimer (169 indivíduos). Destes, 75 pacientes não apresentam BPSD e 94 são portadores de BPSD (56% dos portadores de DA). Dentre os portadores de BPSD, 53 pacientes (40 mulheres e 13 homens) apresentavam depressão como sintoma psiquiátrico associado à doença e 41 apresentavam outros sintomas de BPSD. Do total de participantes (406), foi possível realizar a genotipagem *do 5-HTTLPR* em apenas 322 indivíduos. Esta amostra foi constituída por 119 portadores de depressão de início tardio, 120 portadores de DA (45 com DA sem BPSD, 75 com DA com BPSD, sendo 45 com depressão) e 83 controles.

Tabela 14: Proporção de indivíduos participantes divididos de acordo com o gênero:

Gênero	Controles n (%)	Depressão início tardio n (%)	Doença de Alzheimer		
			Total n (%)	DA sem BPSD n (%)	DA com BPSD n (%)
Ambos	97	140	169	75	94
Feminino	67 (69)	110 (78)	120 (71)	49 (65)	71 (75,5)
Masculino	30 (31)	30 (21)	49 (29)	26 (35)	23 (24,5)

DA: doença de Alzheimer; BPSD: sintomas comportamentais e psiquiátricos da doença de Alzheimer; n: número absoluto; %: porcentagem de indivíduos.

Com relação às características sócio-demográficas, a amostra foi analisada para as seguintes covariáveis: gênero, escolaridade, estado civil e idade. Na análise comparativa da amostra global observamos maior porcentagem de indivíduos do

sexo feminino (72.9%), com escolaridade entre zero a quatro anos de estudo (81.9%), casados (53.6%) e com idade entre 75 e 84 anos (50.0%). A média de idade da amostra como um todo foi de 77.9 anos com desvio padrão (DP) de 7.4 anos, variando entre 61 e 98 anos.

Não houve diferença estatística entre a média de idade do grupo controle em relação aos grupos DA e depressão maior de início tardio, separados por gênero (tabela 15). Ressaltamos que consideramos como idade do indivíduo aquela relacionada à data do diagnóstico de DA ou depressão, e não a idade cronológica. No grupo controle, foi considerada a idade baseada na data de inclusão dos participantes no estudo (data de aplicação dos questionários).

Tabela 15: Resultados das comparações das variáveis sócio-demográficas entre os grupos do estudo (valores de p):

Fenótipo	DIT x Controle	DA x Controle	DA BPSD x Controle
Idade	0.161	0.378	0.404
Escolaridade	0.621	0.003	0.469
Estado civil	0.471	0.675	0.190

DIT: depressão de início tardio; DA: doença de Alzheimer. BPSD: sintomas comportamentais e psicológicos da demência. Marcações em negrito quando $p < 0.05$.

Com relação à baixa escolaridade da população, esclarecemos que o Instituto Jenny de Andrade Faria de Atenção à Saúde do Idoso HC atende uma população de baixa renda e com menor acesso à educação básica.

Observamos que baixa escolaridade associa-se a DA ($p=0.003$). A baixa escolaridade estava presente nas mulheres portadoras de DA ($p=0.002$), mas não nos homens ($p=0.358$). Como o número de participantes do sexo masculino corresponde a apenas 24.5% da amostra, acreditamos que caso este número fosse maior, o padrão de baixa escolaridade tenderia a se manter.

Com relação ao estado civil, não houve diferença significativa quando comparamos o grupo controle com DA e depressão de início tardio. Entretanto, o diagnóstico de depressão de início tardio foi significativamente mais frequente em homens casados ($p=0.004$) do que em outras categorias.

4.2- EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG (HWE)

Foi realizado screening para equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE)²⁴ em toda a amostra para os seis SNPs *rs7124442* e *rs6265* do *BDNF*, *rs429358* e *rs7412* da *APOE*, *rs4680* da *COMT* e *5-HTTLPR* para todas as variáveis analisadas e na amostra global (tabela 16).

Considerando-se o grupo controle, *rs7124442* e *rs6265*, ou seja os SNPs relacionados ao *BDNF*, encontram-se em proporções inadequadas (valores-p > 0.05), ou seja, o valor observado difere com significância estatística do valor esperado, calculado a partir da equação de HWE. Observa-se ainda que, para os pacientes com Alzheimer com e sem BPSD todos os SNPs encontram-se em proporções adequadas, exceto *rs7412*. Ao subdividirmos este grupo, observamos que essa diferença estatística estava presente apenas no grupo de pacientes portadores de DA com BPSD (incluindo depressão) (HWE para DA: 0.072 e HWE para DA com BPSD<0.001). No grupo de pacientes com depressão início tardio observamos que *rs4680* apresenta desvio do HWE (p=0.011).

Tabela 16: Equilíbrio de Hardy-Weinberg da amostra para todos os marcadores (valores de p):

Marcador	HWE Controles (p)	HWE DA (p)	HWE DA BPSD (p)	HWE DIT (p)	Total (p)
<i>rs7124442</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
<i>rs6265</i>	0.014	0.266	0.58	<0.001	<0.001
<i>rs429358</i>	0.447	0.939	0.945	0.729	0.119
<i>rs7412</i>	0.516	<0.001	<0.001	0.503	0.248
<i>rs4680</i>	0.971	0.956	0.731	0.011	0.150
<i>5-HTTLPR</i>	0.117	0.915	0.831	0.089	0.150

HWE: Hardy-Weinberg Equilibrium; DA- Doença de Alzheimer; BPSD: sintomas comportamentais e psicológicos da demência; DIT: depressão de início tardio; p: valor de p. Total: se refere ao HWE em relação ao total da amostra. Marcações em negrito quando p<0.05.

²⁴ Equilíbrio de Hardy-Weinberg - afirma que, em uma população mendeliana, dentro de determinadas condições ideais, as frequências alélicas permanecerão constantes nas gerações subsequentes. As condições necessárias para se manter o HWE são: a população é grande; os casamentos são aleatórios; todos os membros da população são igualmente férteis; não há efeito de seleção natural; não há taxas de mutações apreciáveis; não ocorrem mutações gerando novos alelos.

4.3- RESULTADOS DA GENOTIPAGEM:

Com relação aos polimorfismos funcionais estudados, realizamos análise da distribuição alélica e genotípica de todos os SNPs estudados e de haplótipos entre os SNPs do *BDNF* e da *APOE*. Estudamos também, as interações entre os diversos SNPs. Todos os resultados foram testados por análise de permutação. A tabela 17 resume os alelos dos SNPs estudados.

Tabela 17: Resumo dos SNPs e respectivos alelos:

Alelos	BDNF		APOE		COMT	5-HTTLPR
	rs7124442	rs6265	rs429358	rs7412	rs4680	(trialélico)
Ancestral	C	G	T	C	G	La
Polimorfo	T	A	C	T	A	Lg, S

SNPs: *Single Nucleotide Polymorphism* (polimorfismo de nucleotídeo único)

Na análise da frequência alélica, ao compararmos os indivíduos portadores de depressão de início tardio com os controles, observamos que nenhum marcador apresentou associação com a doença. Ao compararmos os indivíduos portadores de DA com os controles, observamos que *rs429358* apresenta associação com a doença, sendo o alelo C responsável pela maior frequência entre os casos ($p=5.19638e-007$), sugerindo associação da *APOE* com a doença. Esses dados foram testados através da análise de haplótipos. Com relação aos pacientes portadores de DA BPSD também houve uma associação significativa da doença com o alelo C do *rs429358* ($p=0.0004656$) e com o alelo C do *rs7412* ($p=0.042$).

Quanto às frequências genotípicas, comparamos os resultados entre os grupos DA e depressão de início tardio com os controles, separados por gênero (tabela 18). Na depressão de início tardio observamos que o genótipo CT do *rs7124442* (*Tag SNP*) foi mais frequente nos pacientes com depressão do que nos controles ($p=0.019$), mas apenas em mulheres ($p=0.025$). Provavelmente, essa diferença não foi observada nos homens em função do pequeno número de indivíduos. Não foi observada associação com o polimorfismo funcional do *BDNF*, *rs6265*. Na DA, o genótipo CC de ambos os marcadores da *APOE* se associaram à doença. E, homens portadores de DA apresentaram o genótipo LaLa do 5-HTTLPR com maior frequência do que os indivíduos pertencentes ao grupo controle

($p=0.041$). Esta relação entre o alelo longo do *5-HTTLPR* também foi observada nos indivíduos portadores de DA com BPSD do sexo masculino ($p=0.021$). A associação de DA com *5-HTTLPR* estava presente apenas no grupo de pacientes que apresentava depressão como sintoma psicológico da DA. Também, observamos relação entre CC de ambos os alelos da *APOE* na DA associada à BPSD. Entretanto, os alelos da *APOE* devem ser analisados em conjunto, através da análise dos haplótipos e não de forma isolada.

Com relação à distribuição genotípica, não observamos associação entre o polimorfismo da *COMT* e as doenças estudadas.

Tabela 18: Comparação dos resultados das distribuições genotípicas dos grupos depressão de início, DA e DA com BPSD comparados ao grupo controle:

Fenotipo	Sexo	<i>BDNF</i>		<i>APOE</i>		<i>COMT</i>	<i>SLC6A4</i>
		<i>rs7124442</i>	<i>rs6265</i>	<i>rs429358</i>	<i>rs7412</i>	<i>rs4680</i>	5-HTTLPR
DIT (DIT x controle)	Ambos	0.019	0.831	0.933	0.422	0.222	0.882
	Homens	0.344	0.551	0.823	0.321	0.780	0.901
	Mulheres	0.025	0.999	0.884	0.588	0.259	0.892
DA (DA x controle)	Ambos	0.093	0.258	0.000009	0.045	0.999	0.407
	Homens	0.372	0.575	0.055	0.045	0.921	0.041
	Mulheres	0.218	0.423	0.00008	0.201	0.962	0.985
DA BPSD (DA BPSD x controle)	Ambos	0.334	0.234	0.1282	0.0148	0.608	0.715
	Homens	0.442	0.335	1.0	0.0284	0.712	0.021
	Mulheres	0.562	0.387	0.0028	0.0560	0.913	0.917

DA: Doença de Alzheimer; BPSD: sintomas comportamentais e psicológicos da demência; DIT: depressão de início tardio. Marcações em negrito quando $p<0.05$.

Realizamos a análise de haplótipos entre os *rs7124442* e *rs6265* do *BDNF* e *rs429358* e *rs7412* da *APOE* para os grupos DA, DA com BPSD e DIT comparados aos controles (tabelas 19, 20 e 21). Com relação à DA, observamos que a *APOE* ε4 está associada à doença ($p=0.0000025$) e aumenta em três vezes o risco ($OR=3.2$) para desenvolver a doença. O alelo 3 é um fator de proteção ($p=0.0002841$; $OR=0.451$; IC: 0.292-0.698) e existe uma tendência do alelo 2 apresentar um efeito protetor para a doença ($p=0.066$). No grupo portador de BPSD também observamos que o alelo 4 da *APOE* ($p=0.0005$, $OR=12.04$, IC: 1.75-39.93) está associado à doença.

Tabela 19: Análise haplótipo *BDNF* rs7124442 e rs6265; rs429358 e rs7412 DA comparada aos controles:

SNP	Hap	APOE	Freq. Controle	Freq. DA	P	X ²	OR	95% Intervalo de confiança da O.R.	
<i>BDNF</i> : rs7124442 rs6265	CG		0.447	0.486	0.3767448	0.781	1.173	0.823	1.672
	TG		0.368	0.375	0.8764631	0.024	1.029	0.714	1.484
	CA		0.141	0.120	0.4875950	0.482	0.832	0.494	1.400
	TA		0.045	0.019	0.0861821	2.944	0.414	0.147	1.168
<i>ApoE</i> : rs429358 rs7412	TT	alelo 3	0.825	0.675	0.0002841	13.173	0.451	0.292	0.698
	CC	alelo 4	0.113	0.289	0.0000025	22.192	3.210	1.942	5.306
	TC	alelo 2	0.062	0.029	0.0660066	3.380	0.453	0.191	1.075

p: valor de p. Marcações em negrito quando p<0.05; SNP: polimorfismo de nucleotídeo único; Hap: haplótipo; Freq. Controle: frequência nos controles; Freq. DA: frequência na Doença de Alzheimer; X²: qui-quadrado; OR: Odds Ratio.

Tabela 20: Análise haplótipo *BDNF* rs7124442 e rs6265; rs429358 e rs7412 DA BPSD comparada aos controles:

SNP	Hap	APOE	Freq. Controle	Freq. DA BPSD	P	X ²	Odds Ratio	95% Intervalo de confiança da O.R.	
<i>BDNF</i> rs7124442 rs6265	CG		0.447	0.520	0.137	2.216	1.51	0.78	2.94
	TG		0.368	0.357	0.801	0.063	1.27	0.65	2.49
	CA		0.141	0.107	0.281	1.159	1.0	-	-
	TA		0.045	0.015	0.096	2.778	2.13	0.43	0.80
<i>ApoE</i> rs429358 rs7412	TT	alelo 3	0.825	0.734	0.02	5.088	3.45	0.736	1.984
	CC	alelo 4	0.113	0.245	0.0005	12.04	8.36	1.75	39.93
	TC	alelo 2	0.062	0.016	0.048	3.91	1.0	-	-

p: valor de p. Marcações em negrito quando p<0.05; SNP: polimorfismo de nucleotídeo único; Hap: haplótipo; Freq. Controle: frequência nos controles; Freq. DA: frequência na Doença de Alzheimer; X²: qui-quadrado; OR: Odds Ratio.

Tabela 21: Análise haplótipo *BDNF* rs7124442 e rs6265; rs429358 e rs7412 DIT comparada aos controles:

SNP	Hap	APOE	Freq. Controle	Freq DIT	P	X ²	Odds Ratio	95% Intervalo de confiança da O.R.
<i>BDNF</i>	CG		0.447	0.443	0.883	0.022	0.973	0.673 1.406
<i>rs7124442</i>	TG		0.368	0.347	0.682	0.168	0.923	0.630 1.353
<i>rs6265</i>	CA		0.141	0.129	0.767	0.088	0.922	0.539 1.578
	TA		0.045	0.082	0.141	2.166	1.795	0.816 3.952
<i>ApoE</i>	TT	alelo 3	0.825	0.845	0.453	0.563	1.209	0.736 1.984
<i>rs429358</i>	CC	alelo 4	0.113	0.101	0.685	0.164	0.885	0.491 1.597
<i>rs7412</i>	TC	alelo 2	0.062	0.048	0.505	0.444	0.762	0.341 1.700

p: valor de p. Marcações em negrito quando $p < 0.05$; SNP: polimorfismo de nucleotídeo único; Hap: haplótipo; Freq. Controle: frequência nos controles; Freq. DA: frequência na Doença de Alzheimer.

Por fim, realizamos análise de interação entre os genes através do *Multifactor Dimensionality Reduction* (Moore e cols., 2006; Ritchie e cols., 2001). Na DA, observamos interação sinérgica entre *rs6265* e *rs7124442* e, *rs6265* (GG) e *rs429358* (CC). A primeira interação não apresenta significância estatística ($p=0.057$) e a segunda apresenta significância limítrofe ($p=0.049$). A interação entre *rs429358* e *rs7124442* é redundante²⁵ (figura 19).

A tabela 22 mostra os valores de acurácia, consistência e valor de “p” do melhor modelo encontrada em cada uma das interações, após análise de permutação.

Na análise de DA com BPSD observamos interação sinérgica entre *rs7124442* (CT) e LaLa do 5-HTTLPR ($p=0.011$) (figura 20 e tabela 22).

Na depressão, tanto as interações entre *rs7124442* e *rs6265* quanto entre *rs4680* e 5-HTTLPR são sinérgicas e apresentam significância estatística. O ganho de interação entre *rs7124442* (TT) e *rs6265* (AA) é maior do que entre *rs4680* (CT) e 5-HTTLPR (LaS, LaLg) (figura 21 e tabela 22).

²⁵ No dendograma do MDR, sinergia denota situação na qual a interação, baseada em entropia, entre os dois SNPs promove mais informação do que a correlação entre o par. E, redundância refere-se à situação na qual a interação, baseada em entropia entre os dois SNP, promove menos informação do que a correlação entre os pares.

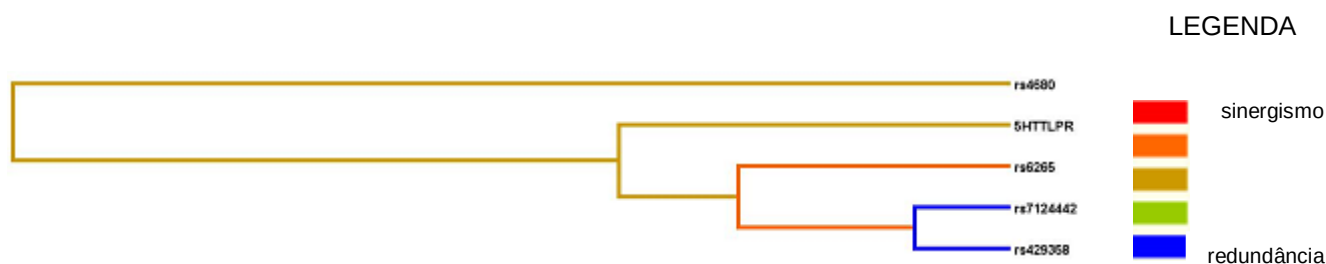


Figura 19: Dendrograma da interação gene-gene DA comparado com controles.

O dendrograma gerado pelo MDR mostra a interação entre os SNPs na comparação entre DA (Doença de Alzheimer) e controle. As cores da legenda compreendem um espectro representando a transição de sinergismo para redundância. Observam-se as seguintes interações: redundante entre *rs7124442* e *rs429358* e sinérgica entre *rs6265* e *rs429358* e *rs7124442*.

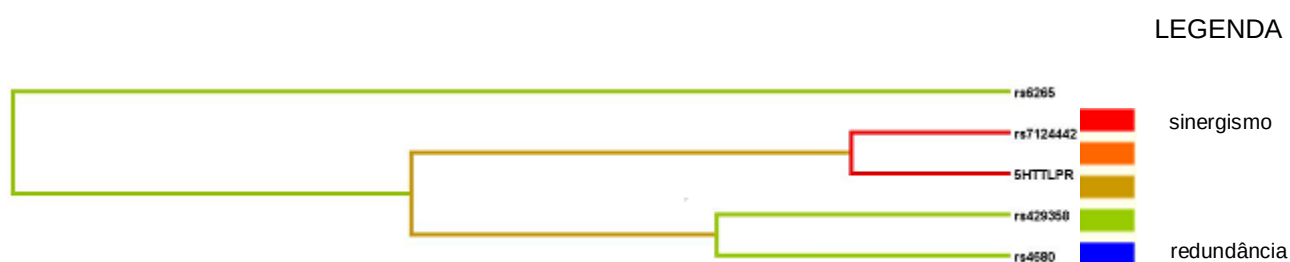


Figura 20: Dendrograma da interação gene-gene DA com BPSD comparado com controles.

O dendrograma gerado pelo MDR mostra a interação entre os SNPs na comparação entre DA (Doença de Alzheimer) e controle. As cores da legenda compreendem um espectro representando a transição de sinergismo para redundância. Observam-se interação sinérgica entre *rs7124442* e *5-HTTLPR*.



Figura 21: Dendrograma da interação gene-gene DIT comparado com controles.

O dendrograma gerado pelo MDR mostra a interação entre os SNPs na comparação entre depressão de início tardio (DIT) e controle. As cores da legenda compreendem um espectro representando a transição de sinergismo para redundância. Observa-se interação sinérgica entre *rs7124442* e *rs6265* e entre *rs4680* e *5-HTTLPR*, porém de menor intensidade.

Tabela 22: Resultados das interações genéticas pelo MDR, após análise de permutação.

Interação genética (melhor modelo)	Acurácia (%)	Consistência	Valor de p (após permutação)
DA	0.6220	10/10	0.057
<i>rs6265/rs7124442</i>			
DA	0.6251	10/10	0.049
<i>rs6265/rs429358</i>			
DA BPSD	0.6712	10/10	0.011
<i>rs7124442/5-HTTLPR</i>			
DIT	0.6422	10/10	0.011
<i>rs6265/ rs7124442</i>			
DIT	0.6453	10/10	0.008
<i>rs4680/5-HTTLPR</i>			

DA: doença de Alzheimer; DA BPSD: doença de Alzheimer com sintomas comportamentais e psicológicos; DIT: depressão de início tardio. Valores em negrito representam significância estatística.

4.4- RESULTADOS DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E PSICOSSOCIAIS DOS GRUPOS ASSOCIADAS À GENOTIPAGEM:

No grupo de indivíduos portadores de depressão algumas covariáveis foram consideradas como estatisticamente significativas quando comparados ao grupo controle:

- A depressão foi mais frequente no sexo feminino ($p=0.025$);
- Número de fatores ambientais (ou eventos estressores de vida) - maior ou igual a 4 correlacionou-se com aumento do risco de depressão ($p=0.0001$);

No grupo de portadores de DA, as covariáveis que se correlacionaram com a doença foram:

- História de depressão ($p< 0.0001$) – neste caso, história prévia de depressão, de início precoce ou tardio;
- Presença do alelo $\epsilon 4$ da *APOE* ($p=0.01$), tanto na presença quanto na ausência de BPSD. Os indivíduos carreadores do alelo $\epsilon 4$ apresentavam início dos sintomas da doença mais precocemente do que aqueles que eram carreadores dos alelos 3 ou 2.

No grupo portador de DA com BPSD foram consideradas significativas do ponto de vista estatístico, as seguintes co-variáveis:

- Presença do alelo $\epsilon 4$ da *APOE* ($p < 0.0001$). Também observamos início mais precoce da doença no grupo de carreadores do alelo $\epsilon 4$;
- Diabetes melitus (0.015);
- Depressão ($p < 0.0001$)- início precoce ou início tardio;
- Dislipidemia ($p < 0.03$);
- Número de fatores psicossociais - maior ou igual a 4 correlacionou-se com aumento do risco para DA com BPSD ($p = 0.019$);

DISCUSSÃO

Mais de 100 anos após sua primeira descrição, a Doença de Alzheimer se tornou a mais frequente e ameaçadora doença demencial e neurodegenerativa em todo o mundo. No atual momento, são necessárias novas estratégias para o diagnóstico precoce e acurado da doença, melhora do conhecimento de suas bases genéticas e de biologia molecular assim como, uma definição mais aprimorada da cascata patogênica que culmina no desenvolvimento da doença (Jellinger, 2009). Estudos *post-mortem* demonstram que a concordância entre o diagnóstico clínico e anatomopatológico de DA ocorre em 85% dos casos. Entretanto, o diagnóstico precoce da doença é muitas vezes impossível nos estágios iniciais da doença. E, a concordância entre a impressão clínica inicial e as observações neuropatológicas finais provavelmente é muito menor, em torno de 50%, em função do diagnóstico diferencial com outras doenças, principalmente a depressão. Dessa forma, existe uma grande demanda por maior acurácia diagnóstica da doença, especialmente nos estágios iniciais. Os biomarcadores ligados à fisiopatologia da doença são, portanto, alvos particularmente interessantes neste processo de diagnóstico precoce. À medida que terapêuticas específicas e embasadas em diagnóstico precoce e de certeza são introduzidas, faz-se necessário a utilização de métodos diagnósticos mais precisos, capazes de auxiliar no diagnóstico, monitorizar o tratamento e definir o prognóstico. Considerando-se que o tratamento atual é relativamente ineficaz em modificar o curso clínico da doença, novos biomarcadores devem ser descobertos para que futuras terapêuticas modificadoras da DA sejam introduzidas na prática médica com maior segurança (Sunderland, 2009). Neste contexto, a biologia molecular tem papel fundamental.

A susceptibilidade para a DA esporádica provavelmente relaciona-se a um arranjo comum de alelos de risco distribuídos em diferentes genes. Esses genes regulam várias vias que devem estar envolvidas na produção, agregação e remoção de A β . Embora o número total de genes de risco e sua identificação precisa permaneçam desconhecidos, as evidências sugerem que quando combinados eles apresentam impacto substancial na predisposição para a doença e idade de início dos sintomas. As informações provenientes dos estudos de genética na DA têm guiado o desenvolvimento de algumas terapêuticas promissoras. Sendo assim, existe uma grande expectativa pela definição de novos fatores de risco e/ou modificadores da idade de início que possam melhorar o diagnóstico, o tratamento e a prevenção da doença. Estima-se que o atraso na idade de início em pelo menos

alguns anos pode reduzir substancialmente o número de pacientes com DA nos próximos 50 anos (Bertram & Tanzi, 2008).

Inúmeros fatores de risco para demência têm sido identificados, muitos dos quais potencialmente tratados. Enquanto medidas para debelar os fatores de risco conhecidos estão em desenvolvimento, fatores de risco adicionais necessitam ser explorados. Dentre estes fatores de risco, a depressão merece um destaque especial (Korczyn & Halperin, 2009).

A depressão, assim como a demência, também é uma síndrome clínica bastante heterogênea com relação à sua origem (pós-parto, após trauma, início tardio), manifestações clínicas (unipolar, bipolar) e resposta terapêutica. Representa fonte de sofrimento e incapacidade significativos, especialmente na população idosa. Indivíduos deprimidos apresentam maior vulnerabilidade às doenças vasculares, como DAC e AVE. A demência deveria ser incluída nesta lista, fortalecendo a necessidade de uma intervenção mais agressiva no tratamento da depressão, principalmente em indivíduos idosos (Alexopoulos, Schultz & Barry, 2005; Alexopoulos, 2005; Baldwin e cols., 2005; Ownby e cols., 2006).

A depressão em pacientes idosos frequentemente associa-se à incapacidade cognitiva (“pseudodemência”), especialmente a depressão de início tardio. Nesse sentido, ela pode se apresentar como uma manifestação inicial de demência; pode representar um fator de risco para demência e, por associar-se a doenças crônicas principalmente doença vascular (depressão vascular) pode coexistir como consequência do mesmo processo fisiopatológico (Alexopoulos, 2005; Alexopoulos & Kelly, 2009; Korczyn & Halperin, 2009). A depressão também pode se apresentar como um sintoma psiquiátrico da doença de Alzheimers (BPSD).

Apesar de ambas as entidades serem bastante comuns em idosos, poucos estudos exploram as duas concomitantemente, o que dificulta o entendimento de suas inter-relações.

Nosso estudo envolveu 406 indivíduos, pertencentes a quatro grupos distintos: controle (97 indivíduos), depressão maior de início tardio (140 indivíduos), demência de Alzheimer (169 indivíduos) e DA com BPSD (94 pacientes – sub-grupo da DA) . Nosso objetivo ao delinear este estudo foi examinar as relações genéticas, ambientais e clínicas envolvidas no processo de depressão-demência no idoso.

Trata-se de um estudo de caso-controle e, portanto está sujeito à interferência de fatores externos que apresentam potencial para distorcer seus resultados.

Outra limitação é o tamanho ainda discreto da amostra, dificultando a análise dos endofenótipos.

Nossa amostra apresentou desvio no HWE em relação ao *rs4680*, *rs7412* nos grupos depressão de início tardio e DA (com e sem BPSD), respectivamente. Uma vez que o desvio ocorreu apenas nos grupos acometidos pelas doenças e não nos controles atribuímos este desvio a fatores relativos à própria doença.

Entretanto, com relação ao *rs7124442*, que apresentou desvio de HWE para todos os grupos, inclusive nos controles, acreditamos que este esteja relacionado a alguma característica específica da população estudada. Os desvios do HWE nos controles são comumente indicados como erros de genotipagem, estratificação da população ou outros artefatos e os marcadores são muitas vezes descartados. Recentemente, foram descobertas regiões do genoma humano que contêm desvios do HWE e que abrigam genes que influenciam na sobrevivência embrionária (Vine & Curtis, 2009). Em alguns casos, o desvio de HWE é observado apenas no grupo de pacientes com a doença, sugerindo um possível papel na predisposição à doença (Hollenbach e cols., 2009).

Ressaltamos que a seleção da amostra foi realizada com extremo rigor, com avaliação por mais de um observador diferente, aplicação de questionários com acurácia pré-estabelecida para os diagnósticos e discussão dos casos discordantes e com exclusão dos resultados duvidosos. Esse rigor metodológico reduz o risco das diferenças observadas se deverem a um erro amostral. As análises foram repetidas e os resultados conferidos por mais de um observador treinado no método aplicado para genotipagem o que reduz o risco destes desvios serem decorrentes de erros de genotipagem.

Comparamos o grupo controle com depressão de início tardio e DA. Dentre os portadores de DA, realizamos uma análise comparativa da amostra como um todo e, também dos pacientes DA sem BPSD e DA com BPSD. Nos casos de significância estatística entre DA com BPSD e alguma covariável genética, realizamos a análise no grupo cujo sintoma de BPSD era depressão. Analisando a amostra de pacientes com DA, observamos que a incidência de BPSD está em concordância com a literatura mundial, ou seja, de 40 a 60% dos portadores de DA apresenta BPSD em algum momento da evolução (Sweet e cols., 2003).

Observamos que o número de mulheres foi superior ao de homens em todos os grupos, resultado da maior prevalência de ambas as doenças entre as mulheres, maior taxa de sobrevivência em relação aos homens e maior procura pelos serviços de saúde com aumento das taxas de diagnóstico entre os indivíduos do sexo feminino (Veras, 1994). O risco de depressão ao longo da vida é de 10 a 25% para as mulheres e de 5 a 12% para os homens (Weissman e cols., 1996). Existem evidências de que a deficiência de estrógeno após a menopausa possa contribuir para o desenvolvimento da DA; entretanto os efeitos da terapia de reposição hormonal permanecem controversos. Estudos experimentais sugerem que o estrógeno apresenta inúmeras ações neuroprotetoras relevantes para prevenir a DA, especialmente a promoção da viabilidade dos neurônios e redução do acúmulo de A β . Achados recentes sugerem que a responsividade neural ao estrógeno apresente redução com a idade, minimizando suas ações neuroprotetoras e, conseqüentemente, limitando os efeitos da terapia de reposição hormonal na mulher idosa (Pike e cols., 2009).

Também observamos que o diagnóstico de depressão de início tardio no sexo masculino era mais frequente em homens casados do que naqueles pertencentes a outros estados civis. Entretanto, dados publicados em estudo de levantamento bibliográfico sobre o perfil epidemiológico de idosos portadores de depressão apontou que idosos casados apresentam menor risco de desenvolver quadros depressivos. E, na estratificação por gênero, mulheres casadas apresentaram maior risco do que os homens de ficarem deprimidas. Porém, entre os solteiros, os homens apresentaram maior risco que as mulheres. Três outros estudos não evidenciaram a associação do *status marital* e o aparecimento de depressão ou sintomas depressivos (Pinho, Custódio e Makdisse, 2009). A ocorrência de associação entre a covariável estado civil e a variável depressão apenas no sexo masculino sugere que esta diferença esteja relacionada à seleção da amostra. Provavelmente porque os homens casados são conduzidos para o tratamento com maior frequência do que homens pertencentes a outros estados civis.

Dentre os fatores sócio-demográficos associados às doenças, observamos que a baixa escolaridade associa-se ao diagnóstico de DA. Apesar das controvérsias existentes entre os diferentes estudos, Caamano-Isorba e cols. (2006) demonstraram em meta-análise que o baixo nível de escolaridade pode ser um fator

de risco para demência, especialmente a DA. Indivíduos que apresentam reserva cognitiva alta, reflexo de elevada escolaridade, têm maior capacidade de manterem suas habilidades cognitivas independente de apresentarem as alterações neuropatológicas observadas na DA (Roe e cols., 2007). No Brasil, baixas condições sócio-econômicas, incluindo a baixa escolaridade da população, podem ser consideradas como fatores de risco para a doença. A educação determina maior reserva cognitiva através de atividades educacionais e laborais mais complexas, desencadeando mudanças no estilo de vida (redução consumo de álcool, tabagismo, atividade física), que proporcionam redução do risco de lesão cerebral (Scazufca e cols., 2008). Dessa forma, o baixo nível de escolaridade pode refletir um fator de risco para DA, principalmente nos países em desenvolvimento, onde a baixa escolaridade constitui um problema frequente. Portanto, nossos resultados corroboram com a hipótese da associação entre baixa escolaridade e DA.

O número de fatores psicossociais ocorridos nos últimos cinco anos correlacionou-se com os diagnósticos de depressão e DA com BPSD, mas não na DA isolada. Nos estudos epidemiológicos sobre depressão em idosos a ocorrência de eventos estressores psicossociais, nos últimos três anos, associou-se com o surgimento de depressão. Os principais estressores psicossociais foram a perda do parceiro (viuvez), surgimento de doenças e incapacidades, doença em parente próximo e institucionalização. A presença de três ou mais estressores na vida do indivíduo também se associou ao aparecimento de depressão (Pinho e cols., 2009). O stress crônico determinado por estes eventos adversos poderiam levar ao hipercortisolismo. A hipercortisolemia determina redução dos níveis de BDNF no hipocampo, reduz a neurogênese e leva à morte neuronal com consequente redução do volume do hipocampo (Alexopoulos e cols., 2005; Schultz & Barry, 2005; Martinowich e cols., 2007; Shelton, 2007). A associação destes fatores com a demência apenas no grupo que desenvolveu BPSD sugere que fatores ambientais possam desempenhar um papel importante na depressão e nos sintomas psicológicos DA com BPSD e, também a possibilidade de algum fator genético associado (interação genético-ambiental), que não foi encontrado na nossa amostra com os polimorfismos analisados.

A depressão associou-se ao diagnóstico de DA e DA com BPSD. Esses dados estão de acordo com a literatura (Ownby e cols, 2006; Wilson e cols., 2008; Brommelhoff e cols., 2009; Korczyn & Halperin, 2009). Entretanto, por tratar-se de

estudo transversal e pelo fato de não haver definição quanto ao tipo de depressão em relação à idade de início, não é possível esclarecer se a depressão se constitui em fator de risco, ou um sintoma inicial de DA, ou associa-se a ela em função dos determinantes comuns a ambas as doenças (Jorn, 2001; Lee & Lyketsos, 2003). Considerando estes fatos, é importante a realização de estudos prospectivos que possam esclarecer melhor as interações entre estas doenças e o impacto do seu tratamento na evolução para a demência. É importante ressaltar que a depressão é uma doença prevalente e subdiagnosticada, especialmente na população idosa (Stek, 2004; Yang & George, 2005).

Com relação aos resultados da genotipagem, obtivemos algumas relações importantes.

Na depressão de início tardio, observamos que o genótipo CT do *Tag SNP rs7124442* foi mais frequente em relação aos controles, tanto na amostra global como no sexo masculino. Entretanto, não houve correlação entre depressão de início tardio e o polimorfismo funcional do *BDNF*, *rs6265*. Estes dados sugerem que *rs7124442* (*Tag SNP*) pode estar refletindo outro SNP, uma vez que ele se relaciona a SNPs de uma ampla região do *BDNF*.

Apesar de não ter sido observada associação de haplótipo entre os polimorfismos do *BDNF*, a análise de epistasia através do MDR mostrou interação sinérgica entre *rs6265* (AA) e *rs7124442* (TT), na depressão de início tardio e uma tendência (estatisticamente não significativa) a um ganho de interação entre os dois SNPs na demência. Importante ressaltar que o uso do MDR para análise de interações genéticas reduz índice de falsos positivos, em função da estratégia de validação cruzada utilizada pelo método (Ritchie e cols, 2001; Moore e cols., 2006).

Em conjunto, os dados referentes à análise dos SNPs do *BDNF* sugerem uma associação entre *BDNF* e depressão de início tardio e DA, relacionadas a *Val66Met*. Sabemos que o stress crônico pode levar a redução dos níveis de neurotrofinas endógenas, com consequente atrofia do hipocampo e córtex pré-frontal, determinando o desenvolvimento da depressão. E que o *BDNF* encontra-se envolvido na fisiopatologia dos transtornos do humor (Sklar e cols, 2002; G Lang e cols, 2005; Gratacòs e cols, 2007). Estudos prévios sugerem um papel para o *Val66Met* na depressão e, também na depressão geriátrica (Schumacher e cols, 2005; Hwang e cols 2006; Kim e cols, 2008). Também existem evidências de que o

alelo *Met* estaria associado à redução do volume do hipocampo em pacientes com depressão maior (Szeszko e cols., 2005; Bueller e cols., 2006; Frodl e cols., 2007). Além disso, o hipocampo apresenta um importante papel na depressão geriátrica (Steffens e cols., 2000). Assim, a variante *Val66Met* deve estar envolvida na fisiopatologia da depressão em idosos. Alguns resultados apontam para o papel deste polimorfismo na depressão neste grupo etário (Hwang e cols., 2006; Ribeiro e cols., 2007, Taylor e cols., 2007). Nossos resultados são coerentes com os dados da literatura à medida que sugerem um papel do *BDNF* e, especificamente do alelo *Met* do *rs6265* no desenvolvimento da depressão. Também observamos ganho de interação entre *Val66Met* (*Val/Val*) e *rs429358* (provavelmente relacionada à *APOE* ε4) na DA.

Considerando que a maioria dos estudos de neuroimagem concorda que o alelo *Met* está relacionado à atrofia do hipocampo em relação ao alelo *Val* (Szeszko e cols., 2005; Bueller e cols., 2006; Frodl e cols., 2007) e que o hipocampo apresenta um papel fundamental na depressão e na DA, o *BDNF* poderia, dessa forma, estar envolvido na fisiopatologia da demência. Entretanto, os resultados das relações de *Val66Met* são conflitantes e o alelo *Val* parece estar associado com a DA (Ventriciglia e cols., 2002; Matsushita e cols., 2005; Akatsu e cols., 2006; Féher e cols., 2009). Nosso trabalho mostra apenas uma tendência para associação entre o alelo *Val* e DA, através da análise de interação genética.

A hipótese “*yin-yang*” demonstra uma nova perspectiva na compreensão do papel das neurotrofinas na depressão e poderia auxiliar na interpretação de alguns resultados conflitantes obtidos com relação à sinalização do *BDNF* nos transtornos do humor. A hipótese está fundamentada na atividade das pró-neurotrofinas no cérebro. As pró-neurotrofinas se ligam preferencialmente aos receptores *p75^{NTR}* em oposição às neurotrofinas maduras, que se ligam a *TrekB*. As primeiras determinam apoptose, ao invés de promoção da sobrevivência celular. Desta forma, as pró-neurotrofinas e as neurotrofinas maduras apresentam ações biológicas opostas através da ligação aos receptores *p75^{NTR}* e *TrekB*, respectivamente (Martinowich e cols., 2007). Assim, poderíamos supor que os resultados do *Val66Met* diferentes nas duas patologias, apesar de concordantes na literatura, poderiam estar associados à função oposta das pró-neurotrofinas em relação às neurotrofinas maduras.

A análise de interação genética na DA com BPSD também sugere um possível papel do *BDNF*, apenas quando em interação com o genótipo LaLa do 5-

HTTLPR. Como a interação envolve o *Tag SNP* e não o polimorfismo funcional, provavelmente deve existir outro polimorfismo em LD com *rs7124442* (Huang e cols., 2007) envolvido nesta interação. Sabemos que o *BDNF* e a serotonina apresentam função reguladora na neurogênese, sobrevivência e plasticidade sináptica. Ambos regulam o desenvolvimento e a plasticidade dos circuitos neurais envolvidos nos transtornos do humor. O *BDNF* também promove a sobrevivência e diferenciação dos neurônios serotoninérgicos. Existem evidências de sinergismo entre os dois sistemas nos transtornos do humor e de epistasia entre *BDNF* e *5-HTTLPR* (Martinovick & Lu, 2008). Galter & Unsicker (2000a, 2000b) observaram que a serotonina estimula a transcrição de *BDNF* e que a sinalização de BDNF-TrkB é crucial para liberação de serotonina. Vários estudos têm demonstrado a existência de epistasia entre os dois genes (Kaufman e cols., 2006; Kim e cols., 2007; Bocchio-Chiavetto e cols., 2008; Pezawas, 2008). Além disso, ambos *BDNF* e *5-HTTLPR* podem estar implicados na fisiopatologia da BPSD (Nishimura e cols., 2005; Borroni e cols., 2006a; Borroni e cols., 2006b). A interação sinérgica entre *rs7124442* e *5-HTTLPR* reforça a participação do *BDNF* e do *5-HTTLPR* no desenvolvimento de sintomas psiquiátricos associados à depressão e, também a existência de interação entre o BDNF e o sistema serotoninérgico nos transtornos psiquiátricos.

Com relação à *APOE*, nossos resultados são compatíveis com a literatura (Lane & Farlow, 2005; Bu, 2009), demonstrando que a *APOE* constitui um fator de risco para DA com e sem BPSD. Também constatamos que o alelo 3 é mais frequente no grupo controle e que alelo 2 também apresenta uma tendência para ser mais frequente neste grupo. Como a prevalência desse alelo na população geral é menor, uma amostra maior seria necessária para confirmar esta tendência. Embora já esteja estabelecido que a *APOE4* representa um fator de risco para a doença, ainda não se encontra completamente definido se a *APOE4* interferiria na idade de início, progressão e curso clínico da doença. Nossos resultados mostraram que a presença do alelo $\epsilon 4$ da apolipoproteína E associa-se com o início mais precoce da doença. Portadores do alelo $\epsilon 4$ apresentam perda da memória mais rapidamente progressiva e reduzem a eficiência da aprendizagem por volta dos 50 a 60 anos, quando comparados a indivíduos não portadores. Tal declínio correlaciona-se com a redução do metabolismo cerebral cerca de 5 a 10 anos antes do início dos sintomas cognitivos (Baxter e cols., 2003; Caselli e cols., 2004; Casselli e cols., 2007). O ponto de transição entre a normalidade e a idade de início da DA tem sido alvo de vários

estudos. Caselli e cols. (2009) observaram que o declínio da memória em portadores da *APOEε4* ocorre antes dos 60 anos. Chuang e cols. (2006) e Sando e cols. (2008) observaram início mais precoce da doença em portadores do alelo *ε4*. Chuang e cols. (2010) observaram que o início da doença era mais precoce e havia um pior desempenho nos testes neuropsicológicos em portadores de *APOE ε4*. Entretanto, Van der Vlies e cols (2009) não observaram relação entre *APOE* e a velocidade de progressão da doença. Nossos resultados contribuem para reforçar que a *APOE4* é um fator de risco para desenvolvimento mais precoce da doença.

A análise de interação genética demonstrou interação sinérgica entre *Val66Met* e *APOE4* na DA. É importante ressaltar que *APOEε4* é o fator de risco isolado mais importante na DA. Além disso, sabemos que a DA é uma doença complexa, que compromete inúmeras moléculas, células e sistemas. Matsushita e cols. (2005) já haviam observado interação entre *Val66Met* e *APOEε4*.

No grupo DA, os indivíduos do sexo masculino também apresentaram uma maior porcentagem de heterozigotos para o *5-HTTLPR*. Na análise dos endofenótipos, observamos que esta associação estava presente apenas no grupo DA com depressão. Apesar de não termos encontrado associação entre *5-HTTLPR* e a depressão de início tardio na nossa amostra, vários trabalhos associam este polimorfismo aos transtornos depressivos e a resposta terapêutica aos SSRI na depressão (Eley e cols., 2004; Lotrick e Pollock, 2004; Murphy e cols, 2004; Grabe e cols., 2005; Kendler e cols., 2005; Sjoberg e cols., 2006; Wilhelm e cols., 2006; Zalsman e cols., 2006; Gerretson & Pollock, 2007), comprovando seu papel neste transtorno. Trabalhos realizados previamente não demonstraram associação entre DA e *5-HTTLPR* de forma isolada (Kunugi e cols., 2000; Tsai e cols, 2001). Entretanto, alguns estudos demonstraram a associação do *5-HTTLPR* com sintomas psiquiátricos da doença, geralmente em interação com outros SNP (Nishimura e cols., 2005; Borroni e cols., 2006a; Borroni e cols., 2006b). Dessa forma, concluímos o *5-HTTLPR* encontra-se associado a DA e à depressão como sintoma de BPSD.

Nossos resultados sugerem uma relação entre DM tipo 2 e DA, apenas quando associada a BPSD. A presença de receptores de insulina no hipocampo e no córtex temporal medial sugere que a insulina influencia na memória. Provavelmente, os mecanismos relacionados à memória incluem a modulação da estrutura e função sináptica, do potencial de longa duração e dos níveis de neurotransmissores no SNC. Muitas das importantes funções da insulina no cérebro

são alteradas pelas condições de resistência à insulina. A hiperinsulinemia periférica prolongada associada à resistência periférica à insulina reduz o transporte de insulina através da barreira hematoencefálica, com subsequente redução dos níveis e da atividade da insulina no cérebro. A resistência à insulina e a hiperinsulinemia estão implicadas em inúmeros processos fisiopatológicos relacionados à DA. A redução da sinalização cerebral de insulina está associada com a hiperfosforilação da proteína *tau* e aumento dos níveis de A β em modelos animais de diabetes. A insulina também promove a liberação de A β intracelular em cultura de neurônios e acelera o tráfico de A β pela membrana plasmática. A insulina pode interferir na degradação de A β através da regulação da IDE (Craft, 2009). A redução da atividade de IDE resulta em mudanças na utilização da glicose pelo cérebro e pode afetar a cognição e os sintomas psiquiátricos da DA. A IDE degrada a insulina e a A β . Polimorfismos da IDE, localizada no cromossomo 10, encontram-se associados com DM (Groves e cols., 2003; Karamohamed e cols, 2003) e DA (Edland e cols., 2003; Bian e cols., 2004). Recentemente, Sato e cols. (2008) demonstraram associação entre polimorfismos da IDE e DA apenas em indivíduos com BPSD. Nossos resultados sugerem uma possível associação entre DM e BPSD. Acreditamos que esta associação possa estar relacionada ao papel da IDE.

Observamos também associação entre DA e dislipidemia apenas no grupo com BPSD. Os resultados dos estudos que relacionam hipercolesterolemia com DA são conflitantes. Sabemos que no SNC o colesterol é quase todo não esterificado e reside em dois diferentes sítios; um representado pelas bainhas de mielina (oligodendróglia) e outro pelas membranas plasmáticas dos astrócitos e neurônios. A barreira hematoencefálica previne qualquer troca entre o cérebro e as lipoproteínas plasmáticas. Portanto, no cérebro, quase todo o colesterol é originado da síntese *de novo*, que é realizada pelos astrócitos, oligodendrócitos e uma pequena quantidade de neurônios. O cérebro parece manter seus níveis de colesterol independente dos níveis periféricos. Entretanto, níveis elevados de colesterol podem representar um fator de risco para a amiloidogênese precoce e o desenvolvimento de DA (Martins e cols., 2009). Portanto, muitos dos mecanismos relacionados à hipercolesterolemia e risco para DA ainda necessitam ser esclarecidos. Acreditamos que assim como no DM, a associação entre dislipidemia e DA com BPSD pode estar associada a uma via metabólica comum de importância

apenas nos portadores de BPSD. Essas hipóteses necessitam ser testadas em novos estudos envolvendo DA, DA com BPSD e distúrbios metabólicos.

Na depressão de início tardio, observamos interação sinérgica entre *rs4680* e *5-HTTLPR*. Justifica-se este resultado baseado na existência de uma ampla interação entre os sistemas serotoninérgico e dopaminérgico. Neurônios dopaminérgicos recebem inervação dos neurônios serotoninérgicos originados nos núcleos da rafe, que exercem efeito inibitório. Esta modulação parece ser recíproca, ou seja, os neurônios dopaminérgicos inervam os núcleos da rafe e exercem efeitos tônico-excitatórios sobre eles (Di Giovanni e cols., 2008). Han e cols (2008) demonstraram que a presença do alelo *Val* da *COMT* e do alelo longo do *5-HTTLPR* estavam associados a melhores taxas de resposta à terapêutica para cessação do tabagismo. Em portadores de depressão de início tardio, estes dados necessitam ser replicados.

Na nossa amostra depressão estava associada a demência, em concordância com os dados da literatura. Sendo assim, acreditamos que a depressão configure um fator de risco para a demência, atuando na fisiopatologia desta através do hipercortisolismo e deficiência das neurotrofinas (como o *BDNF*), determinando atrofia do hipocampo e alteração da liberação dos neurotransmissores (Steffens e cols., 2000; Szeszko e cols., 2005; Bueller e cols., 2007, Frodl e cols., 2007). Além disso, ocorrem alterações sistêmicas importantes que incluem alterações vegetativas, hipercortisolemia, aumento da gordura abdominal, redução da massa óssea e aumento do risco de DM tipo 2 e HAS. Nesses pacientes, as anormalidades no funcionamento dos sistemas neurais, disfunções das vias fronto-estriatais, amígdalas e hipocampo são acompanhadas por incapacidade cognitiva (Alexopoulos, 2005; Alexopoulos e cols., 2005; Blazer & Hybels, 2005).

A *APOE* alelo $\epsilon 4$, comprovadamente implicada na fisiopatologia da demência, poderia determinar a redução da idade de início do quadro demencial associado a fatores sócio-demográficos, como os eventos estressores de vida e a baixa escolaridade.

Assim, nosso trabalho confirma a associação entre depressão e demência e estabelece vários fatores sócio-demográficos, clínicos e genéticos relacionados às duas doenças. Baseado nestes resultados, poderemos delinear novos estudos que permitam uma análise prospectiva. Entretanto, nossos resultados nos permitem sugerir intervenções com o objetivo de reduzir a incidência destas doenças, como:

tratamento precoce e intensivo da depressão no idoso; tratamento de doenças como DM e dislipidemia; estímulo à educação. Estas orientações são de fundamental importância especialmente em indivíduos que apresentam risco de desenvolvimento precoce de DA, como os carreadores da *APOE4*.

CONCLUSÃO

A doença de Alzheimer é altamente prevalente na população. Apresenta incidência crescente e elevado custo social e econômico. Uma vez que a DA não possui tratamento eficaz, algumas medidas como tratamento precoce da depressão, controle do DM e dislipidemia, poderiam postergar o início da doença e ajudar a prevenir a BPSD. Além disso, a depressão maior, principalmente a depressão de início tardio associa-se significativamente à DA.

A análise dos dados apresentados nesse trabalho nos permite concluir que:

- 1- A baixa escolaridade está associada à DA. Estes resultados são comparáveis aos da literatura mundial. Estes dados poderiam servir para nortear políticas públicas de saúde e educação com o objetivo de beneficiar principalmente as populações com baixo nível sócio-econômico, prevenindo uma elevação extra na taxa de incidência da doença no futuro;
- 2- A depressão, em função da elevada taxa de incapacidade a ela atribuída, elevado custo sócio-econômico e sua possível associação com a DA, deveria ser abordada precocemente, especialmente na população idosa;
- 3- Os fatores psicossociais associam-se a depressão e DA com BPSD;
- 4- Idosos portadores de depressão, especialmente de início tardio devem ser cuidadosamente acompanhados com vistas a uma possível incapacidade cognitiva, considerando que a depressão de início tardio parece corresponder a um fator de risco para a doença;
- 5- *APOE* ϵ 4 associa-se a um risco três vezes maior para DA e associa-se com um início mais precoce da doença;
- 6- A *APOE* ϵ 4, não se associa a depressão de início tardio, na nossa amostra;
- 7- *Val66Met* está associada com a DA e depressão de início tardio;
- 8- A *APOE* ϵ 4 apresenta interação sinérgica com *BDNF* na DA;
- 9- Observamos interação sinérgica entre o sistema serotoninérgico e dopaminérgico na depressão de início tardio;
- 10- DM e dislipidemia associam-se a DA apenas no grupo de pacientes portadores de BPSD, por mecanismos ainda não muito bem esclarecidos, mas que podem estar associados a fatores genéticos envolvendo vias metabólicas comuns.

Não encontramos na literatura nenhum estudo que avaliasse as variáveis clínicas, sócio-demográficas e genéticas na depressão e demência

na população geriátrica. Nossos resultados poderiam nortear algumas ações no sentido de reduzir o impacto destas doenças na população idosa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akatsu H, Yamagata HD, Kawamata J, Kamino K, Takeda M, Yamamoto T, Miki T, Tooyama I, Shimohama S, Kosaka K (2006). Variations in the BDNF gene in autopsy-confirmed Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies in Japan. *Dement Geriatr Cogn Disord* **22**:216-222.
- Alexopoulos GS (1988). Cornell scale for Depression in dementia. *Biological Psychiatry* **23**:271-284.
- Alexopoulos GS (2005). Depression in the elderly. *Lancet* **365**:1961-1970.
- Alexopoulos GS, Kelly RE (2009). Research advances in geriatric depression. *World Psychiatr* **4**:140-149.
- Alexopoulos GS, Schultz SK, Lebowitz BD (2005). Late-life depression: A model for medical classification. *Biol Psychiatr* **58**:283-289.
- Almeida OP, Almeida AA (1999). Confiabilidade da versão brasileira da escala de depressão geriátrica (GDS) versão reduzida. *Arq Bras Neuro-Psiq* **57**:421-426.
- American Psychiatric Association: Diagnosis and Statistical Manual of Mental Disorders (1994). 4th Ed. Washington, APA.
- Amorim P (2000). MINI International Neuropsychiatric Interview (MINI): validation of a short structured diagnostic psychiatric interview. *Rev Bras Psiquiatr* **22**:106-15.
- Anderson JL, Adams CD, Antman EM, Bridges CR, Califf RM, Casey Jr DE, Chavey II WE, Fesmire FM, Hochman JS, Levin TN, Lincoff AM, Peterson ED, Theroux P, Wenger NK, Wright RS (2007). Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non- ST-Elevation Myocardial Infarction: Executive Summary : A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* **116**:803-877
- Aprahamian I, Martinelli JE, Yassuba MS (2009). Alzheimer's disease: an epidemiology and diagnosis review. *Rev Bras Clin Med* **7**: 27-35.

- Baekken PM, Skorpen F, Stordal E, Zwart JA, Hagen K (2008). Depression and anxiety in relation to catechol-O-methyltransferase *Val158Met* genotype in the general population: the Nord-Trøndelag Health Study (HUNT). *BMC Psychiatry*. **25**:48-56.
- Baldwin R, Jeffries S, Jackson A, Sutcliffe, Thacker N, Scott M, Burns A (2005). Neurobiological findings in late-onset depressive disorder: comparison of individuals with and without depression. *Brit J Psychiatry* **186**: 308-313.
- Ballmaier M, Narr KL, Toga AW, Elderkin-Thompson V, Thompson PM, Hamilton L, Haroon E, Pham D, Heinz A, Kumar A (2008). Hippocampal morphology and distinguishing late-onset from early-onset elderly depression. *Am J Psychiatry* **165**: 229-237.
- Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Anal Biochem* **196**: 80-83.
- Baune BT, Hohoff C, Berger K, Neumann A, Mortensen S, Roehrs T, Deckert J, Arolt V, Domschke K (2008). Association of the COMT *Val158Met* variant with antidepressant treatment response in major depression. *Neuropsychopharmacology* **33**:924-932.
- Bell-McGinty S, Butters MA, Meltzer CC, Greer PJ, Reynolds CF, Becker JT (2002). Brain morphometric abnormalities in geriatric depression: long-term neurobiological effects of illness duration. *A J Psychiatry* **159**:1424-1427.
- Bertolucci PM (1998). Desempenho da população brasileira na bateria neuropsicológica do Consortium to Establish a Registry for Alzheimer Disease (CERAD). *Rev Psiq Clín* **2**: 80-83.
- Bertram L, Tanzi RE (2008). Thirty years of Alzheimer`s disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nature Rev Neurosci* **9**:768-778.
- Bian L, Yang JD, Guo TW, Sun Y, Duan SW, Chen WY, Pan YX, Feng GY, He L (2004). Insulin-degrading enzyme and Alzheimer disease: a genetic association study in the Han Chinese. *Neurology* **63**:241-245.

- Blazer DG, Hybels CF (2005). Origins of depression in later life. *Psychological Medicine* **35**: 1241-1252.
- Bocchio-Chiavetto L, Miniussi C, Zanardini R, Gazzoli A, Bignotti S, Specchia C, Gennarelli M (2008). *5-HTTLPR* and *BDNFVal66Met* polymorphisms and response to rTMS treatment in drug resistant depression. *Neurosci Letters* **437**:130-134.
- Borrioni B, Grassi M, Agosti C, Archetti S, Costanzi C, Cornali C, Caltagirone C, Caimi L, Di Luca M, Padovani A (2006a). Cumulative effect of COMT and 5-HTTLPR polymorphisms and their interaction with disease severity and comorbidities on the risk of psychosis in Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry* **14**:343-351.
- Borrioni B, Grassi M, Costanzi C, Archetti S, Franzoni S, Caltagirone C, Di Luca M, Caimi L, Padovani A (2006b). Genetic correlates of behavioral endophenotypes in Alzheimer disease: role of COMT, 5-HTTLPR and APOE polymorphisms. *Neurobiology of Aging* **27**: 595-1603.
- Borrioni B, Grassi M, Costanzi C, Zanetti M, Archetti S, Franzoni S, Caimi L, Padovani A (2007). Haplotypes in catechol-o-methyltransferase gene confer increased risk for psychosis in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* **28**:1231-1238.
- Borrioni B, Costanzi C, Padovani A (2010). Genetic susceptibility to behavior and psychiatric symptoms of AD. *Current Alzheimer Res* **7**:158-164.
- Brommelhoff JA, Gatz M, Johansson B, McArdle JJ, Fratiglioni L, Pedersen N (2009). Depression as a risk factor or prodromal feature for dementia? Findings in a population-based sample of Swedish twins. *Psychol Aging* **24**: 373-384.
- Brucki SM, Malheiros SM, Okamoto IH, Bertolucci PH (1997) Normative data on the verbal fluency test in the animal category in our milieu. *Arq Neuropsiquiatr* **55** (1): 56-61.
- Brucki SM, Nitrini R, Caramelli P, Bertolucci PH, Okamoto IH (2003). Sugestões para o uso do mini-exame do estado mental no Brasil. *Arq Neuro-Psiquiatria*

61:777-781.

Brugha TS, Cragg D (1990). The list of threatening experiences: The reliability and validity of a brief life events questionnaire. *Acta Psychiatrica Scandinavica* **82:77-81.**

Bu G (2009). Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer`s disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nature Rev Neurosci* **10:333-344.**

Bueller JA, Aftab M, Sen S, Gomez-Hassan D, Burmeister M, Zubieta JK (2006). *BDNF Val66Met* allele is associated with reduced hippocampal volume in healthy subjects. *Biol Psychiatry* **59:812-815.**

Caamano-Isorba F, Corral M, Montes-Martinez, Takkouche B (2006). Education and dementia: a meta-analytic study. *Neuroepidemiology* **26:226-232.**

Cacciatore F, Gallo C, Ferrara N, Abete P, Paolisso G, Canonico S, Signoriello G, Terraciano C, Napoli C, Varricchio M, Rengo F (1998). Morrbity patterns in aged population in southern Italy. A survey sampling. *Arch Gerontol Geriatrics* **26:201-213.**

Carthery-Goulart MT, Areza-Fegyveres R, Schultz RR, Okamoto I, Caramelli P, Bertolucci PHF, Nitrini R (2007). Versão Brasileira da Escala de Cornell de depressão em demência (Cornell Depression Scale in Dementia). *Arq Neuropsiquiatria* **65 :912-915.**

Caselli RJ, Amylou CD, Osborne D, Sabbagh MN, Connor DJ, Ahern GL, Baxter LC, Rapcsak SZ, Shi J, Woodruff BK, Locke DFC, Snyder CH, Alexander GE, Rademakers R, Reiman EM (2009). Longitudinal modeling of age-related memory decline and the APOE ε4 effect. *N Engl J Med* **361:255-263.**

Caselli RJ, Reiman EM, Locke DE, Hutton ML, Hentz JG, Hoffman-Snyder C, Woodruff BK, Alexander GE, Osborne D (2007). Cognitive domain decline in healthy apolipoprotein E epsilon4 homozygotes before the diagnosis of mild cognitive impairment. *Arch Neurol* **64:1306-1311.**

Caselli RJ, Reiman EM, Osborne JG, Baxter LC, Hernandez JL, Alexander GG

- (2004). Longitudinal changes in cognition and behavior in asymptomatic carriers of the APO e4 allele. *Neurology* **62**:1990-1995.
- Caspi A, Sugden K , Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* **301**:386-389.
- Chen B, Dowlathashi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT (2001). Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry* **50**:260-265.
- Chuang WL, Hsieh YC, Wang CY, Kuo HC, Huang CC (2010). Association of apolipoproteins e4 and c1 with onset age and memory: a study of sporadic Alzheimer disease in Taiwan. *J Geriatr Psychiatry Neurol* **23**:42-48.
- Connor B, Young D, Yan Q, Faull RL, Synek B, Dragunow M (1997). Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer`s Disease. *Brain Research. Mol Brain Res* **49**:71-81.
- Cook EH, Courchesne R, Lord C, Cox NJ, Yan S, Lincoln A, Haas R, Courchesne E, Leventhal BL (1997). Evidence of linkage between serotonin transporter and autism disorder. *Mol Psychiatry* **2**:247-250.
- Correa H, Campi-Azevedo AC, De Marco L, Boson W, Vianna MM, Guimaraes MM, Costa E, Miranda DM, Romano-Silva MA (2004). Familial suicide behaviour: association with probands suicide attempt characteristics and 5-HTTLPR polymorphism. *Acta Psychiatr Scand* **110**:459-464.
- Costa e Silva JA (2005). Depression: genetics, pathophysiology, and clinic manifestations. Overview of the field. *Metabolism* **54**(Suppl 1):5-9.
- Craft Z (2009). The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and vascular dementia. Two roads converged. *Arch Neurol* **66**:300-305.
- Craig D, Hart DJ, McIlroy SP, Passmore AP (2005). Association analysis of apolipoprotein E genotype and risk of depressive symptoms in Alzheimer's

disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* **19**:154-157.

Cummings JL, Mega M, Gray K, Rosenberg-Thompson S, Carusi DA, Gornbein J (1994). Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia. *Neurology* **44**:2308-2323.

Dias AM, Reis AF, Saud CG, Chilingue MG, Leite RF, Abdalah RN, Figueiredo MF, Ribeiro GS, Faria CA (2009). Severity of angiographic coronary obstruction and the apolipoprotein E polymorphism in acute coronary syndromes. *Arq Bras Cardiol.* **93**:221-30.

Di Giovanni G, Di Matteo V, Pierucci M, Esposito E (2008). Serotonin-dopamine interaction: electrophysiological evidence. *Prog Brain Res* **172**:45-71.

Diniz BS, Teixeira AL, Talib LL, Mendonça VA, Gattaz WF, Forlenza OV (2010). Serum brain-derived neurotrophic factor level is reduced in antidepressant-free patients with late-life depression. *World J Biol Psychiatry* **11**:550-555.

Dubois B, Slachvsky A, Litvan I, Pillon B (2000). The FAB: a Frontal and Assessment Battery at bedside. *Neurology* **55**:1621-1626.

Duman RS (2002). Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity. *Eur Psychiatry* **17**(Suppl 3):306-310.

Duman RS, Monteggia LM (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* **59**:1116–27.

Ebmeier KP, Donaghey C, Steele JD. (2006). Recent developments and current controversies in depression. *Lancet* **367**:153-167.

Edland SD, Wavrant-De Vriesé F, Compton D, Smith GE, Ivnik R, Boeve BF, Tangalos EG, Petersen RC (2003). Insulin degrading enzyme (IDE) genetic variants and risk of Alzheimer's disease: evidence of effect modification by apolipoprotein E (APOE). *Neurosci Lett* **345**:21-24.

Egan MF, Goldberg TE, Kolachana BS, Callicott JH, Mazzanti CM, Straub RE, Goldman D, Weinberger DR (2001). Effect of *COMT Val^{108/158}Met* genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*

98:6912-6922.

- Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR (2003). The BDNF *Val66Met* polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* **112**:257-69.
- Eley TC, Sugden K, Corsico A, Gregory AM, Sham P, McGuffin P, Plomin R, Craig IW (2004). Gene-environment interaction analysis of serotonin system markers with adolescent depression. *Mol Psychiatry* **9**:1-8.
- Fehér A, Juhasz A, Rimanócs A, Kálmán J, Janka Z (2009). Association between *BDNF Val66Met* polymorphism and Alzheimer disease, dementia with Lewy bodies, and Pick disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **23**:224-228.
- Ferreira CN, Carvalho MG, Fernandes APSM, Lima LM, Loures-Valle AA, Dantas J, Janka Z, Palotás A, Sousa MO (2010). Comparative study of apolipoprotein-E polymorphism and plasma lipid levels in dyslipidemic and asymptomatic subjects, and their implication in cardio/cerebro-vascular disorders. *Neurochemistry Inter* **56**:177-182.
- Feulner TM, Laws SM, Friedrich P, Wagenpfeil S, Wurst SH, Riehle C, Kuhn KA, Krawczak M, Schreiber S, Nikolaus S, Förstl H, Kurz A, Riemenschneider M (2009). Examination of the current top candidate genes for AD in a genome-wide association study. *Mol Psychiatry* **6**:1-11.
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh (1975). Mini-mental state: a practical method for grading the cognitive status of patients for the clinician. *J Psychiatr Rev* **12**:189-195.
- Forsell Y, Corder EH, Basun H, Lannfelt L, Viitanen M, Winblad B (1997). Depression and dementia in relation to apolipoprotein E polymorphism in a population sample age 75+. *Biol Psychiatry* **42**:898-903.
- Fraker TD, Fihn SD (2007). Chronic Angina Focused Update of the Chronic Angina Focused Update ACC/AHA 2002 Guidelines for the Management of Patients With Chronic Stable Angina. *Circulation* **116**:2762-2772

- Frodl T, Zill P, Baghai T, Schüle C, Rupprecht R, Zetsche T, Bondy B, Reiser M, Möller HJ, Meisenzahl EM (2008). Reduced hippocampal volumes associated with the long variant of the tri- and diallelic serotonin transporter polymorphism in major depression. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **147**:1003-1007.
- Galter D, Unsicker K (2000a). Brain-derived neurotrophic factor and *TrekB* are essential for cAMP-mediated induction of serotonergic neuronal phenotype. *J Neurosci Res* **61**:295-301.
- Galter D, Unsicker K (2000b). Sequential activation of 5-HT₁ serotonin receptor and *TrekB* induces the serotonergic neuronal phenotype. *Mol Cell Neurosci* **15**:446-55.
- Garzon DJ, Fahnstock M (2007). Oligomeric amyloid decreases basal level of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts IV and V in different human neuroblastoma cells. *J Neurosci* **27**:2628-2635.
- Gerretsen O, Pollock BG (2007). Pharmacogenetics and Serotonin Transporter in Late-Life Depression. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**:1465-1478.
- Gonzalez HM, Veja WA, Williams DR, Tarraf W, West BT, Neighbors HW (2010). Depression care in United States. *Arch Gen Psychiatry* **67**:37-46.
- Grabe HJ, Lange M, Wolff B, Volzke H, Lucht M, Freyberger HJ, John U, Cascorbi I (2005). Mental and physical distress is modulated by a polymorphism in the 5-HT transporter gene interacting with social stressors and chronic disease burden. *Mol Psychiatry* **10**:220-224.
- Gratacòs M, Gonzalez JR, Mercader JM, Cid R, Urretavizcaya M, Estivill X (2007). Brain-derived neurotrophic factor *Val66Met* and psychiatric disorders: meta analysis of case-control studies confirm association to substance-related disorders, eating disorders, and schizophrenia. *Biol Psychiatry* **61**:911-922.
- Green RC, Cupples A, Kurz A, Auerbach S, Go Rodney, Sadovnick D, Duara R, Kukull W, Chui H, Edeki T, Griffith PA, Friedland RP, Bachman D, Farrer L (2003). Depression as a risk factor for Alzheimer disease. The MIRAGE study.

Arch Neurol **60**:753-759.

Groves JO (2007). Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression? Mol Psychiatry **12**: 1079-1088.

Groves CJ, Wiltshire S, Smedley D, Owen KR, Frayling TM, Walker M, Hitman GA, Levy JC, O'Rahilly S, Menzel S, Hattersley AT, McCarthy MI (2003). Association and haplotype analysis of the insulin-degrading enzyme (IDE) gene, a strong positional and biological candidate for type 2 diabetes susceptibility. Diabetes **52**:1300-1305

Grupe A, Abraham R, Li Y, Rowland C, Hollingworth P, Morgan A, Jehu L, Segurado R, Stone D, Schadt E, Karnoub M, Nowotny P, Tacey K, Catanese J, Sninsky J, Brayne C, Rubinsztein D, Gill M, Lawlor B, Lovestone S, Holmans P, O'Donovan M, Morris JC, Thal L, Goate A, Owen MJ, Williams J (2007). Evidence for novel susceptibility genes for late-onset Alzheimer's disease from a genome-wide association study of putative functional variants. Hum Mol Genet **16**:865-873.

Hamilton M (1960). A rating scale for depression. J Neurol Neurosurg Psychiatry **23**:56-62.

Han DH, Joe KH, Na C, Lee YS (2008). Effect of genetic polymorphisms on smoking cessation: a trial of bupropion in Korean male smokers. Psychiatr Genet **18**:11-16.

Hardy J (2006). A hundred years of Alzheimer`s Disease Research. Neuron **52**: 3-13.

Hariri AR, Goldberg TE, Mattay VS, Kolachana BS, Callicott JH, Egan MF, Wainberger DR (2003). Brain-derived neurotrophic factor val⁶⁶met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. Journal of Neurosci **23**:6690-6694.

Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, Dowzell K, Williams A, Jones N, Thomas C, Stretton A, Morgan AR, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Morgan K, Brown KS, Passmore PA, Craig D,

McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Love S, Kehoe PG, Hardy J, Mead S, Fox N, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Schürmann B, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frölich L, Hampel H, Hüll M, Rujescu D, Goate AM, Kauwe JS, Cruchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Muhleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Jöckel KH, Klopp N, Wichmann HE, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Younkin SG, Holmans PA, O'Donovan M, Owen MJ, Williams J (2009). Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* **41**:1088-1093.

Herrera E Jr, Caramelli P, Nitrini R (1998). Estudo epidemiológico populacional de demência na cidade de Catanduva, estado de São Paulo. *Ver Psiq Clin* **25**:70-73.

Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, Mohamed M, Chaudhuri AR, Zalutsky R (2007). How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology* **68**:326-337.

Hollenbach JA, Ladner MB, Saetern K, Taylor KD, Mei L, Haritunians T, McGovern DPB, Erlich HA, Rotter JI, Trachtenberg EA (2009). Susceptibility to Crohn's disease is mediated by *KIR2DL2/KIR2DL3* heterozygosity and the HLA-C ligand. *Immunogenetics* **61**:663-671.

Holmes C, Russ C, Kirov G, Aitchison KJ, Powell JF, Collier DA, Lovestone S (1998). Apolipoprotein E: depressive illness, depressive symptoms, and Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* **43**:159-164

Hu X, Oroszi G, Chun J, Smith TL, Goldman D, Schuckit MA (2005). An expanded evaluation of the relationship of four alleles to the level of response to alcohol and the alcoholism risk. *Alcohol Clin Exp Res* **29**: 8-16.

Huang R, Huang J, Cathcart H, Smith S, Podusio SE (2007). Genetic variants in brain-derived neurotrophic factor associated with Alzheimer's disease. *J Med*

Genet **44**: 66-71.

Hwang JP, Tsai SJ, Hong CJ, Yang CH, Lirng JF, Yang YM (2006). The *Val66Met* polymorphism of the brain-derived neurotrophic-factor gene is associated with geriatric depression. *Neurobiol Aging* **27**:1834-1837.

Jaeger S, Pietrzik CU (2008). Functional role of lipoprotein receptors in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research* **5**:15-25.

Jellinger KA (2009). Alzheimer's disease: a challenger for modern neuropathology. *Acta Neuropathol* **118**:1-3.

Jiang X, Xu K, Hoberman J, Tian F, Marko AJ, Waheed JF, Harris CR, Marini AM, Enoch MA, Lipsky RH (2005). BDNF variation and mood disorders: A novel functional promoter polymorphism and *Val66Met* are associated with anxiety but have opposing effects. *Neuropsychopharmacology* **30**:1353-1361.

Jorm AF (2001). History of depression as a risk factor for dementia: an updated review. *Aust N Z J Psychiatry* **35**:776-781.

Karamohamed S, Demissie S, Volcjak J, Liu C, Heard-Costa N, Liu J, Shoemaker CM, Panhuysen CI, Meigs JB, Wilson P, Atwood LD, Cupples LA, Herbert A; NHLBI Framingham Heart Study (2003). Polymorphisms in the insulin-degrading enzyme gene are associated with type 2 diabetes in men from the NHLBI Framingham Heart Study. *Diabetes* **52**:1562–1567

Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G, Aubry JM (2002). Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res* **109**:143-148.

Katz S, Ford AB, Moskowitz RW, Jackson BA, Jaffe MW (1963). Studies of illness in the aged. The index of ADL: a standardized measure of biological and psychosocial function. *JAMA* **185**:914-919.

Kaufman J, Yang BZ, Douglas-Palumberi H, Grasso D, Lipschitz D, Houshyar S, Krystaln JH, Gelernter J (2006). Brain-derived neurotrophic factor-5HTTLPR gene interactions and environmental modifiers of depression in children. *Biol*

Psychiatry **59**:673-680.

Kauwe JSK, Wang J, Mayo K, Morris JC, Fagan AM, Holtzman DM, Goate AM (2009). Alzheimer's Disease risk variants show association with cerebrospinal fluid amyloid beta. *Neurogenetics* **10**:13-17.

Kendler KS, Kuhn JW, Vittum J, Prescott CA, Riley B (2005). The interaction of stressful life events and a serotonin transporter polymorphism in the prediction of episodes of major depression: a replication. *Arch Gen Psychiatry* **62**:529-535.

Kim J, Basak JM, Holtzman DM (2009). The role of apolipoprotein in Alzheimer's disease. *Neuron* **63**:287-303.

Kim JM, Stewart R, Kim SW, Yang SJ, Shin IS, Kim YH, Yoon JS (2008). BDNF genotype potentially modifying the association between incident stroke and depression. *Neurobiol Aging* **29**:789-792.

Kim JM, Stewart R, Kim SW, Yang SJ, Shin IS, Kim YH, Yoon JS (2007). Interactions between life stressors and susceptibility genes (5-HTTLPR and BDNF) on depression in Korean elders. *Biol Psychiatry* **62**:423-428.

Korczyn AD, Halperin I (2009). Depression and dementia. *J Neurological Sci* **283**:139-142.

Krishnan KR, Tupler LA, Ritchie JC, McDonald WM, Knight DL, Nemeroff CB, Carroll BJ (1996). ApolipoproteinE-epsilon 4 frequency in geriatric depression. *Biol Psychiatry* **40**:69-71.

Kunugi H, Ueki A, Otsuka M, Isse K, Hirasawa H, Kato N, Nabika T, Kobayashi S, Nanko S (2000). Alzheimer's disease and 5-HTTLPR polymorphism of the serotonin transporter gene: no evidence for an association. *Am J Med Genet.* **96**:307-309.

Kunugi H, Ueki A, Otsuka M, Isse K, Hirasawa H, Kato N, Nabika T, Kobayashi S, Nanko S (2001). A novel polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene associated with late-onset Alzheimer's disease. *Mol*

Psychiatry **6**:83-86.

- Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Zelenika D, Bullido MJ, Tavernier B, Letenneur L, Bettens K, Berr C, Pasquier F, Fiévet N, Barberger-Gateau P, Engelborghs S, De Deyn P, Mateo I, Franck A, Helisalmi S, Porcellini E, Hanon O; European Alzheimer's Disease Initiative Investigators, de Pancorbo MM, Lendon C, Dufouil C, Jaillard C, Leveillard T, Alvarez V, Bosco P, Mancuso M, Panza F, Nacmias B, Bossù P, Piccardi P, Annoni G, Seripa D, Galimberti D, Hannequin D, Licastro F, Soininen H, Ritchie K, Blanché H, Dartigues JF, Tzourio C, Gut I, Van Broeckhoven C, Alépérovitch A, Lathrop M, Amouyel P (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* **41**:1094-1099.
- Lane RM, Farlow MR (2005). Lipid homeostasis and apolipoprotein E in the development and progression of Alzheimer's disease. *J Lipid Res* **46**:949-968.
- Lang UE, Hellweg R, Gallinat J (2009). Association of BDNF serum concentrations with central serotonergic activity: evidence from auditory signal processing. *Neuropsychopharmacology* **30**:1148-1153.
- Lang UE, Hellweg R, Kallus P, Bajbouj M, Lenzen KP, Sander T, Kunz D, Gallinat J (2005). Association of a functional BDNF polymorphism and anxiety-related personality traits. *Psychopharmacology* **180**:95-99.
- Lawton MP, Brody EM (1969). Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist* **9**:179-86.
- Lee HB, Lyketsos CG (2003). Depression in Alzheimer's disease: heterogeneity and related issues. *Biol Psychiatry* **54**:353-362.
- Lesch KP (2004). Gene-environment interaction and genetics of depression. *Rev Psychiatr Neurosci* **29**:174-184.
- Lesch KP, Gutknecht L (2005). Pharmacogenetics of serotonin transporter. *Progr Neuropsychopharmacology Biol Psychiatry* **29**: 062-1073.

- Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D (1999). A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of diet in Renal Disease Study Group. *Annals of Internal Medicine* **130**:461–470.
- Li H, Wetten S, Li L, St Jean PL, Upmanyu R, Surh L, Hosford D, Barnes MR, Briley JD, Borrie M, Coletta N, Delisle R, Dhalla D, Ehm MG, Feldman HH, Fornazzari L, Gauthier S, Goodgame N, Guzman D, Hammond S, Hollingworth P, Hsiung GY, Johnson J, Kelly DD, Keren R, Kertesz A, King KS, Lovestone S, Loy-English I, Matthews PM, Owen MJ, Plumptre M, Pryse-Phillips W, Prinjha RK, Richardson JC, Saunders A, Slater AJ, St George-Hyslop PH, Stinnett SW, Swartz JE, Taylor RL, Wherrett J, Williams J, Yarnall DP, Gibson RA, Irizarry MC, Middleton LT, Roses AD (2008). Candidate single-nucleotide polymorphisms from a genomewide association study of Alzheimer disease. *Arch Neurol* **65**:45-53.
- Lindsay J, Laurin D, Verreault, Hébert R, Helliwell B, Hill GB, McDowell I (2002). Risk factors for Alzheimer's disease: A prospective analysis from the Canadian study of health and aging. *Am J Epidemiol* **156**:445-453.
- Livak JK, Marmaro J, Todd JA (1995). Towards fully automated genome wide polymorphisms screening. *Nature Genet* **9**: 341-342.
- Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulanen I, Melén K, Julkunen I, Taskinen J (1995). Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol-O-methyltransferase: A revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry* **34**:4202-4210.
- Lu B (2003). BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learning Memory* **10**:86-98.
- Lyketsos CG, Baker L, Warren A, Steele C, Brandt J, Steinberg M, Kopunek S, Baker A (1997). Depression, delusions, and hallucinations in Alzheimer's disease: no relationship to apolipoprotein E genotype. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **9**:64-67.

- Lyketsos CG, Sheppard JME, Steinberg M, Tschanz JAT, Norton MC, Steffens DC, Breitner CS (2001). Neuropsychiatric disturbance in Alzheimer's disease clusters into three groups: the Cache County Study. *Int J Geriatr Psychiatry* **16**:1043-1053.
- Mahley RW, Huang Y, Rall SC (1999). Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): questions, quandaries, and paradoxes. *J Lipid Res* **40**:1933-1949.
- Maisonpierre PC, Le Beau MM, Espinosa III R, Ip NY, Belluscio L, La Monte SM, Squinto S, Furth ME, Yancopoulos GD (1991). Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: Gene structures, distributions, and chromosomal localizations. *Genomics* **10**:558-568.
- Malhotra AK, Murphy GM, Kennedy AJ (2004). Pharmacogenetics of psychotropic drug response. *Am J Psychiatry* **161**:780-796.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982). Molecular cloning, a laboratory manual. First edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 173-178.
- Martínez MF, Martín XE, Alcelay LG, Flores JC, Valiente JM, Juanbeltz BI, Beldarraín MA, López JM, Gonzalez-Fernández MC, Salazar AM, Gandarias RB, Borda SI, Marqués NO, Amillano MB, Zabaleta MC, de Pancorbo MMBMC (2009). The *COMT Val158Met* polymorphism as an associated risk factor for Alzheimer disease and mild cognitive impairment in APOE 4 carriers. *BMC Neurosci* **10**: 25-134.
- Martinowich K, Lu B (2008). Interactions between *BDNF* and serotonin: Role in mood disorders. *Neuropsychopharmacology* **33**:73-83.
- Martinowich K, Manji H, Lu B (2007). New Insights into the *BDNF* function in depression and anxiety. *Nature Neuroscience* **10**:1089-1093.
- Massat I, Souery D, Del-Favero J, Nothen M, Blackwood D, Muir W, Kaneva R, Serretti A, Lorenzi C, Rietschel M, Milanova V, Papadimitriou GN, Dikeos D, Van Broekhoven C, Mendlewicz J (2005). Association between *COMT (Val158Met)* functional polymorphism and early onset in patients with major

- depressive disorder in a European multicenter genetic association study. *Mol Psychiatry* **10**:598-605.
- Matsushita S, Arai H, Matsui T, Yuzuriha T, Urakami K, Masaki T, Higuchi S (2005). Brain-Derived neurotrophic factor gene polymorphisms and Alzheimer's disease. *J Neural Transm* **112**:703-711.
- Mayada A, Kolachana BS, Rothmond DA, Hyde TM, Weinberger DR, Kleinman JE (2003). Catechol-O-Methyltransferase genotype and dopamine regulation in the human brain. *J Neurosci* **23**:2008-2013.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* **16**:1215.
- Ministério da Saúde – Secretaria de Atenção à Saúde - Departamento de Atenção Básica (2006). Envelhecimento e saúde da pessoa idosa. Caderno de Atenção Básica, nº19.
- Monfils MH, Cowansage KK, LeDoux (2007). Brain-derived neurotrophic factor: linking fear learning to memory consolidation. *Mol Pharmacol* **72**:235-237.
- Moore JH (2004). Computational analysis of gene-gene interaction using multifactor dimensionality reduction. *Expert Rev Mol Diag* **4**:795-803.
- Moore JH, Gilbert JC, Tsai CT, Chiang FT, Holden T, Barney N, White BC (2006). A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility. *J Theoretical Biol* **241**:252-261.
- Morris JC (1993). The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology* **43**:2412-2414.
- Morris JC, Mohs RC, Hughes JP, van Belle G, Fillenbaum G, Millits ED, Clark C (1989). The Consortium to establish a registry for Alzheimer's disease. *Neurology* **39**:1159-1165.

- Moussavi S, Chatterji S, Verdes E, Ajay T, Patel V, Ustun. Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys (2007). *Lancet* **370**:851-8.
- Murphy DL, Lerner A, Rudnick G, Lesch KP (2004). Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Molecular Interventions* **4**:109-123.
- Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao MV, Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski MH (2009). Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nature Medicine* **66**: 46-651.
- Nakamura M, Ueno S, Sano A, Tanabe H (2000). The human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) shows ten novel allelic variants. *Mol Psychiatry* **5**:32-38.
- Nishimura AL, Guindalini C, Oliveira JR, Nitrini R, Bahia VS, de Brito-Marques PR, Otto PA, Zatz M (2005). Monoamine oxidase a polymorphism in Brazilian patients: risk factor for late-onset Alzheimer's disease? *J Mol Neurosci.* **27**):213-217.
- Nitrini R, Lefèvre BH, Mathias SC, Caramelli P, Carrilho PE, Sauaia N, Massad E, Takiguti C, Da Silva IO, Porto CS (1994). Testes neuropsicológicos de aplicação simples para o diagnóstico de demência. *Arq Neuropsiquiatria* **52**:456-465.
- Nitrini R, Caramelli P, Bottino CMC, Damasceno BP, Brucki SMD, Anghinah R (2005). Diagnóstico de Doença de Alzheimer no Brasil: Critérios diagnósticos e exames complementares. Recomendações do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. *Arq Neuropsiquiatria* **63**:713-719.
- Olin JT, Katz IR, Meyers BS, Schneider LS, Lebowitz BD (2002). Provisional diagnostic criteria for depression of Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry* **10**:129-141.

- Organização Mundial de Saúde (2001). The World Health Report - Mental Health: New understanding, WHO, Geneve.
- Ownby RI, Crocco E, Acevedo A, John V, Loewenstein D (2006). Depression and risk for Alzheimer disease. Systematic review, meta analysis and metaregression analysis. *Arch Gen Psychiatry* **63**:530-538.
- Pan CC, McQuoid DR, Taylor WD, Payne ME, Ashley-Koch A, Steffens DC (2009). Association analysis of the COMT/MTHFR genes and geriatric depression: an MRI study of the putamen. *Int J Geriatr Psychiatry* **24(8)**:847-855.
- Paradela EMP, Lourenço RA, Veras RP (2005). Validation of Geriatric Depression Scale in a general outpatient clinic. *Rev Saúde Pública* **39**:918-923.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ (2003). Color and genomic ancestry in Brazil. *Proc Natl Acad Sci* **100**:177-182.
- Pattabiraman PP, Tropea D, Chiaruttini C, Tongiorgi E, Cattaneo A, Domenici L (2005). Neuronal activity regulates the developmental expression and subcellular localization of cortical BDNF mRNA isoforms in vivo. *Mol Cell Neurosci* **28**:556-570.
- Pezawas L, Meyer-Lindenberg, Goldman AL, Verchinski BA, Chen G, Lolachana BS, Egan MF, Mattay VS, Hariri AR, Weinberger DR (2008). Evidence of biologic epistasis between BDNF and SLC6A4 and implications for depression. *Mol Psychiatry* **13**:709-716.
- Pfeffer RI, Kurosaki TT, Harrah CH Jr, Chance JM, Filos S (1982). Measurement of functional activities on older adults in the community. *J Gerontol* **37(3)**:323-329.
- Pike CJ, Carroll JC, Rosario ER, Barron AM (2009). Protective actions of sex steroids hormones in Alzheimer`s disease. *Frontiers in Neuroendocrinology* **34**:239-258.

- Pinho MX, Custódio O, Makdisse M (2009). Incidência de depressão e fatores associados em idosos residentes na comunidade: revisão de literatura. Rev Bras Geriatr Gerontol v.12, n.1.
- Poirer J (1995). Apolipoprotein E in the brain and its role in Alzheimer`s disease. J Psychiatry Neurosc **21**:128-134.
- Potter GG, Taylor WD, McQuoid DR, Steffens DC, Welsh-Bohmer KA, Krishnan DC (2009). The *COMT Val158Met* polymorphism and cognition in depressed and nondepressed older adults. Int J Geriatr Psychiatry **24**:1127-1133.
- Pritchard AL, Harris J, Pritchard CW, Coates J, Haque S, Holder R, Bentham P, Lendon CL (2007). The effect of the apolipoprotein E gene polymorphisms and haplotypes on behavioural and psychological symptoms in probable Alzheimer's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry **78**:123-126.
- Protocolo de Avaliação Multidimensional do Idoso. Disponível no site: www.hc.ufmg.br/geriatria/pdf/protocolo_avaliacao_idoso.pdf -Acesso em [18/03/2010](#)
- Qio A, Taylor WD, Zhao Z, Macfall JR, Miller ML, Key CR, Payne ME, Steffens DC, Ranga K, Krishnan RR (2009). APOE related hippocampal shape alteration in geriatric depression. Neuroimage **44**:620-625.
- Querfurth HW, La Ferla FM (2010). Mecanisms of disease – Alzheimer´s disease. New Engl J Med **264**:329-344.
- Ramachandran G, Marder K, Tang M, Schofield PW, Chun MR, Devanand DP, Stern Y, Mayeux R (1996). A preliminary study of apolipoproteína E genotype and psychiatric manifestations of Alzheimer`s disease. Neurology **47**:256-259.
- Ramasubbu R (2003). Serotonin transporter gene functional polymorphism: a plausible candidate gene for increased vascular risk in depression. Med Hypotheses **61**:36-44.
- Ribeiro L, Busnello JV, Cantor RM, Whelan F, Whittaker P, Deloukas P, Wong ML, Licinio J (2007). The brain-derived neurotrophic factor *rs6265 (Val66Met)*

- polymorphism and depression in Mexican-Americans. *Neuroreport* **18**:1291-1293.
- Rigaud AS, Traykov L, Caputo L, Coste J, Latour F, Couderc R, Moulin F, Boller F, Forette F (2001). Association of Apolipoprotein E epsilon 4 allele with late-onset depression. *Neuroepidemiology* **20**:268-272.
- Ritchie MD, Hahn LW, Roodi N, Bailey R, Dupont W, Parl F, Moore JH (2001). Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *Am J Hum Genet* **69**:138-147.
- Roe CM, Xiong C, Miller JP, Morris JC (2007). Education and Alzheimer disease without dementia: support for the cognitive reserve hypothesis. *Neurology* **68**:223-228.
- Ropacki AS, Jeste DV (2005). Epidemiology of and risk factors for psychosis of Alzheimer`s disease: A review of 55 studies published from 1990 to 2003. *Am J Psychiatry* **162**:2022-2030.
- Sando SB, Melquist S, Cannon A, Hutton ML, Sletvold O, Saltvedt I, White LR, Lydersen S, Aasly JO (2008). APOE epsilon 4 lowers age at onset and is a high risk factor for Alzheimer's disease; a case control study from central Norway. *BMC Neurol* **16**:8-9.
- Sato N, Ueki A, Ueno H, Shinjo H, Morita Y (2008). IDE gene polymorphism influences on BPSD in mild dementia of Alzheimer's type. *Curr Gerontol Geriatr Res* 858759. Epub 2008 Dec 4
- Scazufca M, Menezes PR, Araya R, Di Rienzo VD, Almeida OP, Gunnell D, Lawlor DA (2008). Risk factor across the life course and dementia in a Brazilian population: results from the São Paulo Ageing & Health Study (SPAH). *Int J Epidemiol* **37**:879-890.
- Schmand B, Hooijer C, Jonker C, Lindeboom J, Havekes LM (1998) Apolipoprotein E phenotype is not related to late-life depression in a population-based sample. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* **33**:21-26.

- Schulte-Herbrügger O, Jockers-Scherübl MC, Hellweg R (2008). Current Alzheimer Research **5**:38-44.
- Schumacher J, Jamra RA, Becker T, Ohlraun S, Klopp N, Binder EB, Schulze TG, Deschner M, Schmääl C, Höfel S, Zobel A, Illig T, Propping P, Holsboer F, Rietschel M, Nöthen MM, Cichon S (2005). Evidence for a relationship between genetic variants at the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) locus and major depression. Biol Psychiatry **58**:307-314.
- Seiki RK, Gelfand DH, Stofell S, Scharf ST, Higuchi R, Horn GT, Mullis B, Erlich HA (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. Science **239**:487-491
- Selkoe DJ (2001). Alzheimer`s disease: genes, proteins, and therapy. Pharmacol Rev **81**:741-766.
- Serretti A, Kato M, De Ronchi D, Kinoshita T (2007). Meta-analysis of serotonin gene promotor polymorphism (5-HTTLPR) association with selective serotonin reuptake inhibitor efficacy in depressed patients. Mol Psychiatry **12**:247-257.
- Sheehan DV, Lecrubier Y, Sheehan KH, Amorim P, Janavs J, Weiller E, Hergueta T, Baker R, Dunbar GC (1998). The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. J Clin Psychiatry **59** [suppl 20]:22–33.
- Sheikh JL, Yesavage JA (1986) Geriatric depression scale (GDS): recent evidence and development of a shorter version. In: BRINK TL. Clinical gerontology: guide to assessment and intervention. Haworth, New York. 163-173.
- Shelton RC (2007). The Molecular neurobiology of depression. Psychiatric Clin North Am **30**:1-11.
- Shimizu E, Hashimoto k, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, Watanabe H, Shinoda N, Okada S, Iyo M (2003). Alterations in serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with and without antidepressants. Biol Psychiatry **54**:70-75.

- Sibille E, Lewis DA (2006). SERT-only involved in depression, but when? *Am J Psychiatry* **163**:8-11.
- Sjöberg RL, Nilsson KW, Nordquist N, Ohrvik J, Leppert J, Lindström L, Orelund L (2006). Development of depression: sex and the interaction between environment and a promoter polymorphism of serotonin transporter gene. *Int J Neuropsychopharmacol* **9**: 443-449.
- Sklar P, Gabriel SB, McInnis MG, Bennett P, Lim YM, Tsan G, Schaffner S, Kirov G, Jones I, Owen M, Craddock N, DePaulo JR, Lander ES (2002) Family-based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. *Mol Psychiatry* **7**:579-593.
- Skoog I (2004). Psychiatric epidemiology of old age: the H70 study – the NAPE lecture 2003. *Acta Psychiatr Scand* **109**:4-18.
- Slatkin M (2008). Linkage disequilibrium – understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Rev Genet* **9**:477-485.
- Slifer MA, Martin ER, Gilbert JR, Haines JL, Pericak-Vance (2009). Resolving the relationship between Apolipoprotein E and depression. *Neurosci Lett* **455**:116-119.
- Small SA, Gandy S (2006). Sorting through the cell biology of Alzheimer disease: Intracellular pathways to pathogenesis. *Neuron* **52**:15-31.
- Smith GS, Gunning-Dixon FM, Lotrich FE, Taylor WD, Evans JD (2007). Translational research in late-life mood disorders: implications for future intervention and prevention research. *Neuropsychopharmacology* **32**:1857-1875.
- Sociedade Brasileira de Cardiologia - Departamento de Aterosclerose (2007). IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemia e prevenção da aterosclerose. *Arq Bras Cardiologia* **88** (Supl1).

- Slatkin M (2008). Linkage disequilibrium-understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet.* **9(6)**:477-85.
- Starkstein SA, Mizrahi R, Power BD (2008). Depression in Alzheimer's disease: phenomenology, clinical correlates and treatment. *Int Rev Psychiatry* **20**:382-388.
- Stek ML, Gussekloo J, Beekman AT, van Tilburg W, Westendorp RG (2004). Prevalence, correlates and recognition of depression in the oldest old: the Leiden 85-plus study. *J Affect Disord* **78**:193-200.
- Steffens DC, Byrum CE, McQuoid DR, Greenberg DL, Payne ME, Blitchington TF, MacFall JR, Krishnan KR (2000). Hippocampal volume in geriatric depression. *Biol Psychiatry* **48**:301-309
- Sunderland T, Hampel H, Takeda M, Putnam KT, Cohen RM (2006). Biomarkers in the diagnosis of Alzheimer's disease: Are we ready? *J Geriatr Psychiatry Neurol* **19**:172-179.
- Surtess PG, Wainwright NWJ, Willis-Owen SA, Luben R, Day NE, Flint J (2005). Social adversity, the serotonin transporter (5-HTTLPR) polymorphism and major depressive disorder. *Biol Psychiatry* **59**:224-229.
- Sweet RA, Nimgaonkar VL, Devlin B, Jeste DV (2003). Psychotic symptoms in Alzheimer disease: evidence for a distinct phenotype. *Mol Psychiatry* **8**:383-392.
- Szeszko PR, Lipsky R, Mentschel C, Robinson D, Gunduz-Bruce H, Sevy S, Ashtari M, Napolitano B, Bilder RM, Kane JM, Goldman D, Malhotra AK (2005). Brain-derived neurotrophic factor *Val66Met* polymorphism and volume of the hippocampal formation. *Mol Psychiatry* **10**:631-636.
- Taylor SE, Way BM, Welch WT, Hilmert CJ, Lehman BJ, Eisenberger NI (2006). Early family environment, current adversity, the serotonin transporter promoter polymorphism, and depressive symptomatology. *Biol Psychiatry* **60**:671-676

- Taylor WD, McQuoid DR, Ashley-Koch A, MacFall JR, Bridgers J, Krishnan RR, Steffens DC (2010). *BDNF Val66Met* genotype and 6-month remission rates in late-life depression. *Pharmacogenomics J* doi:10.1038/tpj.2010.12
- Taylor WD, Steffens DC, Payne ME, MacFall JR, Marchuk DA, Svenson IK, Krishnan RR (2005). Influence of serotonin transporter promoter region polymorphisms on hippocampal volumes in late-life depression. *Arch Gen Psychiatry* **62**: 537-544.
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (1997): Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **20**:1183-1197.
- Thygesen K, Alpert JS, White HD (2007). Universal Definition of Myocardial Infarction. *Circulation* **116**:2634-2653.
- Thomas AJ, Kalaria RN, O'Brien JT (2004). Depression and vascular disease: what is the relationship? *J Affect Disord* **79**:81-95.
- Thomas K, Davies A (2005). Neurotrophins: a ticket to ride for BDNF. *Current Biol* **15**: 262-264.
- Tierney MC, Fisher RH, Lewis AJ, Zoritto ML, Snow WG, Reid DW, Nieuwstraten P (1988). The NINCDS-ADRDA Work Group criteria diagnosis of probable Alzheimer's disease: A clinicopathologic study of 57 cases. *Neurology* **38**:359-364.
- Trémeau F, Staner L, Duval F, Correa H, Crocq MA, Darre A, Czobor P, Dessoubrais C, Macher JP (2005). Suicide attempts and family history of suicide in three psychiatric populations. *Suicide Life Threat Behav* **35**:702-713.
- Triola MF (2005). *Introdução à estatística*. 9ª edição. Rio de Janeiro: LTC, 682 pg.
- Tsai SJ (2003). Brain-derived neurotrophic-factor genetic: a bridge between major depression and Alzheimer's disease? *Med Hypotheses* **61**:110-113.

- Tsai SJ, Hong CJ, Liu TY, Cheng CY, Liu HC (2001). Association study for a functional serotonin transporter gene polymorphism and late-onset Alzheimer's disease for Chinese patients. *Neuropsychobiology* **44**:27-30.
- Urani A, Choubaji S, Gass P (2005). Mutant mouse models of depression: candidate genes and current mouse lines. *Neurosci Biobehav Rev* **29**:805-828.
- V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arq. Bras. Cardiol.* [periódico na Internet]. 2007 Set [citado 2010 Mar 20]; 89(3): Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2007001500012&lng=pt. doi: 10.1590/S0066-782X2007001500012.
- van der Vlies AE, Koedam EL, Pijnenburg YA, Twisk JW, Scheltens P, van der Flier WM (2009). Most rapid cognitive decline in APOE epsilon4 negative Alzheimer's disease with early onset. *Psychol Med* **39**:1907-1911.
- Vega UM, Marinho V, Engelhardt E, Laks J (2007). Neuropsychiatric symptoms in dementias: preliminary report of a prospective outpatient evaluation in Brazil. *Arq Neuro-Psiquiatr* **65**:498-502.
- Ventriglia M, Bocchio Chiavetto L, Benussi L, Binetti G, Zanetti O, Riva MA, Gennarelli M (2002). Association between the BDNF 196 A/G polymorphism and sporadic Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* **7(2)**:136-7.
- Viana MM, De Marco L, Boson WL, Romano-Silva MA, Correa H (2006). Investigation of A218C tryptophan hydroxylase polymorphism: association with familial suicide behavior and proband's suicide attempt characteristics. *Genes Brain Behav* **5**:340-345.
- Vine AE, Curtis D (2010). Markers typed in genome-wide analysis identify regions showing deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. *BMC Res Notes* **2**:9-20.
- Vinkers DJ, Gussekloo J, Strek ML, Westendorp RGJ, van der Mast RC (2004). Temporal relation between depression and cognitive impairment in old age: prospective population based study. *BMJ* **329**:881-883.

- Weissman MM, Bland RC, Canino GJ, Faravelli C, Greenwald S, Hwu HG, Joyce PR, Karam EG, Lee CK, Lellouch J, Lépine JP, Newman SC, Rubio-Stipec M, Wells JE, Wickramaratne PJ, Wittchen H, Yeh EK (1996). Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder. *JAMA* **276**:293-299.
- Wendland JR, Martin BJ, Kruse MR, Lesch KP, Murphy DL (2006). Simultaneous genotyping of four functional loci of human SLC6A4, with a reappraisal of 5-HTTLPR and rs25531. *Mol Psychiatry* **11**:224-226.
- Whooley MA, Simon GE (2000). Primary care: managing depression in medical outpatients. *N Engl J Med* **343**:1942-1950.
- Whyte EM, Pollock BG, Wagner WR, Mulsant BH, Ferrell RE, Mazumdar S, Reynolds CF (2001). Influence of serotonin-transporter-linked promoter region polymorphism on platelet activation in geriatric depression. *Am J Psychiatry* **158**:2074-2076.
- Wilhelm K, Mitchell PB, Niven H, Finch A, Wedgwood L, Scimone A, Blair IP, Parker G, Schofield PR (2006). Life events, first depression onset and the serotonin transporter gene. *Br J Psychiatry* **188**:210-215.
- Wilson RS, Arnold SE, Beck TL, Bienas JL, Bennett DA (2008). Change in depressive symptoms during the prodromal phase of Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* **65**:439-446.
- Wong ML, Licinio J (2001). Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci* **2**: 343-351.
- Wray NR, James MR, Dumenil T, Handoko HY, Lind PA, Montgomery GW, Martin NG (2008). Association study of candidate variants of COMT with neuroticism, anxiety and depression. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **147**:1314-1318.
- Yang Y, George LK (2005). Functional disability, disability transitions, and depressive symptoms in late life. *J Aging Health* **17**:263-292.
- Yesavage JA (1988). Geriatric Depression Scale. *Psychopharm Bull* **24**:709-711.

- Young AH (2006). Antigluccorticoid treatments for depression. *Aust N Z J Psychiatry* **40**:402-405.
- Zalsman G, Huang YY, Oquendo MA, Burke AK, Hu X, Brent DA, Ellis SP, Goldman D, Mann JJ (2006). Association of a triallelic serotonin transporter gene promoter region (5-HTTLPR) polymorphism with stressful life events and severity of depression. *Am J Psychiatry* **163**:1588-1593.
- Zubenko GS, Henderson R, Stiffler JS, Stabler S, Rosen J, Kaplan BB (1996). Association of the APOE epsilon 4 allele with clinical subtypes of late life depression. *Biol Psychiatry* **40**:1008-1016.
- Zuo L, van Dyck CH, Luo X, Kranzler HR, Yang BZ, Gelernter J (2006). Variation at APOE and STH loci and Alzheimer`s disease. *Behav Brain Func* **2**:13-23.

ANEXOS

ANEXO 1

CrITÉrios diagnÓsticos para demência (DSM IV)

- A. Desenvolvimento de múltiplos déficits cognitivos manifestados tanto por (1) quanto por (2):
 - 1- comprometimento da memória (capacidade prejudicada de aprender novas informações ou recordar informações anteriormente aprendidas)
 - 2- uma (ou mais) das seguintes perturbações cognitivas:
 - (a) afasia (perturbação da linguagem);
 - (b) apraxia (capacidade prejudicada de executar atividades motoras, apesar de um funcionamento motor intacto);
 - (c) agnosia (incapacidade de reconhecer ou identificar objetos, apesar de um funcionamento sensorial intacto);
 - (d) perturbação do funcionamento executivo (isto é, planejamento, organização, sequenciamento, abstração);
- B. Os déficits cognitivos nos critérios A1 e A2 causam comprometimento significativo do funcionamento social ou ocupacional e representam declínio significativo em relação ao grau anteriormente superior de funcionamento;
- C. O curso caracteriza-se por um início gradual e um declínio cognitivo contínuo;
- D. Os déficits cognitivos nos Critérios A1 e A2 não se devem a quaisquer dos seguintes fatores:
 - 1- Outras condições do sistema nervoso central que causam déficits progressivos na memória e cognição (por ex., doença cerebrovascular, doença de Parkinson, doença de Huntington, hematoma subdural, hidrocefalia de pressão normal, tumor cerebral)
 - 2- Condições sistêmicas que comprovadamente causam demência (por exemplo: hipotireoidismo, deficiência de vitamina B12 ou ácido fólico, deficiência de niacina, hipercalcemia, neurosífilis, infecção com HIV)
 - 3- Condições induzidas por substâncias;
- E. Os déficits não ocorrem exclusivamente durante o curso de um delirium;

F. A perturbação não é melhor explicada por um outro transtorno do Eixo I ²⁶(por ex., Transtorno Depressivo Maior, Esquizofrenia).

Codificar com base no tipo de início e características predominantes:

- Com Início Precoce: se o início ocorre aos 65 anos ou antes;
 - 290.11 Com Delirium: se delirium está sobreposto à demência;
 - F00.01 - 290.12 Com Delírios: se delírios são a característica predominante;
 - F00.03 - 290.13 Com Humor Deprimido: se humor deprimido (incluindo apresentações que satisfazem todos os critérios de sintomas para um Episódio Depressivo Maior) é uma característica predominante. Excluir condições clínicas que justifiquem o quadro;
 - F00.00 - 290.10 Sem Complicações: se nenhuma das características acima predomina na apresentação clínica atual;
- Com Início Tardio: se o início ocorre após os 65 anos de idade;
 - 290.3 Com Delirium: se delirium está sobreposto à demência;
 - F00.11 - 290.20 Com Delírios: se delírios são a característica predominante
 - F00.13 - 290.21 Com Humor Deprimido: se humor deprimido (incluindo apresentações que satisfazem todos os critérios de sintomas para um Episódio Depressivo Maior) é uma característica predominante. Excluir condições clínicas que justifiquem o quadro;
 - F00.10 - 290.0 Sem Complicações: se nenhuma das características acima predomina na apresentação clínica atual;

²⁶ Transtornos psiquiátricos do eixo I: O DSM-IV organiza cada condição psiquiátrica em cinco níveis (eixos), relacionados com os diferentes aspectos da doença:

- Eixo I: Desordens clínicas, incluindo as principais doenças mentais, como também desordens de desenvolvimento ou aprendizado. Inclui depressão, transtornos de ansiedade, distúrbio bipolar, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDHD) e esquizofrenia;
- Eixo II: Condições invasivas e transtornos de personalidade, assim como retardo mental. Inclui: transtorno de personalidade *borderline*, transtorno de personalidade esquizotípica e transtorno de personalidade anti-social;
- Eixo III: Doenças mentais agudas e doenças físicas;
- Eixo IV: Fatores ambientais e psicossociais contribuintes com a doença;
- Eixo V: Avaliação global de funcionamento, ou (no caso dos menores de idade) avaliação global de funcionamento de crianças. As avaliações são feitas com base numa escala de 0 a 100.

- Com Perturbação do Comportamento

Os critérios propostos pelo NINCDS-ADRDA (Tierney e cols., 1988) são categorizados da seguinte maneira:

- DA provável;
- DA possível;
- DA definitiva.

Critérios diagnósticos da NINCDS-ADRDA para o diagnóstico de Doença de Alzheimer:

I- DA provável:

- Presença de demência estabelecida por este teste objetivo, como mini-mental ou exame similar e confirmado por exame neuropsicológico;
 - Prejuízo da memória e de pelo menos uma função cognitiva;
 - Piora progressiva da memória e outras funções cognitivas;
 - Ausência de distúrbio da consciência;
 - Início entre os 40 e 90 anos, mas mais freqüente após 65 anos;
 - Ausência de condições sistêmicas e/ou outra doença do SNC que possa justificar o déficit de memória e cognitivo progressivo;
- O diagnóstico de DA provável é apoiado por:
- Deterioração progressiva das funções cognitivas como linguagem, habilidades motoras e percepção;
 - Atividades do dia-a-dia prejudicadas e padrão de comportamento alterado;
 - História familiar de transtorno semelhante, particularmente se confirmado por exame neuropatológico;
 - Líquido céfalo-raquidiano normal, quando avaliado pela técnica padrão;
 - Eletroencefalograma normal ou com padrão inespecífico, como aumento da atividade das ondas lentas; evidência de atrofia cerebral progressiva em exames de neuro-imagem seriados;
- Outros achados clínicos consistentes com o diagnóstico de DA, após exclusão de outras causas de demência:
- Platô no curso da doença;

- Sintomas associados de depressão, insônia, incontinência, delusões, ilusões, halucinações, surtos de descontrole (verbal, emocional ou físico), mudanças no comportamento sexual e perda de peso;
 - Outras alterações neurológicas em fase avançada da doença: aumento do tônus muscular, mioclonia e desordens da marcha;
- Achados que tornam o diagnóstico de DA improvável ou incerto:
- Início súbito ou apoplético;
 - Sinais neurológicos focais, como hemiparesias, perda sensorial ou de campo visual, e incoordenação no início da doença;
 - Convulsões e distúrbios da marcha no início ou muito precoce no curso da doença;

II- DA possível:

- Feita com base na síndrome demencial, na ausência de outras alterações neurológicas, psiquiátricas ou sistêmicas insuficientes para produzir demência, mesmo diante de variações de apresentação do início ou do curso clínico;
- Pode ser feito mesmo na presença de uma segunda alteração sistêmica ou cerebral suficiente para produzir demência, mas não considerada causa de quadro demencial presente;
- Pode ser usado em pesquisa clínica quando um único e gradual déficit cognitivo progressivo é documentado na ausência de outras causas identificáveis;

III- DA definitiva:

- Preenchimento dos critérios de provável DA com comprovação histopatológica de tecido cerebral por biópsia ou autópsia;

IV- Classificação:

- Ocorrência familiar ou genética;
- Início antes dos 65 anos;

- Presença de trissomia do cromossomo 21²⁷;
- Coexistência de outras condições relevantes, como Doença de Parkinson.

²⁷ Alguns casos de DA familiar mostram evidência de associação com o cromossomo 21, com mutações no locus da APP, determinados por hiperexpressão da APP.

ANEXO 2:

Escala de Cornell para o diagnóstico de Depressão na Doença de Alzheimer:

A. Sintomas relativos ao Humor

- | | | |
|---|--|-----------------------------------|
| 1 | Ansiedade, expressão ansiosa, ruminações, preocupações | <div>avaliação impossível ▼</div> |
| 2 | Tristeza, expressão triste, voz triste, choro | <div>avaliação impossível ▼</div> |
| 3 | Ausência de reação aos eventos agradáveis | <div>avaliação impossível ▼</div> |
| 4 | Irritabilidade, facilidade em ficar contrariado, humor lábil | <div>avaliação impossível ▼</div> |

B. Distúrbios do Comportamento

- | | | |
|---|---|-----------------------------------|
| 5 | Agitação, não consegue ficar no lugar, se contorce, puxa os cabelos | <div>avaliação impossível ▼</div> |
| 6 | Lentidão psicomotora: dos movimentos, da fala, das reações | <div>avaliação impossível ▼</div> |
| 7 | Numerosas queixas somáticas (anotar ausente se apenas sintomas gastrintestinais) | <div>avaliação impossível ▼</div> |
| 8 | Perda de interesse, menor implicação nas atividades habituais (anotar apenas se a mudança ocorreu de forma rápida, em menos de 1 mês) | <div>avaliação impossível ▼</div> |

C. Sintomas Somáticos

- | | | |
|----|---|-----------------------------------|
| 9 | Perda de apetite, come menos do que usualmente | <div>avaliação impossível ▼</div> |
| 10 | Perda de peso (anotar severa se superior à 2,5 kg em 1 mês) | <div>avaliação impossível ▼</div> |
| 11 | Falta de energia, se cansa facilmente, incapaz de sustentar uma atividade (anotar apenas se a mudança ocorreu de forma rápida, em menos de 1 mês) | <div>avaliação impossível ▼</div> |

D. Funções Cíclicas

- | | | |
|----|---|-----------------------------------|
| 12 | Variações de humor durante o dia, sintomas mais acentuados pela manhã | <div>avaliação impossível ▼</div> |
| 13 | Dificuldades para dormir, dorme mais tarde do que usualmente | <div>avaliação impossível ▼</div> |
| 14 | Despertar noturno frequente | <div>avaliação impossível ▼</div> |
| 15 | Despertar matinal precoce, mais cedo do que usualmente | <div>avaliação impossível ▼</div> |

E. Distúrbios Ideatórios

16	Idéias de suicídio, pensa que a vida não vale a pena de ser vivida, deseja morrer	avaliação impossível ▼
17	Auto-depreciação, se queixa dele próprio, pouca estima de si, sentimento de fracasso	avaliação impossível ▼
18	Pessimismo, antecipação do pior	avaliação impossível ▼
19	Idéias delirantes congruentes ao humor, idéias delirantes de pobreza, de doença ou de perda	avaliação impossível ▼

Interpretação: item considerado "severo" : 2 pontos; item considerado "moderado" ou "intermitente": 1 ponto; outras respostas: 0 ponto

Total dos pontos: / 38

ANEXO 3

Critérios diagnósticos provisórios de depressão na doença de Alzheimer (NIMH):

(Olin et al, Am J Geriatr Psychiatry 2002; 10:125-128)

Três (ou mais) dos sintomas seguintes durante um mesmo período de duas semanas, que represente uma alteração em estado funcional prévio; sendo que pelo menos um dos seguintes sintomas deve estar presente: 1- humor deprimido ou 2- redução do prazer ou interesse

1. Humor deprimido clinicamente significativo (p.e: deprimido, triste, desesperançoso, desencorajado, choroso);
2. Afeto positivo ou prazer reduzido em resposta ao contato social ou às atividades usuais;
3. Isolamento social ou retraimento;
4. Alteração do apetite;
5. Distúrbio do sono;
6. Alterações psicomotoras (exemplo: agitação ou alentecimento);
7. Irritabilidade;
8. Fadiga ou perda de energia;
9. Sentimentos de menosvalia, desesperança ou culpa excessiva ou inapropriada;
10. Pensamentos recorrentes de morte, ideação suicida ou, planejamento ou tentativa de suicídio;

- B. Todos os critérios são aplicados à demência do tipo Alzheimer (DSM-IV).
- C. Os sintomas causam incômodo clinicamente significativo ou alteração funcional.
- D. Os sintomas não ocorrem exclusivamente durante o curso de um delirium.
- E. Os sintomas não se devem aos efeitos psicológicos diretos de uma substância (abuso de drogas ou medicação).
- F. Os sintomas não são explicados por outras condições como transtorno depressivo maior, desordem bipolar, luto, esquizofrenia, transtorno

esquizaafetivo, psicose da Doença de Alzheimer, transtorno de ansiedade ou transtorno relacionado a substâncias.

Especificar:

() início com co-existência: se o início antecede ou ocorre simultaneamente com os sintomas de DA.

() início após DA: início ocorre após os sintomas de DA.

Especificar:

() com psicose da Doença de Alzheimer.

() com outros sinais e sintomas comportamentais significativos.

() com história pregressa de transtorno do humor.

ANEXO 4

Metas terapêuticas e critérios diagnósticos:

Metas para terapêutica preventiva com hipolipemiantes:

Risco em 10 anos:	Meta terapêutica(mg/dl)	
	LDL-C	Não-LDL-C
Baixo risco <10%	<160	>190
Risco intermediário 10-20%	<130	<160
Alto risco ou DM >20%	<100 (opcional <70)	<130(opcional <100)
Aterosclerose significativa	<70	<100
Grupos específicos:	HDL-C	TG
Homens	≥40	<150
Mulheres	≥50	<150
Diabéticos	≥50	<150

Critérios diagnósticos de HAS segundo as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial:

Classificação	Pressão Arterial (PA)		
	Consultório	MAPA	MRPA
Normotensão	<140/90	≤130/80	≤135/80
Hipertensão	≥140/90	>130/80	>135/85
HAS jaleco branco	≥140/90	≤135/85	≤135/85
HAS mascarada	<140/90	>135/85	>135/85

MAPA- monitorização ambulatorial da PA; MRPA- monitorização residencial da PA

Critérios diagnósticos de DM:

Classificação	Valores glicêmicos (mg/dl)	
Diabetes	≥126	≥200
Tolerância à glicose diminuída	<126	140-199
Intolerância de jejum	101-126	<140
Normal	≤100	<140

ANEXO 5

Parecer do Conselho de ética em Pesquisa (COEP):

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

Parecer nº. ETIC 334/06

Interessado: Prof. Marco Aurélio Romano Silva
Departamento de Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou, *ad referendum*, no dia 29 de novembro de 2006, depois de atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado “Abordagem multidisciplinar do binômio depressão-demência no idoso” bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG

Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar - sala: 2005 - 3.270-901 - BH - MG
(31) 3499-4592 - FAX: (31) 3499-4516 - coep@cpq.ufmg.br

ANEXO 6

Termo de consentimento livre e esclarecido:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nº Registro COEP: ETIC334/06

Título do Projeto: Abordagem multidisciplinar do binômio depressão-demência no idoso

O senhor (a) está sendo convidado (a) a participar, como voluntário(a), em uma pesquisa de título: " Abordagem multidisciplinar do binômio depressão-demência no idoso"

O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que está sendo realizada. Sua colaboração neste estudo é muito importante, mas a decisão de participar deve ser sua. Para tanto, leia atentamente as informações abaixo e não se apresse em decidir. Se você não concordar em participar ou quiser desistir em qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você. Se você concordar em participar basta preencher os seus dados e assinar a declaração concordando com a pesquisa. Se você tiver alguma dúvida pode esclarecê-la com o responsável da pesquisa. Obrigado(a).

Objetivo do estudo

Este projeto está sendo proposto porque há pouco conhecimento sobre os mecanismos fisiológicos e genéticos envolvidos no processo do envelhecimento. O objetivo desse trabalho é o de estudar, em uma população brasileira, as interações clínicas, genéticas, ambientais e neurobiológicas como fatores de risco ou proteção no desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas do idoso.

A partir desta compreensão, esperamos, no futuro, desenvolver terapias que possam melhor atender aos pacientes idosos.

Procedimentos

Todos os(as) participantes pessoas com mais de 60 anos de idade, que assinarão termo de consentimento esclarecido serão considerados sujeito de pesquisa e irão seguir os procedimentos dessa pesquisa. Os únicos inconvenientes aos quais os pacientes serão submetidos serão a coleta de sangue total e o tempo gasto na avaliação do idoso. Esses procedimentos serão realização de testes psicológicos realizados por pessoas qualificadas. O desconforto da coleta de sangue é o habitual de um exame de sangue de rotina e é realizada com material estéril, descartável e por pessoas treinadas. O material colhido (máximo de 50 ml de sangue) será devidamente etiquetado e utilizado somente para os propósitos dessa pesquisa, não havendo quaisquer custos para a paciente. As informações obtidas serão objeto de estrita confidencialidade e não envolvem custos ou pagamentos de qualquer espécie.

Pesquisadores

A equipe de pesquisadores é composta pelos seguintes profissionais: Dr. Marco Aurélio Romano-Silva (coordenador da pesquisa), Dr. Edgar Nunes de Moraes, Dr. Humberto Correa, Dra. Maria Aparecida Bicalho, Dr. Luiz Armando De Marco

Confidencialidade

Todos os dados gerados nessa pesquisa serão mantidos em sigilo e apenas a equipe de pesquisadores terá acesso a eles. Os dados de cada participante receberão um código e

não terão nenhuma identificação que permita associá-lo a um participante em particular. Caso o senhor/senhora queira poderá ter acesso aos resultados individuais.

Benefícios e riscos

Esta pesquisa não oferece qualquer risco ao participante, uma vez que consiste apenas de coleta de sangue total. Esta pesquisa é sem benefício individual direto, mas as informações obtidas nos auxiliarão a melhor compreender os mecanismos envolvidos no envelhecimento.

Não haverá qualquer tipo de despesa ao paciente, no que tange a materiais ou testes. Ao assinar esse termo de consentimento o senhor/senhora não está abrindo mão de seus direitos legais.

Desligamento

A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento sem afetar seu acompanhamento médico em andamento.

Através deste documento fica assegurado o direito ao Sr(a) _____ que terá todos os esclarecimentos relativos à pesquisa, garantidos, incluindo os métodos utilizados. A partir do momento que o paciente participante da pesquisa não desejar mais fazer parte da pesquisa, reserve-lhe o direito de retirar o seu consentimento, livre de sofrer qualquer penalidade ou danos, quaisquer que sejam. Se no transcorrer da pesquisa tiver alguma dúvida, ou por qualquer outro motivo necessitar de orientações, poderá procurar um dos pesquisadores, Dr. Marco Aurélio Romano-Silva, no tel. 3409-9135 (UFMG), ou Dra. Maria Aparecida Camargos Bicalho, no telefone 3241-1848. Caso seja necessário, você pode entrar em contato com o COEP/UFMG, sito à Av. Antonio Carlos 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, Belo Horizonte – 31270-901, telefone 3499-4592, fax 3499-4027, e-mail coep@prpq.ufmg.br, onde maiores esclarecimentos poderão ser obtidos.

Eu, _____, paciente voluntário, dou consentimento livre e esclarecido, autorizo a retirada de 50 mL de sangue para que se façam os testes necessários a esta pesquisa e posterior uso e publicação dos dados nos relatórios finais e conclusivos, a fim de que estes sirvam para beneficiar a ciência e a humanidade.

Declaro, ainda, que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 20__

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador:

Nome do pesquisador:

ANEXO 7

Protocolo de extração de DNA dos leucócitos pelo método da solução salina concentrada:

Soluções:

Solução de lise de células vermelhas (pH 7.4):

155 mM NH_4Cl – 8.3 g NH_4Cl
10 mM KHCO_3 – 1.0 g KHCO_3
1 mM Na_2EDTA – 2 mL 0.5 M Na_2EDTA
Complete até 1 litro de água

Tampão de lise de núcleo (pH 8.2):

10 mM TRIS-HCl – 1 mL 2M Tris
400 mM NaCl – 16 mL 5M NaCl
1 mM Na_2EDTA – 0.8 mL 0.5M Na_2EDTA
Complete tudo para 200mL e autoclave

Solução de Proteinase K:

0.1 g de Proteinase K (200U/mg)
5 mg 10% SDS
2 mL 500mM de EDTA
43 mL de H_2O

Tampão de TE (pH 7.5)

10 mM Tris-HCl
1 mM Na_2EDTA
Autoclave o tampão

NaCl saturado

Adicione NaCl à água até que o sal não possa mais dissolver na solução (aproximadamente 6M). Autoclave.

Amostras de sangue são melhor processadas nos primeiros três dias após a venopunção.

Dia 1:

Transfira a amostra de sangue para um tubo de 50 mL contendo 30 mL de solução para glóbulos vermelhos. Sele o tubo com parafilme para prevenir o vazamento e coloque o tubo no gelo por 10-15 minutos até que o sangue comece a ficar escuro.

Centrifugue a 800 x g por 10 minutos. Despeje o sobrenadante num frasco com pequeno volume de água sanitária, sendo cuidadoso para não desprezar ou mover o pellet de células brancas. Cuidado extra deve ser tomado com amostras de sangue mais velhas que três dias; quando decantar o sobrenadante de células vermelhas, o pellet branco pode não ser distinguível. Neste caso, é sendo melhor deixar os últimos 4-5 ml de solução no tubo.

Ressuspenda o pellet de células brancas em 30 ml de solução de glóbulos vermelhos e centrifugue a 800 x g por 10 minutos. Remova o sobrenadante. Depois de lavar, o pellet branco vai ser aparente. Repita a etapa de lavagem novamente.

Ressuspenda o pellet de células brancas em 3 mL de tampão de lise de núcleo.

Adicione 200 µL de SDS a 10% e 500 µL de solução de proteinase K. Incube o lisado de células a 37°C durante a noite permitindo que a proteína cinase degrade as proteínas. Caso o pellet continue invisível, adicione de novo 500 µL de solução de proteinase K e incube a 37°C. Essa etapa vai ser necessária para sangues com mais de três dias de retirada.

Dia 2

Depois da digestão, adicione 3 mL de H₂O e 3 mL de NaCL saturado. Misture bem. Centrifugue a 1200 x g por 30 minutos para precipitar proteínas. Cuidadosamente transfira o sobrenadante para um tubo de 50 mL, evitando que o pellet de proteína flutue. No sobrenadante, adicione 2 volumes de álcool na temperatura ambiente e inverta o tubo até que o DNA seja visível. Transfira o DNA para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e lave com etanol 70%. Ressuspenda em 1 mL de tampão TE. Deixe *overnight* em “banho Maria” a 35° Celsius para ressuspender e estoque a 4°C.

ANEXO 8:

Soluções utilizadas na reação de PCR:

Tampão de incubação IIB:

- 40mM NaCl
- 10mM Tris cloridrato pH 8.4,
- 0.1% Triton X-100,
- 1.5mM de MgCl_2 .

Solução de dDNTP:

- dATP 100 mM 10 μl
- dCTP 100 mM 10 μl
- dGTP 100 mM 10 μl
- dTTP 100 mM 10 μl
- água estéril 760 μl

Tampão específico da enzima Hpa II (de acordo com o fabricante):

- 10mM Bis Tris Propane-HCl
- 10mM MgCl_2
- 1mM DTT
- pH 7.0 a 25°C

ANEXO 9

Soluções utilizadas para eletroforese em gel de poliacrilamida:

Solução de Acrilamida /Bisacrilamida 30%

- | | |
|-------------------------|--------|
| • Acrilamida | 29 g |
| • Bisacrilamida | 1g |
| • Água destilada q.s.p. | 100 ml |

Tampão TBE 10 x pH 8,3

- | | |
|-------------------------------|---------|
| • Tris base | 60.50 g |
| • Ácido bórico | 30.85 g |
| • EDTA dissódico bi-hidratado | 3.72 g |
| • Água destilada q.s.p. | 1000 ml |

Gel de poliacrilamida a 6,5%

- | | |
|---|----------|
| • Solução de Acrilamida/Bisacrilamida 30% | 1.079 ml |
| • TBE 10x | 0.65 ml |
| • Água destilada | 3.22 ml |
| • Persulfato de amônio 10% | 40 µl |
| • TEMED | 4 µl |

Tampão TBE 1x

- | | |
|------------------------|--------|
| • TBE 10 x | 10 ml |
| • Água destilada q.s.p | 100 ml |

Tampão de amostra (*Gel loading buffer*)

- | | |
|------------------------|--------|
| • Azul de bromoferol | 0.25% |
| • Xileno cianol | 0.25% |
| • Glicerol | 30% |
| • Água destilada q.s.p | 100 ml |

ANEXO 10

Soluções utilizadas na coloração pela prata:

Solução de prata (estoque)

- | | |
|--------------------|---------|
| • Nitrato de prata | 20.38 g |
| • Água destilada | 100 ml |

Solução de prata (uso)

- | | |
|----------------------|--------|
| • Solução do estoque | 10 ml |
| • Água destilada qsp | 100 ml |
| • Formaldeído 37% | 150 µl |

Revelador

- | | |
|---------------------------------|--------|
| • Carbonato de sódio | 2.97 g |
| • Água destilada qsp | 100 ml |
| • Formaldeído 37% | 150 µl |
| • Tiossulfato de sódio 10 mg/ml | 40 µl |

Deve ser utilizado quando em temperatura entre 10°C e 18°C.

Solução fixadora

- | | |
|-------------------------|---------|
| • Ácido acético glacial | 100 ml |
| • Água destilada qsp | 1000 ml |

Solução de Tiossulfato de sódio

- | | |
|------------------------|-------|
| • Tiossulfato de sódio | 10 mg |
| • Água destilada | 1 ml |

ANEXO 11

Declaração de aprovação



Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas:
Farmacologia Bioquímica e Molecular
Universidade Federal de Minas Gerais

DECLARAÇÃO

DECLARAMOS para os devidos fins, que **Maria Aparecida Camargos Bicalho** concluiu o Doutorado em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas desta Universidade, tendo defendido sua tese intitulada "*Estudo dos polimorfismos funcionais dos genes BDNF, COMT, 5HTT, e APOE no binômio depressão-demência no idoso*", aprovada em 29/04/2010. Esta declaração será válida até emissão do diploma definitivo pela UFMG. Belo Horizonte, 19 de julho de 2010.


Prof. Luiz Armando De Marco
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
Farmacologia Bioquímica e Molecular - UFMG

ANEXO 12

Ata de defesa de tese do programa de pós graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular



Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas:
Farmacologia Bioquímica e Molecular
Universidade Federal de Minas Gerais

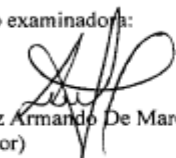
ATA DA DEFESA DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR

Aos vinte e nove dias do mês de abril de dois mil e dez, às 14:00 horas, na Faculdade de Medicina da UFMG, teve lugar a defesa de tese de **Maria Aparecida Camargos Bicalho** para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular. A tese, intitulada "*Estudo dos polimorfismos funcionais dos genes BDNF, COMT, 5HTT, e APOE no binômio depressão-demência no idoso*", foi examinada pelos professores Luiz Armando De Marco (orientador), Juliana Ramos Pimenta, Kenneth John Gollob, Edgar Nunes de Moraes e Rodrigo Nicolato (examinadores). Iniciando os trabalhos, o Professor Luiz Armando solicitou à candidata a exposição de sua tese. Em seguida, houve arguição por todos os examinadores, que se reuniram para decidir sobre o resultado final.

A candidata foi considerada APROVADA

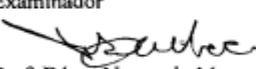
Belo Horizonte, 29 de abril de 2010

Comissão examinadora:


Prof. Luiz Armando De Marco
(Orientador)


Dra. Juliana Ramos Pimenta
Examinadora


Dr. Kenneth John Gollob
Examinador


Prof. Edgar Nunes de Moraes
Examinador


Prof. Rodrigo Nicolato
Examinador