

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ANÁLISE DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS NA PROTEÍNA
PRECURSORA DE AMILÓIDE E GENOTIPAGEM DA
APOLIPOPROTEÍNA EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO
DEFINITIVO DE DOENÇA DE ALZHEIMER**

JOÃO CARLOS BARBOSA MACHADO

BELO HORIZONTE

- 1996 -

João Carlos Barbosa Machado

**Análise de mutações somáticas na proteína precursora
de amilóide e genotipagem da apolipoproteína A em
pacientes com diagnóstico definitivo de
doença de Alzheimer**

Dissertação submetida ao Departamento de
Farmacologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial para obtenção
do grau de mestre em Ciências Biológicas.

Orientador - Prof. Luiz Armando De Marco

Belo Horizonte - Minas Gerais

1996

043

Machado, João Carlos Barbosa.

Análise de mutações somáticas na proteína precursora de amilóide e genotipagem da apolipoproteína em pacientes com diagnóstico definitivo de doença de Alzheimer [manuscrito] / João Carlos Barbosa Machado. - 1996.

94 f.: il.; 29,5 cm.

Orientador: Luiz Armando De Marco.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Farmacologia.

1. Alzheimer, Doença de - Aspectos moleculares - Teses. 2. Mutação (Biologia) - Teses. 3. Precursor de proteína beta-amiloide - Teses. 4. Apolipoproteínas - Teses. 5. Farmacologia - Teses. I. De Marco, Luiz Armando Cunha. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Farmacologia. III. Título.

CDU: 615

"ANÁLISE DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS NA PROTEÍNA
PRECURSORA DE AMILÓIDE E GENOTIPAGEM DA
APOLIPOPROTEÍNA E EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO
DEFINITIVO DE DOENÇA DE ALZHEIMER"

JOÃO CARLOS BARBOSA MACHADO

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:


RAFAEL LINDEN


ALMIR RIBEIRO TAVARES JUNIOR


LUIZ ARMANDO CUNHA DE MARCO
orientador

Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas -UFMG

Belo Horizonte, 10 de OUTUBRO de 1996.

A Verdade Dividida

“A Porta da verdade estava aberta
mas só deixava passar
meia pessoa de cada vez.

Assim não era possível atingir toda a verdade,
porque a meia pessoa que entrava
só conseguia o perfil de meia verdade.
E sua segunda metade
voltava igualmente com meio perfil
E os meios perfis não coincidiam.

Arrebentaram a porta. Derrubaram a porta.
Chegaram ao lugar luminoso
onde a verdade esplendia os seus fogos.
Era dividida em duas metades
diferentes uma da outra.

Chegou-se a discutir qual a metade mais bela.
Nenhuma das duas era perfeitamente bela.
E era preciso optar. Cada um optou
conforme seu capricho, sua ilusão, sua miopia.”

Carlos Drummond de Andrade

Aos meus pais, Geraldo e Gelcy,
razão de todas as minhas conquistas.

Agradecimentos

À todos aqueles, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Professor Luiz Armando De Marco, por sua paciência, confiança e gentileza e pelo incentivo que nos moveu a continuar, apesar das dificuldades e das minhas limitações pessoais.

À Professora Wolfanga Lentz Monteiro Boson, que soube ser mais do que mestre em ciência, que partilhou comigo muito do seu tempo precioso, da sua generosidade. Para quem nenhuma gratidão de minha parte poderá retribuir o apoio e a ajuda que me dedicou. Sem ela, este projeto não teria sido possível.

Ao Professor Eitan Friedman, pelo incentivo à nossa vida acadêmica, pelo valor que dá à Ciência e aos que a ela se dedicam, o meu sincero reconhecimento.

Aos colegas de laboratório, pela ajuda inestimável ao longo de toda a minha permanência.

À equipe do Departamento de Genética de Tel-Hashomer e, em especial a Haike Wolf-Resnik, pelo apoio técnico e grande colaboração na consecução dos experimentos durante a minha estadia em Israel.

Aos Professores Gerhard Granz Walter, Boleslaw Goldman, Michael Dasvidson, Janet Johnston, Lars Lannfelt e Sergio Ulhoa Dani por terem, gentilmente nos cedido material para as pesquisas.

Aos demais Professores do Departamento de Farmacologia, que continuam a acreditar no valor da Ciência, apesar de todos os obstáculos que encontram nos diversos momentos de preparação e realização de um trabalho científico, a minha sincera admiração.

Aos doentes de Alzheimer, cujo infortúnio exige de nós que continuemos a pesquisar o melhor conhecimento e compreensão desta moléstia, ainda que cada contribuição seja pequena e irrisória diante da dor de quem a vive.

Sumário

	Pág.
Resumo	I
Abstract	V
Lista de Tabelas	VI
Lista de Figuras	VII
I- Introdução	VIII
II - Objetivos	23
III- Material e Métodos	25
III.1- Características Histopatológicas e Clínicas dos Pacientes e Controles ..	26
III.2- Extração de DNA de tecido cerebral fresco e tecido cerebral incluído em blocos de parafina dos pacientes e controles	30
III.3- Seleção dos primers para análise de mutações nos exons 16 e 17 do gene da proteína precursora de amilóide	33
III.4- Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) dos exons 16 e 17 do gene da proteína precursora de amilóide	35
III.5- Eletroforese em gel de agarose	38
III.6- Eletroforese em gel de poliacrilamida	40
III.7- Coloração pela prata	41
III.8- Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) dos exons 16 e 17 do gene da proteína precursora de amilóide	43
III.9- Análise de restrição.....	46
III.10- Sequenciamento direto dos exons 16 e 17 do gene da proteína precursora de amilóide.....	47
IV- Resultados	49
IV.1- Análise de fusão dos exons 16 e 17 do gene da proteína precursora de amilóide	50

IV.2- Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) dos exons 16 e 17 do gene da proteína precursora de amilóide	53
IV.3- Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) dos exons 16 e 17 do gene da proteína precursora de amilóide	57
IV.4- Sequenciamento direto dos exons 16 e 17 do gene da proteína precursora de amilóide	59
IV.5- Genotipagem da apolipoproteína E através da Reação de Cadeia da polimerase (PCR)	61
V- Discussão	64
VI- Apêndices	68
Apêndice 1- Condições descritas como causas de deficit de memória ou outras alterações cognitivas.....	69
Apêndice 2- Critérios diagnósticos para demência do tipo Alzheimer do Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação Americana de Psiquiatria (DSM-IV).....	74
Apêndice 3- Critérios diagnósticos para demência na doença de Alzheimer de acordo com Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento da Classificação Internacional das Doenças - CID-10 (10ª Revisão) da Organização Mundial de Saúde	76
Apêndice 4- Critérios diagnósticos da doença de Alzheimer de acordo com “ National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association (NINDS-ADRDA) Work Group”	78
Apêndice 5- Abreviaturas.....	81
VIII- Referências Bibliográficas	82

Resumo

As bases moleculares para a doença de Alzheimer permanecem em grande parte desconhecidas, mas o depósito de amilóide em áreas específicas do cérebro é considerado como de importância na patogênese da doença. A proteína depositada é um produto de clivagem proteolítica de uma proteína precursora maior, a proteína precursora de amilóide (APP). Em um pequeno sub-grupo de pacientes com doença de Alzheimer, forma familiar, mutações de células germinativas nos exons 16 e 17 do gene APP foram demonstradas, e pelo menos uma dessas mutações foi demonstrada como responsável pelo fenótipo de doença de Alzheimer histológica em roedores transgênicos. Nossa hipótese foi de que em alguns casos de doença de Alzheimer, forma esporádica, uma mutação somática no gene APP em uma célula embriogênica comprometida com o desenvolvimento neuronal, poderia resultar no fenótipo da doença de Alzheimer. Um precedente para um padrão mosaico de mutações somáticas foi demonstrado no gene Gs Alpha em tecidos afetados de pacientes com a síndrome de McCune-Albright. Além disso, mutações de células germinativas têm sido encontradas em casos de câncer, forma familiar, semelhante à ocorrência de mutações somáticas em tumores de casos esporádicos. Usando as técnicas de reação de cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) complementadas pelo sequenciamento direto do DNA dos produtos de PCR, nós analisamos os exons 16 e 17 do gene APP em 99 tecidos cerebrais de pacientes com diagnóstico anátomo-patológico comprovado de doença de Alzheimer. Como controle positivo, nós usamos uma amostra de DNA de uma família sueca portadora de uma dupla mutação de células germinativas no exon 16 (codon 670/671). Nenhuma migração anormal foi demonstrada em nenhuma das amostras em nenhum dos exons, ao passo que a mutação conhecida foi facilmente detectada por uma banda de migração anormal. A análise de sequenciamento dos exons 16 e 17 das amostras não revelaram nenhuma alteração de sequência. A genotipagem dos alelos da apolipoproteína E nesses cérebros foi E3 - 73.9%, E4

- 22.4% e E2 - 3%, um resultado inesperado baseado em alguns (mas não todos) estudos mostrando uma forte associação entre a forma esporádica da doença de Alzheimer e o alelo E4.

Nós concluimos que as mutações nas regiões do gene APP que codificam para o depósito de amiloide no cérebro não se manifestam como mutações somáticas e que outros mecanismos levando ao depósito de amiloide, devam estar vigorando.

Abstract

The molecular basis for sporadic Alzheimer's disease remains largely unknown, but amyloid deposition in specific brain areas is thought to play a role in disease pathogenesis. The deposited protein is the proteolytic cleavage product of a large precursor protein- Amyloid Precursor Protein (APP). In a small subset of familial Alzheimer's disease patients, germline mutations in exons 16 and 17 of the APP gene were demonstrated, and at least one such mutation was shown to be responsible for histological Alzheimer's disease phenotype in transgenic mice. We hypothesized that in some cases of sporadic Alzheimer's disease, a somatic mutation in an embryonic cell committed to neuronal development within the APP gene may result in Alzheimer's disease phenotype. A precedent for a somatic, mosaic pattern of mutation has been demonstrated within the Gs Alpha gene in affected tissues of patients with McCune-Albright syndrome. Furthermore, germline mutations that are encountered in familial cancer cases, similarly occur somatically in the tumors of sporadic cases. Using the polymerase chain reaction (PCR) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) complemented by direct DNA sequencing of the PCR products, we analyzed exons 16 and 17 of the APP gene in 99 brain tissues from patients with histopathologically proven Alzheimer's disease. As a positive control, we used a germline mutation from a Swedish family with a double germline mutation in exon 16 (codon 670/671). No migration abnormalities were demonstrated in any sample in either exon, whereas the known mutation was easily detected as an abnormally migrating band. Sequence analysis of exons 16 and 17 in two samples did not reveal any sequence alterations. Genotyping of the Apolipoprotein E alleles in these brains was E3 - 73.9%, E4- 22.4% e E2- 3%, an unexpected result based on some (but not all) studies showing a strong association of sporadic Alzheimer's disease and the E4 allele.

We conclude that mutations in the regions of the APP gene coding for the amyloid deposited in the brain do not display somatic mutations and that other mechanisms leading to amyloid deposits may be operative.

Lista de Tabelas

- Tabela 1:** Critérios histológicos para o diagnóstico da doença de Alzheimer (Com base nos critérios de Khachaturian - A x200)
- Tabela 2:** Etiologias das demências expressas em percentagens de acordo com vários estudos
- Tabela 3:** Alguns dos Mecanismos etiopatogênicos propostos para a doença de Alzheimer
- Tabela 4:** Dados clínicos e anátomo-patológicos referentes aos nove pacientes japoneses portadores de doença de Alzheimer que participaram do presente estudo
- Tabela 5:** Sequência do exon 16 do gene da proteína precursora de amilóide (programa MacMelt 87)
- Tabela 6:** Sequência do exon 17 do gene da proteína precursora de amilóide (programa MacMelt 87)
- Tabela 7:** Sequência dos primers e temperatura de anelamento utilizados para a amplificação do exon 16 do gene da proteína precursora de amilóide, de acordo com o tipo de tecido cerebral utilizado para a extração de DNA
- Tabela 8:** Sequência dos primers e temperatura de anelamento utilizados para a amplificação do exon 17 do gene da proteína precursora de amilóide, de acordo com o tipo de tecido cerebral utilizado para a extração de DNA
- Tabela 9:** Condições de DGGE para os exons 16 e 17 do gene da proteína precursora de amilóide

Lista de Figuras

- Figura 1:** Estrutura da proteína precursora de amilóide(A) e a respectiva sequência genômica do DNA.
- Figura 2:** Modelo limiar da doença de Alzheimer modificado para incluir a contribuição dos fatores genéticos.
- Figura 3:** Diagrama dos polimorfismos nos exons 16 e 17 da proteína precursora de amilóide e os sítios de clivagem da APP responsáveis pela produção de β Amilóide na doença de Alzheimer.
- Figura 4:** Polimorfismo da Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer.
- Figura 5:** Gráfico para a análise das temperaturas de fusão do exon 16 do gene da proteína precursora de amilóide.
- Figura 6:** Gráfico para a análise das temperaturas de fusão do exon 17 do gene da proteína precursora de amilóide
- Figura 7:** DGGE de material genômico de DNA amplificado de 14 tecidos cerebrais (Exon 16, produtos de PCR de 190 bp, 20-60%).
- Figura 8:** DGGE de material genômico de DNA amplificado de 14 tecidos cerebrais (Exon 17, produtos de PCR de 240 bp, 30-70%).
- Figura 9:** Radiografia de dois geis de sequenciamento de parte do exon 17 do gene APP de somente um tecido cerebral feito através de dois produtos diferentes de PCR.

I - INTRODUÇÃO

*"Eu não tinha este rosto de hoje,
assim calmo, assim triste, assim magro,
nem estes olhos tão vazios,
nem o lábio amargo.*

*Eu não tinha estas mãos sem força,
tão paradas e frias e mortas;
eu não tinha este coração
que nem se mostra.*

*Eu não dei por esta mudança,
tão simples, tão certa, tão fácil:
- Em que espelho ficou perdida
a minha face?"*

Cecília Meireles

O neuropsiquiatra alemão Alois Alzheimer (1864-1915) dedicou sua carreira à investigação das alterações anatômicas relacionadas às demências. Em 1907 descreveu, juntamente com um dos seus colaboradores mais próximos, o neuropatologista também alemão, Franz Nissl, um tipo de demência que passou a ser conhecida como doença de Alzheimer (Alzheimer, 1907).

A descrição original da doença foi feita a partir de um caso de uma paciente de 51 anos de idade com demência severa e um distúrbio progressivo do comportamento que não podia ser relacionado clinicamente a qualquer doença até então conhecida. O sintoma inicial apresentado pela paciente foi de "ciume" exagerado do marido, seguindo-se perda de memória rapidamente progressiva, desorientação espacial, agressividade, agitação, além de períodos de delírios e alucinações auditivas. Após quatro anos e meio de progressão do quadro demencial, a paciente evoluiu para o óbito. A autópsia revelou atrofia cerebral generalizada sem lesões macroscópicas evidentes e à microscopia, evidenciava-se a presença de um depósito composto de uma substância peculiar em todo o córtex cerebral além de formação

intraneuronal de fibrilas densamente argirofílicas, mais tarde denominadas, respectivamente, placas senis e emaranhados neurofibrilares (Young, 1936; Lewey, 1953; Meyer, 1959).

Alzheimer não foi o primeiro a descrever as placas senis. As mesmas já haviam sido anteriormente encontradas no cérebro de pessoas idosas sem demência (McMenemey, 1963). Entretanto, Alzheimer, corretamente, observou que a presença de placas senis em grande número era anormal. Os emaranhados neurofibrilares, até então desconhecidos, foram considerados por Alzheimer como específicos do tipo de demência que acabava de descrever e classificar como forma pré-senil de demência. Posteriormente, esses emaranhados foram também observados nas chamadas demências senis e em idosos sem demência (Margolis, 1959; McMenemey, 1963; Hirano, 1962; Tomlinson, 1970). Mais recentemente, os termos senil e pré-senil foram abandonados, uma vez que não existe distinção clínica ou patológica entre as duas formas de demência antes sugeridas, que justifique tal denominação.

Durante as seis décadas subsequentes, pouca atenção científica foi dada à doença, até que, no final dos anos sessenta a doença de Alzheimer passou a ser melhor investigada, após evidências de que, a maioria das demências no idoso, não eram causadas por aterosclerose, mas sim, pelas mesmas lesões cerebrais degenerativas descritas por Alois Alzheimer.

Na tentativa de se obter um diagnóstico anátomo-patológico mais preciso da doença de Alzheimer, Blessed e Tomlinson em 1968, acharam uma relação direta entre o número de placas senis em diferentes áreas corticais e o grau de déficit cognitivo em pacientes com doença de Alzheimer. Em 1982, Wilcock e Esiri publicaram uma correlação semelhante entre a degeneração neurofibrilar e a gravidade da demência. Em 1985, Khatchaturian resumiu as recomendações de diversas entidades científicas norte-americanas em critérios diagnósticos histopatológicos que requerem a presença única de um determinado número de placas senis corticais, visíveis com técnicas histológicas específicas (tabela 1).

Tabela 1:

**Critérios histológicos para o diagnóstico da doença de Alzheimer
(com base nos critérios de Khachaturian - A x200)**

Idade	Placas senis	Localização
< 50	2 a 5 por campo	Neocórtex
50/65	8 por campo	Neocórtex
66/75	10 por campo	Neocórtex
> 75	15 por campo	Neocórtex
	Presença	Gânglios basais Amígdala Hipocampo Cerebelo Medula espinhal

*Fonte: Khachaturian ZS (1985) Diagnosis of Alzheimer's disease.
Arch Neurol 42:1097-1105*

Porém, uma pesquisa efetuada em 1989 pelo neuropatologista Wisniewski junto a uma centena de colegas, sobre os critérios que cada um empregava para o diagnóstico da doença de Alzheimer, estabeleceu que, embora todos reconhecessem o critério quantitativo, existia uma grande variação na quantidade de placas senis requerida por eles, e que só uma minoria desses profissionais não solicitava o rótulo clínico de demência antes de catalogar o preparado neuropatológico como de doença de Alzheimer.

Essa discussão é de grande relevância já que o diagnóstico acurado é de suma importância para que haja uma distinção mais clara com as demais 60 condições descritas como responsáveis por quadros demenciais (US Veterans Administration, 1989) e conseqüentemente, tornar possível a instituição do tratamento mais adequado a cada caso.

As condições descritas como responsáveis por quadros demenciais podem estar relacionadas a efeitos fisiológicos diretos de diversas condições clínicas, a efeitos persistentes do uso de determinadas

substâncias (incluindo exposição a toxinas) ou a etiologias múltiplas (Apêndice 1). Dessa forma, o termo demência não é usado como sinônimo da doença de Alzheimer ou qualquer outra doença, mas para descrever uma síndrome clínica que engloba uma série de desordens que compartilham de sintomas comuns, porém com etiologias diversas.

As demências são caracterizadas por uma redução global das funções corticais superiores, de natureza crônica, usualmente progressiva, não sendo associadas a alterações no nível de consciência, porém interferindo acentuadamente com a função social e ocupacional do indivíduo. O diagnóstico de demência não pode ser feito se os deficits cognitivos ocorrem exclusivamente durante o curso de delirium (estado confusional agudo). Os deficits cognitivos comumente observados, além dos distúrbios de memória, são a perda da orientação, compreensão, cálculo, capacidade de aprendizado, abstração, julgamento, apraxia, agnosia e afasia. Frequentemente associados a esses sintomas, encontramos labilidade do afeto ou distúrbio mais persistente do humor, redução dos padrões éticos, exagero ou emergência de traços prévios da personalidade, além de uma diminuição da capacidade de tomar decisões (Bayer, 1991; Friedland, 1992; Jarvik, 1992).

A prevalência das demências, especialmente da doença de Alzheimer e das demências vasculares, aumentam com a idade, particularmente após os 75 anos (Katzman, 1986; Larson, 1992). A prevalência estimada de demências moderadas ou severas encontra-se em torno de 10.5% nas pessoas entre 80 e 84 anos de idade e de 20.8% nas pessoas entre 85 a 89 anos de idade, de acordo com os resultados de 47 estudos epidemiológicos (Hachinski, 1992). Devido ao aumento da população de idosos em todo o mundo, as demências, conseqüentemente, têm se tornado um dos grandes problemas de saúde pública (Plum, 1979).

Estudos epidemiológicos demonstraram ser a doença de Alzheimer, a causa mais comum de demência nos países ocidentais (Strub, 1981). De acordo com estes estudos ela é responsável por cerca de 50 a 60%

dos casos de demência (Tabela 2). Segundo vários autores a doença de Alzheimer pode também ocorrer em associação às demências vasculares, em cerca de 18 a 24% dos casos de demência.

A doença de Alzheimer, dentre as doenças degenerativas é provavelmente a mais importante devido a sua elevada prevalência. Estima-se que 2 a 4% da população acima de 65 anos apresentem a doença de Alzheimer. Estima-se que no Brasil sejam em torno de 1 milhão as pessoas acometidas pela doença, tendo sido observada uma tendência de aumento desse número, uma vez que a população de idosos, que hoje é de aproximadamente 7,3 milhões de pessoas, deve atingir cerca de 18 milhões em 2020, segundo projeções do Anuário Estatístico do Brasil (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1995). Atualmente, a doença de Alzheimer é a quarta maior causa de óbito em países desenvolvidos, na faixa etária compreendida entre 75 e 84 anos de idade (Siegel, 1980). Nos Estados Unidos da América, ela é responsável por aproximadamente 100.000 óbitos/ano.

Tabela 2:
Etiologias das demências expressas em percentagens
de acordo com vários estudos

Ano	Número de pacientes	•DA	▲DV	Mista (DA+ DV ou outro tipo)*	lesão expansiva	✓HPN	Demência Alcoólica	Doença de Huntington	Doença de Creutzfeldt -Jakob	†Outra
† 1970	50	50	18	18			2			12
1975	625	40	29	24						7
1976	60	43	8		3	12	7	7		20
1977	49	44	12		5	7	9			23
1981	164	50	14		2	5	19	3		7
1984	107	69	4		2		4			21
† 1985	58	48	19	10		2				21
1985	141	50	39							11
1987	178	52	5	14	2		2			25
† 1987	65	59	9	15					3	14
1989	113	84	3	7			2			4

•DA - Doença de Alzheimer; ▲DV Demência Vascular; ✓HPN - Hidrocéfalo de Pressão Normal; †Outras - incluem toxicidade crônica, por drogas, pós-trauma, pós-hemorragia subaracnóide, encefalite, sífilis, hematoma subdural, hipotireoidismo, depressão, etc. † estudo em autópsia.
(Adaptado de Strub R, Black F W (1981) Organic brain syndromes: An introduction to neurobehavioral disorders. F A Davis, Philadelphia)

Fonte: Jarvik LF, Lavretsky EP, Neshkes RE (1992) Dementia and delirium in old age. In: Textbook of Geriatric Medicine and Gerontology, 4th edition (Brocklehurst JC, Tallis RC, Fillit HM, eds), Churchill Livingstone

Para se ter uma exata noção da importância econômico-social desta doença, os gastos diretos e indiretos em 1985, somente nos Estados Unidos da América foram de 88 bilhões de dólares, predominantemente em custos indiretos, tais como, o tempo dispendido por cuidadores, a perda de produtividade dos cuidadores e o impacto negativo na saúde do cuidador, criados durante o processo de assistência prestada (Sapienza, 1995). As projeções mais conservadoras de despesas/ano com o cuidado de pacientes dementes para 2030 atinge cifras alarmantes de cerca de 30 bilhões de dólares (Plum, 1979).

Implícito dizer que a definição de demência é puramente descritiva e baseia-se apenas em certos padrões de sinais e sintomas, já que as anormalidades histopatológicas, neuroquímicas, neurofisiológicas e radiológicas irão somente sugerir a etiologia subjacente para a síndrome demencial, servindo principalmente como guia para uma melhor abordagem terapêutica e prognóstica. Porém, as pesquisas clínicas e epidemiológicas requerem critérios diagnósticos mais específicos e internacionalmente aceitos. Neste contexto, a quarta edição do Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação Americana de Psiquiatria (DSM IV) e, a 10ª revisão da Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento, da Classificação Internacional das Doenças (CID-10), da Organização Mundial de Saúde, são os mais amplamente usados (Apêndices 2 e 3).

Uma vez estabelecido o diagnóstico de demência, através de avaliação clínica cuidadosa, baseada na história detalhada, testes psicométricos, exame físico, entrevista com um familiar próximo, propedêutica para investigação e exclusão das diversas causas de demência, feita com auxílio de exames laboratoriais, tomografia computadorizada de crânio, estudo radiológico do tórax e em certos casos análise do fluido cerebrospinal, pode-se inferir apenas o diagnóstico de provável ou possível doença de Alzheimer, já que, até o presente, inexistem alterações clínicas, laboratoriais ou radiológicas patognomônicas da doença que nos permitam fazer o diagnóstico definitivo da doença, que invariavelmente requer confirmação anátomo-patológica (Tomlinson, 1970).

As evidências neuropatológicas necessárias para corroborar o diagnóstico definitivo de doença de Alzheimer são difíceis de serem obtidas tanto, para fins de pesquisa quanto na prática clínica diária, já que dependem de um procedimento invasivo que não acarreta benefícios imediatos ao paciente, em se tratando de uma doença para a qual, até o presente, não existe nenhum tratamento eficaz. Por esta razão os critérios estabelecidos por McKahn et al., 1984 para o diagnóstico de provável doença de Alzheimer durante a vida, têm obtido ampla aceitação e têm sido comumente usados (Apêndice 4).

As alterações histopatológicas do tecido cerebral mais características e investigadas para o diagnóstico anátomo-patológico são os emaranhados neurofibrilares (compostos de filamentos helicoidais pareados), as placas senis e os infiltrados de amilóide na parede dos vasos (amilóide ou angiopatia congofílica).

Os emaranhados neurofibrilares são compostos de bandas de elementos citoesqueléticos anormais medindo 20 nm de diâmetro com constrictões regulares a cada 80 nm, denominados filamentos helicoidais pareados insolúveis (PHFs). Os neurônios acometidos desenvolvem esses emaranhados neurofibrilares que causam a morte neuronal e são, provavelmente, isoformas anormalmente fosforiladas, da proteína de microtúbulo tau (Poulter, 1993) que se tornam edemaciadas e distróficas.

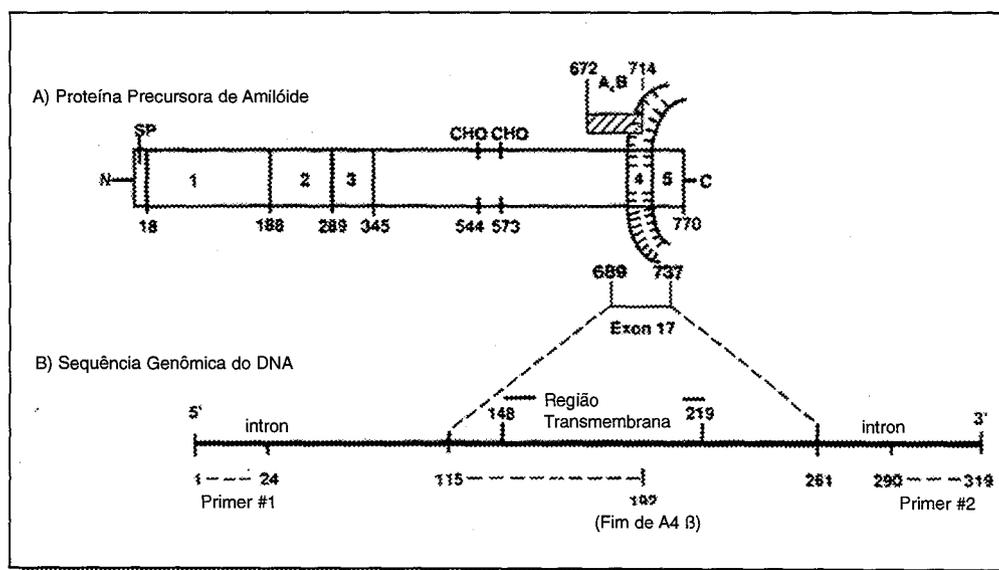
As placas senis consistem de um "core" de substância amilóide envolta por um processo de espessamento neuronal contendo PHFs e corpos densos ou multilamelares.

O peptídeo β amilóide ($A\beta$) é formado a partir da clivagem em uma região (Y) localizada na membrana e em uma região fora da membrana citoplasmática (β), anormal, da proteína precursora de amilóide ou APP (figura 1), que é uma glicoproteína de peso molecular entre 100 e 140 KD, tendo uma pequena cadeia carboxiterminal e um longo domínio extra-citoplasmático. Esse componente proteico dos depósitos amilóides, contém 39-43 resíduos hidrofóbicos, sendo denominado

peptídeo β -amilóide que é codificado por um gene localizado no cromossoma 21 (Tanzi, 1987; Goldgaber, 1987) e pode ser agregado, in vitro, e, in vivo, em fibrilas de 6-10 μ m.

A proteína precursora é encontrada em muitos tecidos de animais saudáveis e no homem, e parece ser uma importante glicoproteína de superfície celular. No presente, vários estudos estão sendo desenvolvidos, enfocando o mecanismo pelo qual a proteína precursora, normalmente encontrada no organismo, é degradada para produzir a proteína amilóide que acumula-se na doença. A função biológica do APP, nos neurônios, está ainda indefinida (Selkoe, 1994b; Kosik, 1994), havendo indicações de seu envolvimento até mesmo como um receptor, acoplado à proteína Go (Nishimoto et al., 1993).

Figura 1:
Estrutura da proteína precursora de amilóide (A) e a respectiva sequência genômica do DNA (B)



Essas anormalidades são mais severas no córtex temporal médio-basal (hipocampo e amígdala), córtex basal (núcleo septal medial, núcleo da banda diagonal de Broca e núcleo basal de Meynert), córtex parietal póstero-lateral e córtex temporal. Embora essas alterações isoladamente não sejam suficientes para o diagnóstico da doença de Alzheimer, quando acompanhadas por história clínica apropriada têm sido consideradas patognomônicas.

Outras alterações morfológicas heterogêneas, lesões citoesqueléticas, neurodegenerativas ou patológicas cerebrais que ocorrem nos casos que satisfazem os critérios histológicos para a doença de Alzheimer têm sido reconhecidas, tais como a degeneração granulovacuolar, corpos de Hirano, formação de corpos de Lewy (corpos de inclusão subcorticais e corticais hialinos, eosinofílicos, ubiquitina positivos). Evidencia-se também a perda de neurônios, especialmente das células piramidais grandes e de marcante perda da arborização sináptica, com gliose (Davies, 1987).

Embora a doença de Alzheimer seja uma doença neurodegenerativa, com seletividade para a morte das células nervosas, resultando em sintomas clínicos típicos, os mecanismos de morte celular cerebral ainda não foram esclarecidos.

Na grande maioria dos casos, a doença é considerada de origem esporádica e de etiologia desconhecida, apesar de existirem várias hipóteses atrativas sobre a sua etiopatogenia (Tabela 3). Dentre essas, incluem-se o modelo de depleção neuronal relacionada à idade, o modelo genético, e os modelos tóxico e infeccioso. Esses modelos tentam correlacionar uma série de evidências documentadas com as alterações neuropatológicas e as deposições de proteína amilóide, ubiquitina e tau encontradas na doença de Alzheimer.

A hipótese vascular e a metabólica baseiam-se no fato de que a doença de Alzheimer vem acompanhada por uma redução importante no débito sanguíneo cerebral, por redução da quantidade de oxigênio e de glicose extraídos desse sangue e da energia produzida a partir do

oxigênio e da glicose, evidenciados através de estudos como a tomografia por emissão de pósitrons (PET-Scan) e com xenônio 133. As reduções mais evidentes são aquelas que têm lugar nos lobos frontais e parietais do córtex, onde as modificações anatomopatológicas são as mais notáveis. Entretanto, resta uma indagação que a ciência ainda não tem condições de esclarecer: essa hipótese é a causa ou a consequência da deterioração?

Tabela 3:

Alguns dos Mecanismos etiopatogênicos propostos para a doença de Alzheimer

Categoria	Mecanismo proposto
Genético	Cromossomas 1, 14, 19 e 21
Vascular	Amiloidose cerebrovascular
Tóxico	Alumínio
Traumático	Traumatismo craniano
Inflamatório	Fatores reativos de fase aguda
Metabólico	Metabolismo reduzido; lesão mitocondrial
Infeccioso	Agente atípico ("vírus lento")
Degenerativo	Idade como fator de risco
Malignidade	-----

A hipótese tóxica foi aventada a partir da constatação de que substâncias inorgânicas, tais como o alumínio e o silicone, podem estar em taxas elevadas nos cérebros de portadores de doença de Alzheimer, com acúmulo sobretudo nos neurônios com degeneração neurofibrilar, em placas e emaranhados (Candy, 1986). Entretanto, relevância é questionável, já que na encefalopatia dos dializados, as concentrações de alumínio são cinco vezes aquelas da doença de Alzheimer, sem provocar lesões neurofibrilares. Também a injeção cerebral de sais de alumínio em animais provoca lesões cerebrais do tipo da degeneração neurofibrilar, mas com filamentos simples e jamais são atingidos pela doença de Alzheimer.

Traumas cranianos ocorrem mais frequentemente do que seria de se esperar do acaso na doença de Alzheimer. Esses traumas neurológicos repetidos foram associados a lesões neuropatológicas similares, mas não idênticas, às encontradas na doença de Alzheimer (Corsellis, 1978). Não se sabe ao certo por qual mecanismo neuroquímico o trauma estaria ligado às demências degenerativas. Uma hipótese aventada é a de que o trauma danifica a barreira hematoencefálica.

A hipótese infecciosa, diz que a presença de fatores reativos de fase aguda, bem como anormalidades de membrana, tais como, em células vermelhas, plaquetas, linfócitos e fibroblastos podem ser observadas em portadores da doença de Alzheimer, o que é consistente com a hipótese de um defeito microtubular na doença.

Vírus lentos têm sido investigadas em modelos animais, e implicados como responsáveis pela doença, uma analogia com o que ocorre na doença de Creutzfeldt-Jakob, Kuru e síndrome de Gerstmann-Straussler. A adição de extratos de cérebro post-mortem de pacientes portadores da doença de Alzheimer a animais produz filamentos helicoidais enrolados aos pares, reproduzindo a degeneração na doença. Entretanto não foi demonstrada a transmissão homem a homem. Caso haja realmente o vírus, ele estará na dependência de substrato genético facilitador.

A hipótese degenerativa, ou dos radicais livres, ou da depleção neuronal idade relacionada baseia-se na teoria de que a doença é acompanhada de um envelhecimento acelerado que se explica pelo excesso de superoxidodismutase (SOD), cujo gene está no cromossoma 21. O excesso de SOD leva ao excesso de peróxido de hidrogênio (radical livre) que ultrapassa as capacidades metabólicas das outras enzimas ligadas à degradação dos radicais livres. O aumento da SOD ou um transtorno no metabolismo dos derivados do oxigênio e dos radicais livres, poderia levar ao envelhecimento acelerado com surgimento de sinais histopatológicos da doença de Alzheimer.

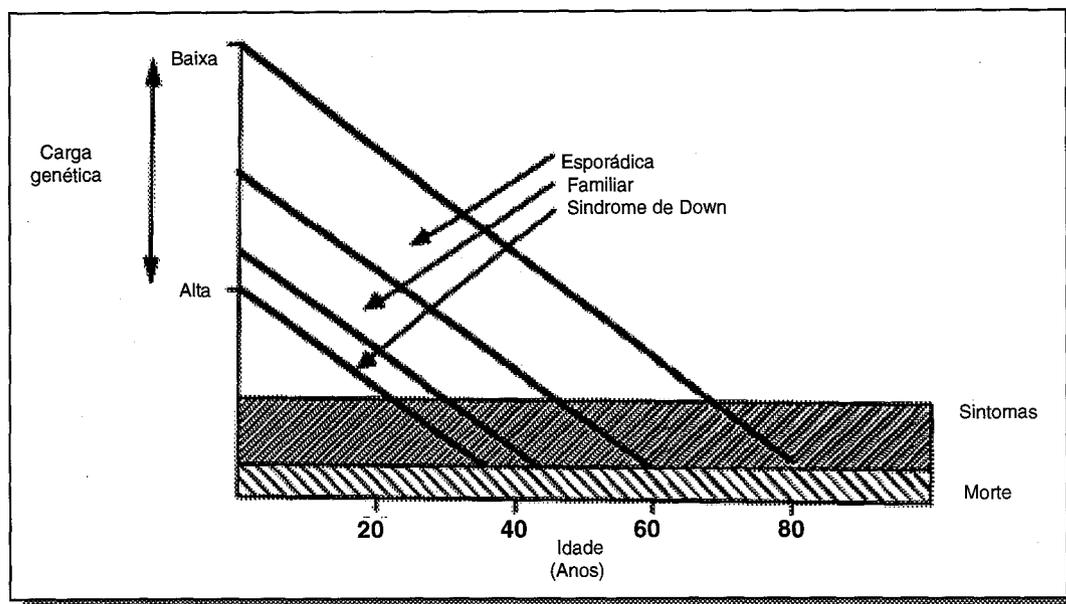
A hipótese neuroquímica diz que a nível de neurotransmissores, há um decréscimo da atividade colinérgica (Davies & Wolozin, 1987), comprovada pela perda altamente significativa de neurônios no núcleo basal de Meynert (Cummings & Benson, 1987), que é uma importante fonte suprimento colinérgico do cérebro. A atividade da enzima colina acetiltransferase, que sintetiza acetilcolina, é consistentemente reduzida nos cérebros dos pacientes com doença de Alzheimer. Porém, a perda não é específica da doença, podendo ser encontrada em outras formas de demência. As evidências de alterações a nível de outros neurotransmissores são menos claras, embora a denervação serotoninérgica e noradrenérgica tenha sido encontrada em pacientes com doença de Alzheimer falecidos em idade precoce (Bondareff et al., 1982; Thomas et al., 1988).

Outras hipóteses, tais como, a glutamatérgica, a microtubular, história de hipertireoidismo, depressão, idade materna no momento da concepção do paciente, exposição a chumbo e solventes e tabagismo poderiam também estar relacionados a doença.

Apesar de não existirem evidências de que qualquer um dos modelos propostos seja preponderante sobre os demais, recentes avanços, utilizando a biologia molecular têm ajudado a esclarecer algumas das possíveis bases moleculares da doença e sua relevância geral para as outras hipóteses (Figura 2).

A teoria genética foi aventada a partir das constatações feitas por estudos epidemiológicos da doença de Alzheimer. Esses estudos mostraram que os parentes de primeiro grau de pacientes com doença de Alzheimer têm um risco aumentado de desenvolver a doença embora a magnitude deste risco varie segundo os diversos autores (Breitner et al., 1988; Huff et al., 1988; Payami et al., 1994).

Figura 2:
Modelo limiar da doença de Alzheimer modificado
para incluir a contribuição dos fatores genéticos



Estima-se que entre 10 e 15 por cento dos casos sejam considerados como de herança familiar, usualmente forma autossômica dominante com penetração completa. Quarenta por cento dos pacientes tem parentes de primeiro grau com a doença. O risco de desenvolver a doença de Alzheimer é aproximadamente quatro vezes maior em parentes de primeiro grau de pessoas acometidas pela doença se comparados à população geral. O risco para os filhos varia desde 1.5% a 34% e para irmãos de 2 a 20%. Estudos em gêmeos relatam uma concordância de 40 a 50% (até 75 mas nunca 100%) para os monozigóticos e de 8 a 50% entre os dizigóticos. Embora estes números não falem a favor de uma simples transmissão mendeliana, há ainda inúmeros problemas para se afirmar o contrário. Provavelmente fatores não genéticos não identificados (tais como, ambientais e metabólicos) podem modificar a expressão dos fatores genéticos (Matsuyama, 1995).

A execução de uma análise de ligação clássica para se propor um modelo de transmissão genética para a doença de Alzheimer é de difícil execução. Isso ocorre por várias razões. Há uma grande dificuldade de se estabelecer com exatidão, o diagnóstico pre mortem, embora recentemente tenha sido demonstrado que a substância tropicamida pode ser útil no diagnóstico precoce da doença de Alzheimer (Scinto et al., 1994). Na grande maioria dos casos, o diagnóstico definitivo somente pode ser obtido post mortem e, por serem as suas manifestações de início tardio, são poucos os membros acometidos encontrados em uma mesma família. Dessa forma, a averiguação de casos nas gerações passadas se baseia principalmente na história familiar retrospectiva, com as incertezas inerentes de herança genética (Kukul et al., 1989).

As primeiras evidências para a contribuição genética à doença de Alzheimer se deram, inicialmente, a partir das associações observadas entre a síndrome de Down, causada pela trissomia do cromossoma 21 e a doença de Alzheimer. O fato de indivíduos acima de 40 anos de idade portadores da síndrome de Down apresentarem também placas amilóides e emaranhados neurofibrilares no córtex cerebral bem como demência, indicaram uma associação entre o cromossoma 21 e a doença de Alzheimer (Wisniewski et al., 1985). Por esses motivos, o cromossoma 21 tornou-se um dos primeiros alvos para os estudos de análise de ligação em busca de um defeito genético responsável pela forma familiar da doença.

Os estudos genéticos tiveram um grande alento quando, em 1984, Glenner et al. isolaram a substância amilóide dos vasos cerebrais e demonstraram que era composta de um pequeno peptídeo ou β proteína, com uma sequência de aminoácidos até então desconhecida, porém idêntica à encontrada nas placas senis.

A seguir, em 1987, foi realizada a clonagem e localização do gene da proteína precursora de amilóide (APP) e, concomitantemente, verificou-se que, em aproximadamente 15% dos casos da doença de Alzheimer, havia um componente familiar, usualmente de caráter autossômico

dominante com penetrância completa. A hipótese genética foi então testada em quatro famílias nas quais a doença era de início precoce e co-segregava como autossômica dominante. Os resultados obtidos confirmaram a hipótese inicial, sendo a ligação genética demonstrada entre a doença de Alzheimer e alguns marcadores polimórficos na região proximal do braço longo do cromossoma 21 (St George-Hyslop et al., 1987; Goate et al., 1989).

Em 1990, estudos de análise de ligação mostraram que a Hemorragia Cerebral Hereditária com amiloidose, tipo Holandesa, uma doença autossômica dominante, era causada por uma mutação no exon 17 do gene da APP (Levy et al., 1990). Esta doença é caracterizada por uma deposição de β amilóide predominantemente nos vasos sanguíneos cerebrais. Nesta doença, há uma transversão de G para C no codon 693, causando a substituição de ácido glutâmico por glutamina. O significado desta mutação foi corroborado por análise de ligação mostrando um "LOD" (logaritmo das chances) score de 7.59, acrescentando mais evidências para um papel importante da APP na etiologia da doença de Alzheimer.

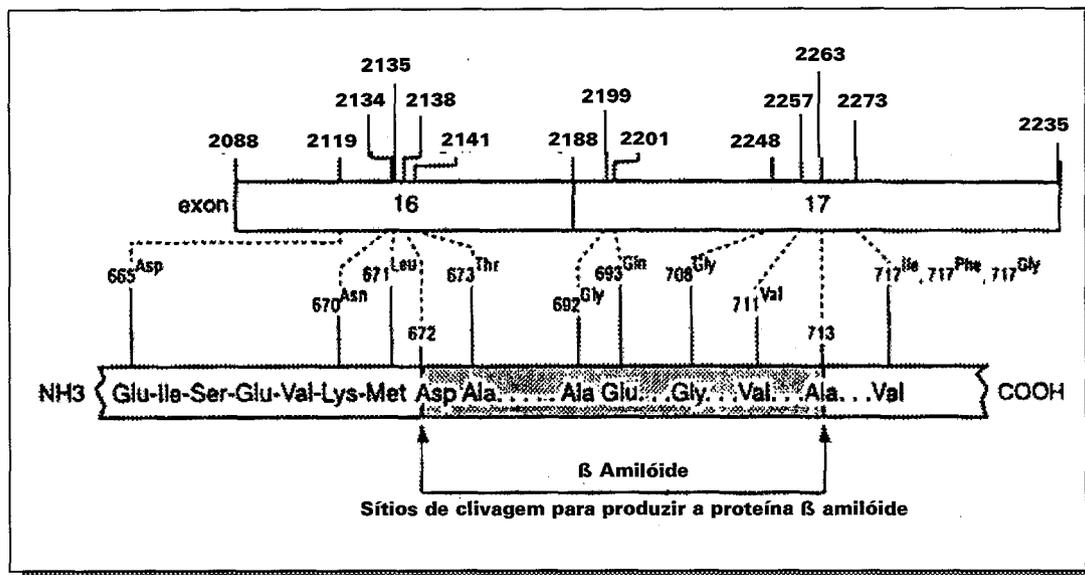
Em 1991, as bases genéticas da doença de Alzheimer tiveram novamente seu interesse despertado quando mutações no gene da APP foram descritas por Alison Goate e John Hardy. A primeira mutação no gene da APP foi descrita em pacientes de duas famílias portadoras da doença de Alzheimer, causando uma alteração do aminoácido valina para isoleucina no codon 717 do gene da APP, resultando em um clivagem anormal do APP e produzindo assim o peptídeo β -amilóide encontrado frequentemente nas placas senis e vasos cerebrais dos pacientes acometidos pela doença de Alzheimer. Subsequentemente, quatro novas mutações foram encontradas em famílias isoladas, perfazendo um total de oito famílias com mutações no codon 717 do gene da APP.

Até o momento, as mutações presentes no gene da APP são as seguintes (Figura 3): codon 717 (Chartier-Harlin et al., 1991), codons 670/671, uma dupla mutação descrita em uma família sueca (Mullan et al., 1992);

codons 692 ou 693, que alteram o depósito de amilóide do parênquima cerebral para o sistema vascular cerebral (Murrell et al., 1991), codons 713 e 715 (Jones et al., 1992; Carter et al., 1992) e codon 665 (Peacock et al., 1994).

Figura 3:

Diagrama dos polimorfismos nos exons 16 e 17 da proteína precursora de Amilóide e os sítios de clivagem da APP responsáveis pela produção de β Amilóide na doença de Alzheimer



Entretanto, vários outros estudos em casos de doença de Alzheimer, na sua forma familiar de início precoce ou tardio, e mesmo na sua forma esporádica, não demonstraram nenhuma mutação no gene da APP (Schellenberg et al., 1988). Mais recentemente, Citron et al., 1994, demonstraram que a produção da proteína β amilóide está significativamente aumentada nos fibroblastos de pacientes portadores da forma familiar da doença de Alzheimer que apresentam a dupla mutação K670N e M671L, acrescentando mais evidências para um papel relevante da APP na etiopatogênese da doença de Alzheimer.

Esses achados iniciais mostrando a deposição cerebral de β amilóide sugeriam ser esse um evento central importante no desenvolvimento da doença de Alzheimer. Obviamente, outras causas, genéticas e ambientais, deveriam modular a produção e deposição de β amilóide, já que mutações no gene da APP não foram suficientes para explicar a doença. Essa idéia levou Strittmater et al. (Yu C-E et al., 1994) a procurar por proteínas que se ligassem à β amilóide no líquido cefaloraquidiano. Após vários estudos com cruzamentos positivos e negativos, eles identificaram a apolipoproteína E (Apo E) como tal.

A Apo E, localizada no braço longo do cromossoma 19 (Corder et al., 1993) havia sido anteriormente identificada como um componente das neurofibrilas e emaranhados. Estudos de análise de ligação haviam demonstrado um locus para a doença de Alzheimer em sua forma mais tardia, nessa região do cromossoma 19 (Pericak-Vance et al., 1991).

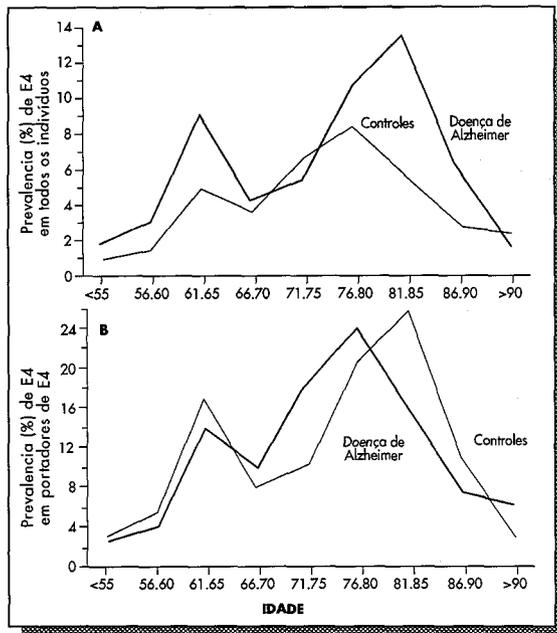
A apolipoproteína E é geneticamente muito variável e tem três alelos maiores, E2, E3 e E4. O alelo E3 é o mais comum, sendo que mais de 90% da população herda uma cópia e 60% herda duas cópias do gene. Por outro lado somente 30% da população herda pelo menos um alelo E4.

A presença do alelo E4 além de ser um potente fator de risco para a doença coronariana e acidente vascular cerebral através de sua ação no metabolismo do colesterol ocorre em 80% dos casos de doença de Alzheimer, forma familiar, de início tardio e, em 64% na forma esporádica como demonstrado por diversos estudos (Figura 4).

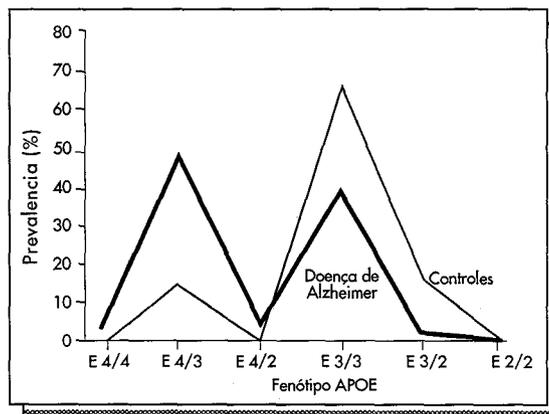
Atualmente, sabe-se que indivíduos que têm a doença de Alzheimer e são homozigotos para o alelo E4 têm uma maior deposição de amilóide (Schemechel et al., 1993). Sabe-se ainda que pacientes com a mutação no gene da APP e presença do alelo E4, apresentam a doença mais precocemente (Nacmias et al., 1995). Além disso, as pessoas com duas cópias dos alelos E4 têm maior probabilidade de desenvolver a doença. O risco para a doença

Figura 4:
Polimorfismo da Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer

A- Distribuição do alelo E4 de acordo com a idade



B- Distribuição do fenótipo ApoE na doença de Alzheimer e em controles octogenários sen a doença de Alzheimer



Fonte: Poirier J, et al (1993) Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. Lancet 342: 697-699

aumentou de 20 para 90% e a média de idade de início diminuiu de 84 para 68 anos, com o aumento do número de alelos E4. O risco para elas é pelo menos oito vezes maior do que para as pessoas sem o gene E4. Os homozigotos do Apo E4 vão certamente desenvolver a doença aos 80 anos.

Um mecanismo proposto por Roses et al. (Small, 1995) é de que o risco é aumentado não por uma ação deletéria da Apo E4, mas pela ausência da Apo E3. A Apo E3 parece que estabiliza os microtúbulos (filamentos de proteínas necessários para o funcionamento neuronal normal) ligando-se a proteína tau, uma proteína associada aos microtúbulos, importante na polimerização e estabilização dos mesmos, prevenindo assim o aumento anormal de grupos fosfato e protegendo os microtúbulos e a integridade da célula. A fosforilação diminui a eficiência da Tau e a Tau hiperfosforilada é o maior constituinte dos filamentos helicoidais aos pares que constituem as neurofibrilas.

Essa associação, porém, deverá ser mais investigada pois ainda não foi demonstrada a presença de mutações no gene da Apo E nos pacientes com a doença de Alzheimer (Seeman et al., 1995).

Além das associações entre os cromossomas 21 e 19 e a doença de Alzheimer, a partir de 1992 foram encontradas evidências de co-segregação com um locus identificado do cromossoma 14 (Mullan et al., 1992; van Duijn et al., 1994).

Recentes descobertas apontam para uma nova família de genes, as presenilinas, que são provavelmente responsáveis pela maioria dos casos de doença de Alzheimer, forma familiar, de início precoce (Sherrington et al., 1995; Levy-Lahad et al., 1995). São duas as presenilinas identificadas, a presenilina 1 (PS1), localizada no cromossoma 14, e a presenilina 2 (PS2), localizada no cromossoma 1. As duas proteínas são 67% idênticas.

Até o momento, 24 mutações foram identificadas na presenilina 1, cromossoma 14 em 52 famílias (Sherrington et al., 1995; Wasco et al., 1995; Alzheimer's Disease Collaborative Group, 1995; Sorbi et al., 1995; Tanahashi et al., 1995; van Broeckhoven et al., 1995; Campion et al., 1995; Cruts et al., 1995) . Duas outras mutações foram detectadas na presenilina 2 em oito famílias. As duas mutações identificadas na PS2 são ocasionadas por uma simples substituição de aminoácidos, Asparagina para isoleucina no aminoácido 141, em 7 famílias alemães-olga (Levy-Lahad et al., 1995) e metionina para valina, no aminoácido 239 em 1 família italiana (Rogaev et al., 1995)

Os avanços científicos sobre a doença de Alzheimer têm esbarrado na falta de um modelo experimental adequado. Algumas cepas de roedores transgênicos têm sido produzidas para expressar o gene da APP humana (Quon et al., 1991) mas infelizmente, até o início de 1995, não havia sido possível expressar adequadamente, nesses roedores, as lesões do tipo placa senil, distrofia neuronal e extensa gliose. Em um trabalho elegante publicado em fevereiro de 1995, o grupo liderado por Lieberburg conseguiu expressar a neuropatologia da mutação V717F em camundongo transgênico 938. Esse modelo acrescentou certamente mais evidências para um papel importante do gene da APP na etiopatogenia da doença de Alzheimer.

Apesar do comprovado envolvimento da APP, da Apo E4 e, mais recentemente da PS1 e PS2, na etiologia da doença de Alzheimer, não está estabelecida ainda a relevância e a real participação de cada um desses genes na patogênese da doença, que são ainda razão de extenso debate.

Até o presente, a grande maioria dos estudos desses genes, tanto na forma familiar quanto na forma esporádica da doença, foi realizada com DNA extraído de tecido periférico de pacientes acometidos pela doença, sendo poucos os estudos feitos com DNA extraído de tecido cerebral com diagnóstico definitivo da doença de Alzheimer. Os estudos em tecido cerebral são de grande importância pois podem evidenciar mutações somáticas em células embriogênicas comprometidas com o

desenvolvimento neuronal responsáveis pelo fenótipo da doença de Alzheimer, que seriam somente detectadas em tecido alvo da doença e não em células germinativas ou mesmo em áreas do cérebro não acometidas. Um precedente para um padrão mosaico de mutações somáticas foi demonstrado no gene Gs Alpha em tecidos afetados de pacientes com a síndrome de McCune-Albright (Weinstein et al., 1991). Além disso, mutações de células germinativas têm sido encontradas em casos de câncer, forma familiar, similarmente à ocorrência de mutações somáticas em tumores de casos esporádicos.

II - OBJETIVOS

- Investigar as possibilidades de existência de mecanismos moleculares responsáveis pela doença de Alzheimer, forma esporádica. Para tanto, a genotipagem da apolipoproteína E (Apo E) e a análise de mutações somáticas nos exons 16 e 17 do gene da proteína precursora de amilóide (APP) foram pesquisadas através de análise de tecido cerebral de pacientes com diagnóstico definitivo de doença de Alzheimer, forma esporádica.

- Esse estudo pretende esclarecer se as mutações encontradas anteriormente no gene da proteína precursora de amilóide (APP) em pacientes portadores de doença de Alzheimer, forma familiar, existem em pacientes portadores da doença de Alzheimer, forma esporádica, mesmo na ausência de mutações em células germinativas ou em outras áreas do cérebro não acometidas pela doença. Pretende-se também estudar a relação entre a susceptibilidade para desenvolver a doença de Alzheimer e a genotipagem da apolipoproteína E e sua contribuição para o melhor entendimento da etiopatogenia da doença de Alzheimer.

III - MATERIAL E MÉTODOS

III.1- Características Histopatológicas e Clínicas dos Pacientes e Controles

Foram selecionados 99 pacientes que haviam falecido por causas diversas, porém com o diagnóstico clínico pre morte de demência do tipo Alzheimer, de acordo com os critérios estabelecidos pelo Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação Americana de Psiquiatria (DSM-IV), quarta edição e CID-10, descritos nos apêndices 2 e 3.

Estes pacientes foram também classificados como prováveis portadores da doença de Alzheimer, de acordo com os critérios diagnósticos do National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) Work Group, descritos no apêndice 4.

Para o diagnóstico clínico, os pacientes foram submetidos a uma avaliação minuciosa, incluindo aplicação de testes psicométricos (Folstein, 1985), exames laboratoriais e radiológicos, tendo sido excluídas as demais causas de demência, de acordo com os critérios padronizados.

A partir dos achados clínicos, curso da doença e história familiar, todos os pacientes foram classificados como portadores da forma esporádica da doença de Alzheimer.

O consentimento dos pacientes ou de seus responsáveis foi obtido por escrito para participação neste estudo.

Após o óbito, todos os pacientes foram autopsiados. Amostras de tecido cerebral foram analisadas através de estudo histopatológico. Em todos os casos foi confirmado o diagnóstico histopatológico da doença de Alzheimer, de acordo com critérios padronizados (Corsellis, 1962; Blessed et al., 1968; Hyman et al., 1984; Khachaturian, 1985) seguidos pelos Drs., A. Hori, do Instituto de Neuropatologia de Hanover e, K. Ikeda, da Divisão de Neuropatologia do Instituto de Psiquiatria de Tokyo.

Tais critérios foram previamente padronizados considerando-se a análise quantitativa das placas senis e emaranhados neurofibrilares. O número mínimo de áreas avaliadas incluíram três regiões do neocórtex (lobos frontais, temporais e parietais), amígdala, formação hipocampal, gânglios da base, substância negra, córtex cerebelar e medula óssea. Para se estabelecer o diagnóstico de doença de Alzheimer "pura", os patologistas inicialmente excluíram qualquer outra causa orgânica de demência. De acordo com os critérios estabelecidos, os emaranhados neurofibrilares estavam sempre presentes, apesar de algumas vezes não serem encontrados no neocórtex de pacientes com mais de 75 anos. Na análise microscópica com magnificação de 200x, o número mínimo de placas senis encontradas por campo foi de 8, 10 ou 15 para pessoas com idades entre 50 e 65 anos, entre 66 e 75 anos ou acima de 75 anos, respectivamente. Os casos severos de doença de Alzheimer apresentavam 50 a 100 placas senis por campo (com magnificação microscópica de 10x) e 5 a 15 emaranhados por campo (com magnificação microscópica de 40x).

As evidências histopatológicas, aliadas ao diagnóstico clínico prévio de provável doença de Alzheimer, tornaram possível a confirmação do diagnóstico definitivo da doença de Alzheimer, de acordo com os critérios diagnósticos do National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) Work Group.

Foram analisados 77 pacientes norte-americanos, 13 pacientes alemães e 9 pacientes japoneses. Os dados referentes a esses pacientes citados, bem como suas respectivas amostras de tecido cerebral, foram gentilmente cedidas pelo Brain Bank do Mount Sinai Medical Center (Nova York, Estados Unidos da América), pelo Instituto de Neuropatologia de Hanover (Hanover, Alemanha), e pelo Instituto Metropolitano de Psiquiatria de Tokyo (Tokyo, Japão). A idade de falecimento dos pacientes norte-americanos variou entre 65 e 98 anos e dos pacientes japoneses, entre 63 e 79 anos. Outras informações referentes aos pacientes japoneses encontram-se melhor descritas na tabela 4.

As amostras de tecido cerebral obtidas dos pacientes norte-americanos foram de tecido cerebral, fresco, enquanto que as amostras de tecido cerebral obtidas dos pacientes japoneses e alemães foram de tecido cerebral, incluído em blocos de parafina.

Tabela 4:

Dados clínicos e anátomo-patológicos referentes aos nove pacientes japoneses portadores de doença de Alzheimer que participaram do presente estudo

Sexo	Idade do início dos sintomas	Tempo entre a morte e a autópsia	Idade de morte
Masculino	53	2 horas	63
Feminino	62	4 horas	78
Feminino	59	6 horas	69
Masculino	63	?	73
Masculino	62	?	79
Feminino	58	4,5 horas	68
Feminino	48	6 horas	62
Feminino	61	4,5 horas	72
Masculino	56	1,5 horas	66

Todas as amostras obtidas para esse estudo, foram de áreas do cérebro que apresentavam clara correspondência com a doença de Alzheimer, através dos seus achados histopatológicos típicos acima descritos. As amostras de tecido cerebral dos pacientes japoneses e norte-americanos foram obtidas de secções de cortex frontal e da formação hipocampal. O mesmo ocorreu com os pacientes alemães, exceto em dois casos, cujas amostras foram obtidas apenas a partir do córtex frontal.

Dez outras amostras de tecido cerebral fresco foram devidamente analisadas e selecionadas para servirem como controle negativo. As mesmas foram obtidas de pacientes escolhidos aleatoriamente, também falecidos por causas diversas, porém, sem diagnóstico clínico de doença de Alzheimer, pre mortem, e isentos de qualquer indício histopatológico típico da doença de Alzheimer, à autópsia.

Uma amostra de tecido cerebral obtida de um paciente sueco portador da forma familiar, de início precoce, da doença de Alzheimer, foi também selecionada para servir de controle positivo. O paciente era portador de uma mutação dupla, nas posições 2010 e 2011 dos codons 670/671, do exon 16 do cromossoma 21 (Axelman et al., 1994).

III.2- Extração de DNA de tecido cerebral fresco e tecido cerebral incluído em blocos de parafina dos pacientes e controles

O DNA genômico foi extraído à partir de tecido cerebral fresco e tecido cerebral incluído em blocos de parafina.

A extração de DNA genômico dos tecidos incluídos em blocos de parafina foi feita adaptando-se os métodos descritos por Lerman et al., 1984 e Greer et al., 1991.

Inicialmente foram feitas cinco a sete secções adjacentes (5 µm), em cada bloco de tecido cerebral dos pacientes mencionados e montadas em lâminas de vidro. A secção média foi corada com hematoxilina-eosina (HE) e serviu como guia para facilitar a separação nítida do tecido cerebral lesado, dos demais tecidos adjacentes ou circundantes.

Após a remoção dos tecidos adjacentes normais e do excesso de parafina, o tecido cerebral lesado restante na lâmina de vidro, foi raspado com lâmina de barbear nova e transferido para tubos do tipo eppendorf (Sigma Co, USA) de 1.5 ml, previamente identificados.

Esse tecido cerebral foi então incubado em 500 µl de octano, à temperatura ambiente, sob rigorosa agitação, durante 30 minutos e então centrifugado a 9000 x g (velocidade máxima) por 15 minutos. Após descartar o sobrenadante de cada um dos tubos, os precipitados formados sofreram duas extrações consecutivas com 500 µl de etanol absoluto seguidas respectivamente de duas centrifugações, em velocidade máxima, por 15 minutos cada. Os tubos foram então submetidos a secagem à vácuo por 15 minutos e logo após os precipitados formados foram ressuspensos em 100 µl de tampão de digestão (Tris 50 mM- ph 8.5; EDTA 1mM; Tween 20 0.5%) contendo 0.2 mg/ml de proteinase K - concentração final) e incubados a 37° C overnight .

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 9000 x g durante 15 minutos e posteriormente os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos do tipo eppendorf de 1,5 ml e finalmente aquecidos a 95° C por oito minutos. O material extraído foi então dosado e armazenado a 4° C.

O doseamento do DNA extraído foi feito por espectrometria na região do ultravioleta. As amostras foram diluídas em água destilada e a leitura direta foi feita em espectrofotômetro digital (Shimadzu UV-160 A, UV-visible recording spectrophotometer, Japão) a 260 e 280 nm (proteína e proteína + DNA, respectivamente), sendo usado, como controle negativo, a mesma água utilizada para a diluição das amostras. Para o cálculo da concentração de DNA na amostra, a leitura a 260 nm foi subtraída da leitura a 280 nm, de modo a se obter a absorbância apenas produzida por ácido nucleico e o cálculo foi feito através de fórmula deduzida a partir da Lei de Beer. Como não foi utilizado padrão de DNA com concentração definida, considerou-se nos cálculos o coeficiente de extinção tabelado para DNA de Fita dupla (1 UA+ 50µg/ml) (Sambrook et al., 1989).

Concentração de DNA=(A260 - A280) x fator de diluição x coeficiente de extinção

A extração de DNA de tecido cerebral fresco foi obtida adaptando-se os métodos descritos por Sambrook et al., 1989.

Inicialmente, o tecido cerebral fresco foi lavado com tampão contendo 10mM de NaCl e 10mM de EDTA. A seguir, cerca de 5 g de cada amostra foram trituradas separadamente em um gral, parcialmente coberto por nitrogênio líquido (usando luvas térmicas e proteção ocular). Quando o tecido adquiriu uma consistência de pó, foi transferido para um tubo de centrífuga (Falcon-Corning USA) com 50 ml de capacidade. Após esperar o tempo necessário para que a evaporação de nitrogênio ocorresse, adicionou-se então 10 ml de tampão contendo 10 mM Tris, pH 7.4, 10 mM de NaCl e 25 mM de EDTA, pH 7.4 (1X RSB). A seguir, adicionou-se 1 ml de uma solução de dodecil sulfato (SDS) a 10%, ocorrendo a liberação do DNA do núcleo. A proteinase K foi então

adicionada na concentração de 50mg/ml em volume de 100 µl por amostra. Logo após, as amostras foram incubadas, sob agitação, à temperatura de 37 °C por 1 hora, até que o tecido estivesse completamente dissolvido. Seguiu-se nova adição de 100µl, de proteinase K, na mesma concentração, e dessa vez, a incubação foi feita a 37°C, overnight.

No dia seguinte, adicionou-se 1ml de NaCl 5M a cada uma das amostras. Dando prosseguimento à extração, adicionou-se igual volume de uma mistura de fenol saturado - clorofórmio - álcool isoamílico (10:10:1), misturando-se os tubos, por inversão, 4 ou 5 vezes e, em seguida, centrifugando-os durante 5 minutos, a 1600 x g.

Após repouso dos tubos em tempo suficiente para haver separação de fases, retirou-se a fase aquosa superior transferindo-a para um novo tubo de centrífuga (Falcon-Corning USA) de 50 ml de capacidade. Seguiu-se nova extração da fase aquosa, agora com dois volumes de eter etílico saturado com água destilada (1:1). A fase superior etérea foi aspirada e a fase inferior aquosa, conservada. Os tubos foram então mantidos abertos por cerca de 30 minutos, e encubados a 70°C para que ocorresse a evaporação do eter restante. A seguir foram adicionados 2.5 volumes de etanol absoluto, em cada tubo, com o objetivo de precipitar o DNA. Os tubos foram então mantidos a -20°C, overnight.

No próximo dia, os tubos foram centrifugados durante uma hora, a 12000 x g. Logo após foi desprezado o excesso de etanol e seu resíduo eliminado com auxílio de gaze esterilizada. Os precipitados resultantes foram ressuspensos em 500 a 1000 µl de tampão TE 20X contendo 1M de Tris base, 1M de ácido bórico, 20mM de EDTA-Na₂ 2H₂O. Finalmente, os tubos foram estocados a 4 °C.

III.3- Seleção dos primers para análise de mutações nos exons 16 e 17 do gene da proteína precursora de amilóide

Após realizada satisfatoriamente a extração de DNA das amostras de tecido cerebral pelas técnicas descritas, procedeu-se à escolha dos primers adequados a serem utilizados na investigação da existência de mutações no gene APP.

Primers são sequências de polinucleotídeos, complementares a sequências de oligonucleotídeos que delimitam um dado segmento que se deseja amplificar.

A escolha correta dos primers é de fundamental importância para o sucesso da amplificação de fragmentos de DNA pela técnica de reação de cadeia da polimerase que será descrita na seção III.4 e, também, para a produção de material adequado para análise de mutação genética, por diversas técnicas, incluindo a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), que será descrito, na seção III.6, e o sequenciamento direto que será descrito na seção III.10.

A seleção dos primers adequados baseou-se na análise das propriedades de fusão teóricas de cada fragmento amplificado, à partir das informações fornecidas pelo algoritmo computadorizado desenvolvido por Lerman et al., 1987, com auxílio do programa MacMelt (Bio-Rad, Richmond, CA).

Essa análise torna possível determinar regiões nas quais um número considerável de bases contíguas (50 a 300bp) apresente comportamento semelhante, com uma faixa estreita de temperaturas de fusão (melting domain). Os mapas de temperatura de fusão predizem, em todos os casos, que a região de interesse do produto de PCR amplificado (p.ex., o exon e as sequências intrônicas flanqueadas) estará contida num

único domínio de baixa temperatura de fusão. Por consequência, mutações que ocorram dentro dessas regiões mais provavelmente serão detectadas pela técnica de DGGE.

Com o objetivo de assegurar-se que a escolha dos pares de primers a serem utilizados fosse a mais efetiva possível, levou-se em conta também outros aspectos importantes, descritos a seguir:

- escolha de sequências feita, sempre que possível, de forma a proporcionar uma distribuição aleatória de bases, com proporção de purinas e pirimidinas de aproximadamente 1:1;

- emprego de regiões onde não existam grandes repetições de bases, ou outras sequências pouco usuais, e também capazes de formar estrutura secundária significativa, particularmente na região 3' terminal, para que a extensão da cadeia pela enzima não seja dificultada;

- utilização de sequências não palindrômicas garantindo-se a não ligação de um primer a si próprio no sentido inverso, impedindo a delimitação do fragmento desejado;

- ausência de complementariedade entre as sequências dos primers utilizados evitando a ocorrência de dimerização dos dois primers.

III.4- Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) dos exons 16 e 17 do gene da proteína precursora de amilóide

O DNA obtido foi utilizado na reação de cadeia da polimerase (PCR) para se produzir cópias dos genes em estudo. A técnica foi descrita pela primeira vez por Saiki et al. em 1985 (Carman, 1991), e consiste na replicação in vitro de fragmentos específicos de DNA por uma DNA polimerase. A maior vantagem desta técnica é sua sensibilidade bastante alta, sendo capaz de identificar e reproduzir uma dada sequência de bases em meio a aproximadamente 100.000 outras moléculas de ácidos nucleicos, permitindo a utilização de amostras de DNA que não sofreram processo rigoroso de purificação (Saiki, 1989).

O material obtido na reação é bastante específico, havendo pouca probabilidade de obter-se outras regiões do genoma, ou mesmo de haver algum erro na incorporação de bases pela enzima. O resultado é um produto relativamente puro contendo, basicamente, a região de interesse em concentração consideravelmente elevada, sem haver a necessidade de clonagem, crescimento de células e posterior purificação do material desejado.

Desde a sua introdução, o PCR tem sofrido modificações, no sentido de se melhorar as condições da reação, para obter-se melhores resultados. A maioria das sequências de DNA podem ser amplificadas seguindo-se um protocolo padrão, que utiliza pares de oligonucleotídeos ou primers que delimitem o segmento desejado e funcionem como iniciadores da reação, uma solução de deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) e uma DNA polimerase termoestável, adicionados de aproximadamente 500ng da amostra de DNA a ser amplificado, em tampão de incubação específico.

No caso dos primers, a escolha, nesse estudo, se baseou nos fatores descritos na seção III.3 de modo a se produzir material adequado para análise de mutação genética.

Na reação de cadeia da polimerase, a amplificação do fragmento de DNA escolhido processa-se por etapas (SaiKi, 1989; Innis et al., 1989). A reação é iniciada com o aquecimento da mistura reativa até uma temperatura de 95° C, quando ocorre a desnaturação das fitas de DNA.

O passo seguinte é o resfriamento controlado do material até uma temperatura definida, denominada temperatura de anelamento. Essa temperatura é variável para cada par de primers, de acordo com seu comprimento e quantidade de GCs. Ao se atingir esta temperatura, os primers hibridizam com o DNA nas regiões de sequência complementar à sua.

Após o anelamento dos primers, o material é novamente aquecido, atingindo 70 a 75°C, para permitir a extensão dos primers hibridizados sob a ação da taq polimerase que tem melhor atividade nessa faixa de temperatura. Nessa fase, a extensão ocorre quando os dNTPs são incorporados aos primers formando uma nova fita de sequência complementar à da fita molde.

Estas etapas são repetidas várias vezes, resultando em um acúmulo exponencial do fragmento específico.

Nesse estudo, a temperatura de anelamento foi determinada experimentalmente para cada tipo de reação, tomando-se como base uma projeção teórica, calculada à partir da quantidade de bases de cada primer. A cada nucleotídeo foi atribuído um valor numérico, de acordo com seu grau de coesão (A/T=2 ; C/G=4). Foram somados os valores de cada base, subtraindo-se 5 unidades ao final do cálculo, obtendo-se assim o valor da temperatura de anelamento calculada para determinado primer. Foi feita a média dos valores calculados, obtendo-se assim a temperatura de anelamento calculada para o par de primers.

À partir desse valor calculado, foram feitos testes de condição de reação, variando-se inicialmente os componentes do meio (presença/ausência de aditivos), mantendo-se a temperatura de anelamento constante. Alguns aditivos, tais como, DMSO, triton, formamida, variações na concentração de cloreto de magnésio, foram acrescentados na tentativa de aumentar a especificidade da reação.

Posteriormente, foram feitos testes de condição de reação variando-se a temperatura de anelamento, de forma a se eliminar amplificação de fragmentos inespecíficos e obter apenas a região de interesse.

Numa das modificações na técnica de PCR, descrita por Gyllenstein et al. (1988), fitas simples de DNA (ssDNA ou "single strand DNA") são produzidas no final do processo, ao invés da formação de fitas duplas (dsDNA ou "double strand DNA"). O procedimento, denominado "PCR assimétrico", consiste em uma reação de PCR utilizando-se concentrações diferentes de cada um dos primers do par, na proporção de 1:10. Desta forma, a amplificação exponencial de dsDNA acontece somente durante os 10 a 15 primeiros ciclos de reação e, após a utilização de toda a concentração do primer de menor proporção no meio, há apenas uma amplificação linear de ssDNA, originária do primer de maior concentração.

Essa técnica foi utilizada para a amplificação de fitas de DNA utilizadas nas reações de sequenciamento direto de ácidos nucleicos, para pesquisa de mutações nos fragmentos de interesse do gene APP, que será descrita na seção III-10.

III.5- Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi um dos métodos utilizados para o estudo do material amplificado nas reações de cadeia da polimerase do DNA extraído de tecido cerebral dos pacientes estudados (Davis et al., 1986).

O método consiste na migração dos fragmentos de DNA através de uma matriz inerte, sob a ação de um campo elétrico. A matriz utilizada é um gel de agarose, que confere resistência suficiente ao meio, dificultando a mobilidade do DNA em função do seu tamanho, sendo então capaz de separar fragmentos de até 1 Kb. Com a técnica os fragmentos de DNA são dispostos de acordo com seu peso molecular. Fragmentos menores migram mais rápido do que fragmentos maiores. A distância migrada no gel varia inversamente com o logaritmo do peso molecular. O tamanho dos fragmentos pode, entretanto, ser determinado através de comparação entre as bandas obtidas e as de um padrão cujas bandas possuem tamanhos já conhecidos.

O gel de agarose foi usualmente preparado na concentração de 2 %. Para isto, acrescentou-se 2g de agarose (Biorad Ultrapure ou Seakem) a 100 ml de solução tampão TAE 1X contendo 40X 1.6M de Tris base, 0.8M de acetato de sódio 3 H₂O, 40 mM de EDTA-Na₂ 2 H₂O, ph para 7.2 com ácido acético e H₂O para completar. A solução foi então solubilizada por aquecimento em forno de microondas. Após aguardar o tempo necessário para que a temperatura da agarose caísse até cerca de 60°C, acrescentou-se cerca de 50µl de brometo de etidium (1mg/ml) à solução de agarose. A mistura foi então serpeada, tomando-se o cuidado de evitar formação de bolhas. Em seguida, a solução de agarose foi derramada na forma plástica transparente para se fazer o gel e o pente foi colocado numa das extremidades afixado entre dois espaçadores, com os dentes ligeiramente acima da forma, porém sem encostá-la.

Enquanto ocorreu o endurecimento do gel (em aproximadamente 20

minutos) preparou-se dois litros da solução de buffer 1X TAE que foram derramados na câmara de eletroforese (BRL modelo H4), previamente lavada, em volume até 1 cm acima do gel. O pente e os espaçadores foram cuidadosamente retirados da forma e a fatia de gel posicionada horizontalmente na câmara de eletroforese. As bolhas, se formadas, foram removidas das canaletas com auxílio de ponteiros, ficando o gel totalmente submerso no tampão, porém não coberto por mais de 1 cm.

Foram então aplicados cuidadosamente, em cada canaleta, uma mistura de 5 µl de tampão de amostra específico denominado gel loading buffer (U.S. Biochemicals, Cleveland, OH), com 25 µl de cada amostra. Além disso foi aplicado em uma canaleta uma mistura de 5 µl de gel loading buffer com 25 µl de um produto de PCR que não recebeu amostra durante a reação, funcionando como controle negativo (branco). Este deve, na análise do experimento, apresentar-se totalmente isento de bandas, demonstrando não haver ocorrido contaminação durante o manuseio dos reagentes e amostras, indicando a confiabilidade do material amplificado. Dois microlitros de um padrão de peso molecular conhecido (123 bp DNA ladder 0.6 µg/µl - Gibco BRL), que é previamente preparado com gel loading buffer, foi aplicado em uma das canaletas.

Após o término da aplicação das amostras o aparelho de eletroforese foi ligado a 40 volts para a corrida, durante 30 minutos. A seguir as bandas foram fotografadas em transiluminador UV e posteriormente analisadas.

III.6- Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) foi outro método utilizado para a verificação do material amplificado na reação de cadeia da polimerase. Este método também consiste na migração dos fragmentos de DNA através de uma matriz inerte, sob a ação de um campo elétrico, porém a matriz utilizada é um polímero de acrilamida (Boom et al., 1990).

O gel foi utilizado na concentração de 5%, obtendo-se uma faixa efetiva de separação de 50-500 bp, abrangendo assim a faixa de tamanho dos fragmentos em estudo.

O produto de PCR foi aplicado no gel misturado ao gel loading buffer, na proporção de 5:1. Foram utilizados 1.5 a 2.0 µl de amostra por canaleta do gel. Um microlitro de padrão de peso molecular (123 bp DNA ladder 0.6 µg/µl - Gibco BRL) foi aplicado em uma das canaletas e, em outra canaleta, foi aplicado o controle negativo como para a eletroforese em gel de agarose que foi anteriormente descrita na seção III-5.

A corrida foi feita em tampão TBE 1x, a 150-200 V, num máximo de 20mA por gel, durante 15-30 minutos, em gel de 8 x 10 x 0.75 cm (Mini vertical gel electrophoresis unit - Sigma). Após o término da corrida, o gel foi então corado pela prata para a visualização e análise do material aplicado.

III.7- Coloração pela prata

Esse método, como mencionado acima, foi utilizado para a visualização e análise do material obtido do produto de PCR, submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida.

O íon prata possui grande afinidade por ácidos nucleicos, formando complexos lineares com estes. O processo de coloração baseia-se nesta capacidade da prata de se ligar ao DNA fixo em uma matriz, sendo posteriormente oxidada, produzindo cor que varia do amarelo escuro ao preto. Com isso, é possível visualizar e identificar os fragmentos de DNA que migraram no gel. O processo de coloração pela prata (silver stain Kit, Bio-Rad, Richmond, CA) é uma adaptação do método descrito por Bassam et al., em 1991, seguindo o seguinte protocolo:

1.ácido acético 10%	8 minutos 56-60°C	sob agitação
2.água destilada	3 minutos 56-60°C	sob agitação
3.solução de prata	8 minutos 56-60°C	sob agitação
4.água destilada	5 segundos(três vezes)	sob agitação
5.revelador	até coloração desejada	sob agitação
6.ácido acético 10%	10-15 minutos	agitação opcional
7.água destilada	10-15 minutos	agitação opcional
8.secar em papel celofane		

A integridade e qualidade do material amplificado são avaliados pelo padrão de bandas formadas no gel produzido pelo material aplicado. As bandas devem-se apresentar bem delimitadas, e seu posicionamento no gel, quando comparado ao das bandas de um padrão de peso molecular, deve ser compatível com o tamanho esperado para o fragmento. Cada amostra amplificada deve apresentar apenas uma banda, sendo admissível a presença de mais bandas apenas em casos específicos, como por exemplo, no caso de indivíduos heterozigotos, quando poderá haver a formação de heteroduplexes.

É ainda possível avaliar a concentração aproximada do material aplicado, por comparação entre a intensidade da coloração das bandas correspondentes às amostras e a intensidade das bandas do padrão de peso molecular, cuja concentração é conhecida. Assim, é possível avaliar a quantidade de material a ser utilizado posteriormente para as análises de mutação.

III.8- Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) dos exons 16 e 17 do gene da proteína precursora de amilóide

Descrito por Myers et al., 1987, o DGGE é uma técnica muito sensível, capaz de detectar a troca de até mesmo uma única base na sequência analisada. O tamanho do fragmento a ser analisado pode ser maior do que 500 pares de bases, o que representa uma vantagem sobre outros métodos de detecção de mutações. Por outro lado, consiste num método que dispensa o uso de marcações radioativas.

O método baseia-se na migração diferencial eletroforética do fragmento de DNA em estudo, de acordo com suas propriedades físico-químicas e sequência de bases das fitas. A desnaturação das fitas de DNA que ocorreria devido ao aumento gradual de temperatura é produzida, no sistema, pelo aumento gradual de concentração de agentes desnaturantes (formamida e uréia) em uma dada temperatura (60°C), sendo o ponto de desnaturação (ou fusão) de cada fragmento variável de acordo com sua sequência.

Os fragmentos de DNA de fita dupla que são submetidos ao gel migram de acordo com seus tamanhos, até atingirem o gradiente onde a molécula começa a desnaturar e então a fita começa a se abrir. À partir daí, a migração torna-se extremamente lenta, uma vez que a mobilidade de fragmentos de fita dupla é significativamente maior que a de seus correspondentes de fita simples. O ponto de desnaturação é modificado se houver alteração na sequência de bases, seja inserção, deleção ou mesmo troca, devido às diferenças na interação entre as bases adjacentes de cada fita. Esta diferença leva o DNA a diminuir a sua velocidade de migração em pontos diferentes do gel, causando diferenças no padrão de migração, que são evidenciadas quando se

acrescenta uma sequência rica em guanina e citosina de aproximadamente 40bp a uma das extremidades da porção analisada (GC-clamp), aumentando a sensibilidade do método para 98-99% (Sheffield et al., 1989).

Utiliza-se um gel de poliacrilamida a 7% contendo concentrações crescentes de formamida e uréia. O gradiente é feito através da mistura adequada de duas soluções com concentrações definidas, preparadas, por sua vez, pela mistura de duas soluções estoque denominadas 0% e 100%. A solução a 0% não contém agentes desnaturantes e a solução a 100% contém 7 M de uréia e 40% de formamida. A concentração dessas misturas de soluções 0% e 100%, bem como o tempo de corrida dos fragmentos de DNA no gel de DGGE, são estabelecidos por tentativa, variando de acordo com cada material analisado.

Essas duas soluções de concentrações definidas são colocadas em compartimentos separados de um gradient maker gravitacional (modelo 385, Bio Rad), após terem sido adicionados reagentes polimerizantes: persulfato de amônio a 10%, num volume 1/200 e TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina), num volume 1/2000. Logo após, as duas soluções são vertidas entre duas placas de 16 X 18 X 0.75 cm, utilizando-se o próprio gradient maker, da colocação de um pente adequado para obtenção de canaletas. Em seguida, aguarda-se a polimerização que habitualmente ocorre num período mínimo de quatro horas.

Após ocorrer a polimerização, o pente foi removido, as canaletas foram lavadas com o mesmo tampão usado para a corrida (TAE 1x), de modo a se retirar o excesso de uréia depositada, permitindo um melhor contato da amostra a ser aplicada com o meio de corrida. O gel foi então colocado em câmara própria (Hoefer Scientific Instruments vertical slab gel electrophoresis apparatus model SE 620, San Francisco, CA), para a homogeneização da temperatura, sendo deixado em repouso durante meia hora.

Imediatamente antes de serem aplicadas no gel, as amostras foram misturadas com o tampão de amostra específico, o gel loading buffer, na proporção de 6:1, tendo sido aquecidas a 95° C por 5 a 10 minutos para a desnaturação das fitas, e imediatamente imersas em gelo para a renaturação aleatória incompleta resultante da ação dos agentes desnaturantes contidos no gel.

As amostras aplicadas foram então, submetidas a eletroforese em tampão a 60° C, em tampão TAE 1x pH 8.0, sob tensão constante de 160 v. O tempo de corrida e os valores dos gradientes desnaturantes foram estabelecidos após testes sucessivos, feitos a partir das propriedades de cada fragmento de DNA a ser analisado, com variações criadas a partir de um valor mínimo de 20% no topo e um valor máximo de 90% na base. Após a corrida, o gel foi corado pela prata , como descrito anteriormente na seção III.5.

III.9- Análise de restrição

A análise de restrição consiste na incubação do DNA em estudo com uma endonuclease, em meio específico, a uma dada temperatura, e posterior eletroforese. As endonucleases utilizadas possuem a propriedade de reconhecer certas sequências de bases e clivar a molécula de DNA nestas regiões. Estas enzimas são chamadas enzimas de restrição, e as sequências reconhecidas, são os sítios de restrição. Essa técnica permite visualizar a presença/ausência de mutações nos referidos sítios de restrição (mutação puntual onde haja a perda do sítio, por exemplo), ou inserções/deleções na região analisada. O DNA é incubado em presença da enzima, em meio e temperatura adequados, por um período mínimo de 1 hora, e máximo de 18 horas.

A sequência descrita para o gene do APP foi analisada, tendo sido identificados vários sítios de restrição diferentes, ao longo dos exons 16 e 17. Baseando-se nestes dados, algumas enzimas de restrição foram selecionadas para melhor investigação de possíveis mutações.

III.10- Sequenciamento direto dos exons 16 e 17 do gene da proteína precursora de amilóide

A sequência de bases de um fragmento de DNA pode se determinada pelos métodos químico ou enzimático. O método enzimático, descrito por Sanger et al., 1981, baseia-se na síntese de uma fita de DNA por uma DNA polimerase, à partir de um molde de fita simples. A técnica utilizada segue o mesmo princípio básico do PCR, usando-se 2',3'-dideoxynucleotídeos (ddNTPs) em associação aos dNTPs. Os ddNTPs, por não possuírem o grupo hidroxila ligado ao carbono 3', não são capazes de sofrer nova esterificação, interrompendo assim a replicação da cadeia. Quando uma mistura de dNTPs/ddNTPs em proporções adequadas é utilizada, a síntese da fita nova será interrompida, em uma fração da população de cadeias em cada sítio onde um ddNTP possa ser incorporado.

A síntese é iniciada em apenas um sítio, onde o primer se liga à amostra sendo a nova fita estendida até a incorporação de um ddNTP, quando então a fita não será mais estendida. Para cada amostra a ser sequenciada, são feitas quatro reações, cada uma contendo um tipo de ddNTP. Com isso, em cada reação, obtem-se uma mistura de fragmentos de vários tamanhos, terminados seletivamente em A, C, G ou T, dependendo do ddNTP utilizado. É utilizado também um nucleotídeo marcado radioativamente, de modo que todas as fitas formadas serão também marcadas, permitindo assim sua visualização por autoradiografia. Os fragmentos produzidos são submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 40% (19:1), e o padrão de bandas formado permite acompanhar a distribuição de cada base na região analisada.

Para uma maior abrangência do fragmento em estudo, o mesmo material é aplicado duas vezes no gel, em momentos diferentes, fazendo-se

assim as chamadas corridas longa e curta. Estas duas corridas diferem entre si apenas no período de mobilização do DNA dentro do gel, o que permite a visualização das regiões mais próximas e mais distantes do primer . A leitura do gel é feita de baixo para cima, da extremidade inicial próxima ao primer (5'), para a extremidade mais distante (3').

O sequenciamento foi feito utilizando-se o Kit Sequenase versão 2.0 (USB/Amersam Life Science), e como marcador, alfa32P dCTP. Como amostra, utilizou-se diretamente o produto de PCR assimétrico de cada exon analisado.

A sequenase é uma enzima excelente para sequenciar DNA, derivada do bacteriófago T 7 DNA polymerase que foi modificado para melhorar suas propriedades para sequenciamento.

Fitas simples foram obtidas do produto de PCR assimétrico, purificado por reação com sílica como previamente descrito (seção III.2 - Extração de DNA). O produto final foi ressuspensão em 7µl de água, e utilizado na reação de sequenciamento, seguindo-se protocolo padrão.

O material foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 7%, contendo 48% de uréia, a 1600-1800 V (max. 60W), durante aproximadamente 3 horas, para a corrida longa e 1 hora e meia para corrida curta, em gel de 40 x 34 x 0.4 cm. Após a corrida, foi feita exposição do gel em filme autoradiográfico (Kodak Diagnostic film X-Omat XK-1.35 x 45 cm), com tempos variáveis (4 a 72 horas), sendo posteriormente, feitas as leituras.

IV - RESULTADOS

IV.1- Análise de fusão dos exons 16 e 17 do gene da proteína precursora de amilóide

Os *melting domains* ou regiões de fusão dos exons foram determinados como demonstrados nas figuras 5 e 6 , e a partir delas foram construídos os primers que delimitam essas regiões para serem usados nas amplificações de fragmentos de DNA pela técnica de reação de cadeia da polimerase e na análise de mutações do gene APP, feita através de eletroforese em gel de gradiente desnaturante e de sequenciamento direto.

Foi também construído um primer, para cada par que delimita um dos exons, acoplado a uma sequência de 40 GC (GC-clamp), de forma a possibilitar o aumento da sensibilidade e confiabilidade no uso das técnicas acima descritas (Saiki, 1989; Sheffield, 1989).

Todos os primers escolhidos foram utilizados, com sucesso, nas reações de cadeia da polimerase, eletroforese em gel de gradiente desnaturante e sequenciamento direto e encontram-se descritos na tabelas 5 e 6.

Figura 5:

Gráfico para a análise das temperaturas de fusão do exon 16 do gene da proteína precursora de amilóide

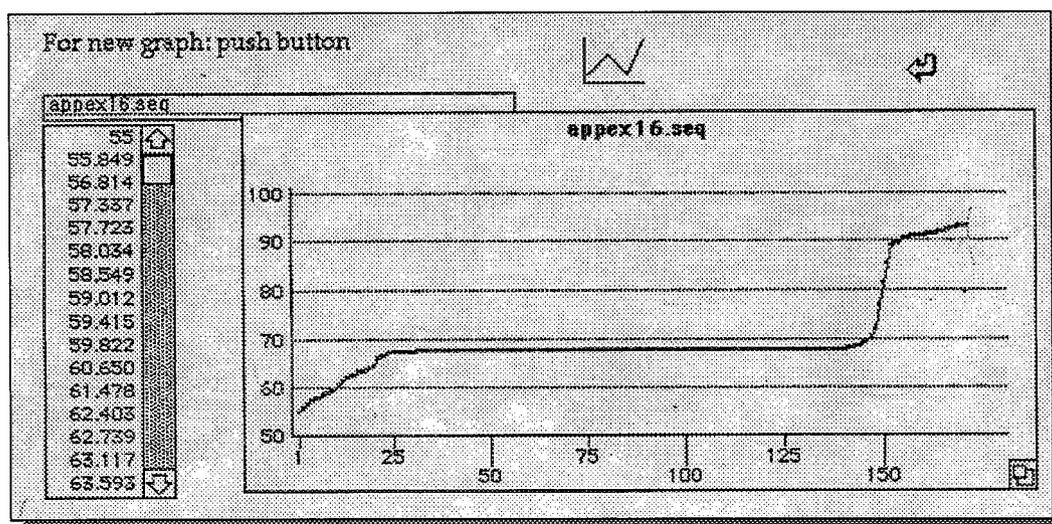


Tabela 5:
Sequência do exon 16 do gene da proteína precursora de amilóide
(programa MacMelt 87)

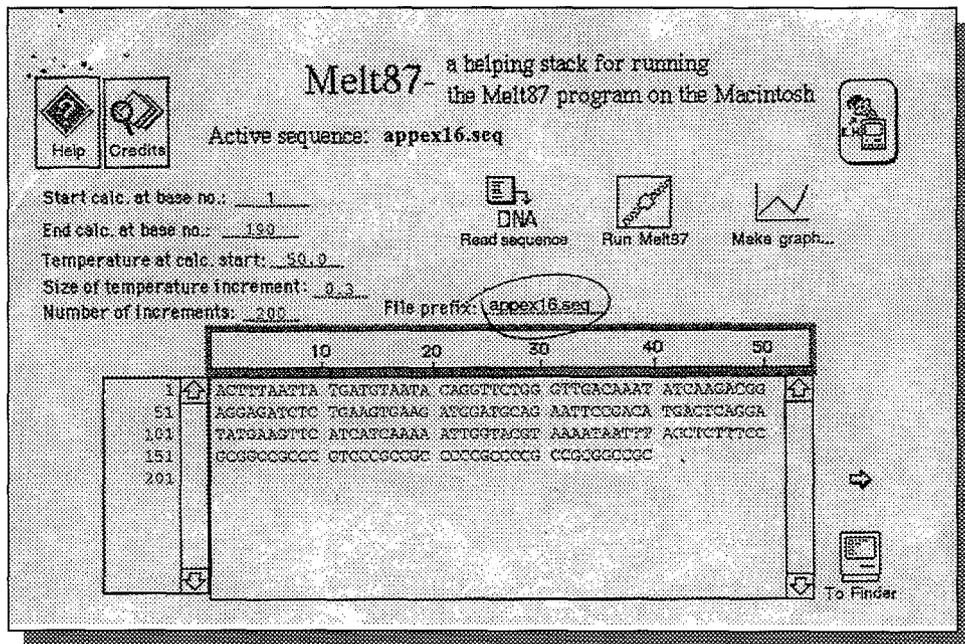


Figura 6:
Gráfico para a análise das temperaturas de fusão do exon 17 do gene
da proteína precursora de amilóide

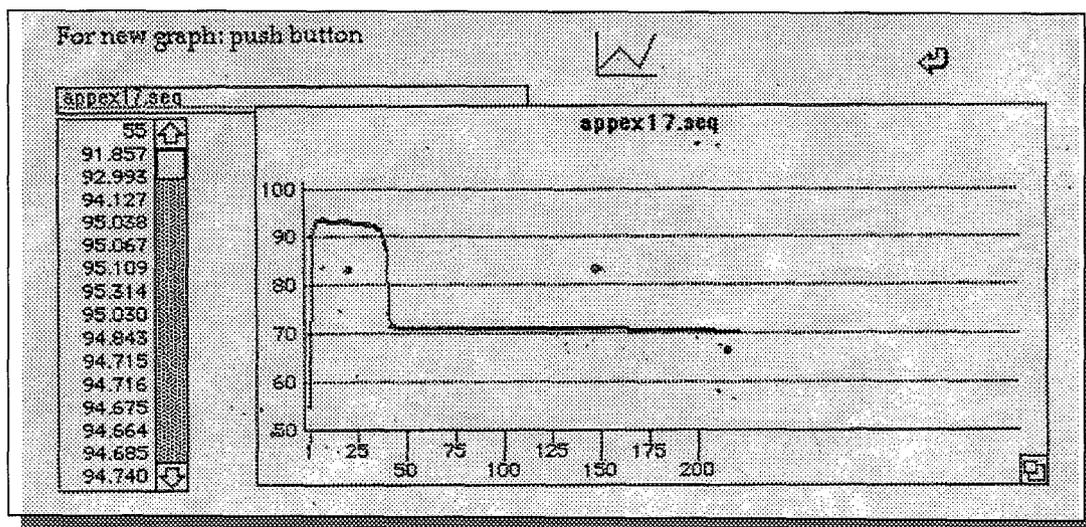
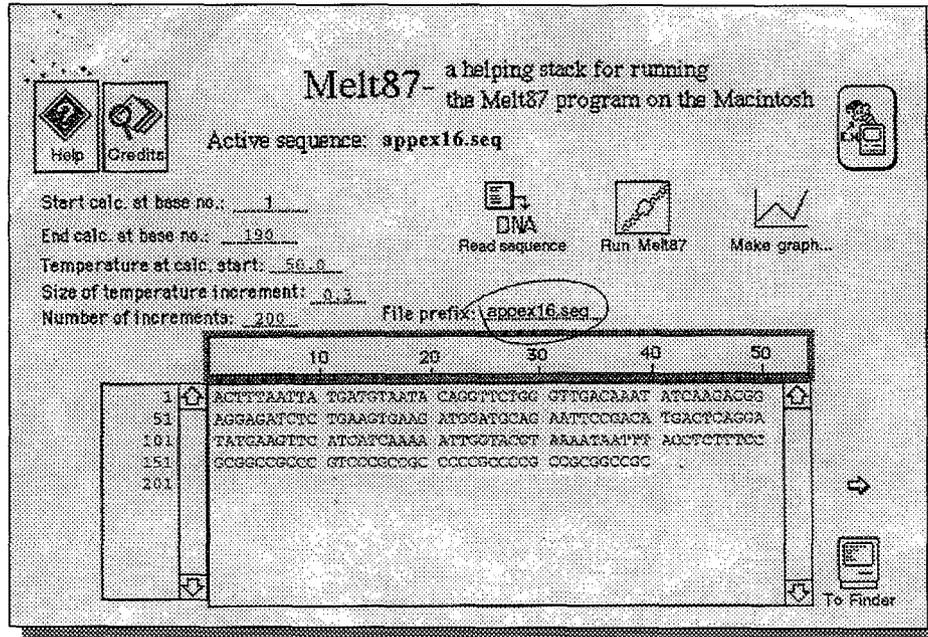


Tabela 6:
Sequência do exon 16 do gene da proteína precursora de amilóide
(programa MacMelt 87)



IV.2- Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) dos exons 16 e 17 do gene da proteína precursora de amilóide

A obtenção de um produto de PCR específico, em concentração adequada, é de primordial importância para o sucesso da análise de mutações pelas técnicas já descritas que são realizadas a partir do material obtido pela reação de cadeia da polimerase. Portanto para obter-se material adequado foi necessário precisar com maior exatidão possível, após várias baterias de testes, a composição do meio, os primers a serem utilizados bem como as temperaturas adequadas a cada uma das fases da reação.

Em todas as reações de PCR, o DNA extraído foi amplificado utilizando-se em 50 µl de volume final de reação, aproximadamente 50 mM de cloreto de potássio, 10 mM de Tris. HCl (ph= 8.3), 1.5 mM de cloreto de magnésio, 0.2 mM de cada deoxinucleotídeo, 20 picomoles de cada primer (veja na tabela), 0.1 mg/ml de gelatina, 1 unidade de Taq DNA polimerase (Boeringer Mannheim, GmbH Germany), recobertos por 50 µl de óleo mineral.

Foram testadas variações na composição do meio de reação, com acréscimo de aditivos (DSMO, triton, formamida, variações na concentração de cloreto de magnésio etc) na tentativa de se aumentar a especificidade da mesma. Nenhuma das variações mostraram vantagens adicionais e foram portanto desconsideradas.

Cada fragmento foi amplificado sob condições específicas de temperatura. A temperatura de anelamento para cada reação de PCR foi definida após vários testes, de acordo como os primers utilizados e tipos de amostra, de modo a possibilitar o aparecimento de bandas mais nítidas na região de interesse e dificultar a amplificação de fragmentos inespecíficos.

As tabelas 7 e 8, discriminam as várias sequências de primers utilizados, o tamanho dos fragmentos e os valores calculados de temperaturas de anelamento de cada reação de PCR, para amplificação dos exons 17 e 16 do gene APP, respectivamente.

As amostras de DNA extraídas de tecido cerebral dos 99 pacientes portadores da doença de Alzheimer, forma esporádica, amplificaram satisfatoriamente ao empregarmos a técnica de PCR com os primers escolhidos para delimitar os fragmentos correspondentes aos exons 16 e 17 do gene APP.

A análise dos produtos de PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose a 2%. Todos os fragmentos amplificados evidenciaram uma banda distinta de tamanho apropriado.

As dez amostras de DNA de tecido cerebral de pacientes controle negativos, bem como a amostra de DNA de tecido cerebral do paciente controle positivo para o exon 16 também amplificaram adequadamente pela técnica de PCR, utilizando-se o mesmo protocolo

Tabela 7:

Sequência dos primers e temperatura de anelamento utilizados para a amplificação do exon 16 do gene da proteína precursora de amilóide, de acordo com o tipo de tecido cerebral utilizado para a extração de DNA

Sequência dos primers Exon 16	Tamanho do fragmento (bp)	Temperatura de anelamento (°C)
Tecido cerebral fresco ou tecido cerebral incluído em blocos de parafina		
1º PCR		
5P5'-GGG TAGGCTTTGTCTTACAG-3'	262	52
3P5'-TAGCACAGGATGAACCAGAG-3'		
2º PCR		
5PR'-GGC GGGTTATGATTGAATACAGG-3'	190	60
3P5'GC Clamp- GAGGTAAATTATTTTACG-3'		

Para amplificação dos fragmentos a desnaturação das fitas foi feita a 94 °C por 30 segundos em todas as reações exceto, e a extensão foi feita a 72°C por 45 segundos, por 30 ciclos. No último ciclo o tempo de extensão foi aumentado por 5 minutos de forma a esgotar todo o restante de primers e dNTPs ainda presentes no meio de reação.

Tabela 8:

Sequência dos primers e temperatura de anelamento utilizados para a amplificação do exon 17 do gene da proteína precursora de amilóide, de acordo com o tipo de tecido cerebral utilizado para a extração de DNA

Sequência dos primers Exon 17	Tamanho do fragmento (bp)	Temperatura de anelamento (°C)
Tecido cerebral fresco		
5P5'-GC Clamp - TTT CTT AAT TTG TTT TCA AGG-3'	240	58
3P5'-CCCACTTGAAACATGCAGT-3'		
Tecido cerebral incluído em blocos de parafina		
1º PCR		
5P5'-CCTCATCAAATCTCCCCTG-3'	391	55
3P5'-CCCAAGCATCATGGAAGCAC-3'		
2º PCR		
5P5'-GC CLAMP-TTT CTT AAT TTG TTT TCA AGG-3'	240	60
3P5'-CCCACTTGAAACATGCAGT-3'		

Para amplificação dos fragmentos a desnaturação das fitas foi feita a 94 °C por 30 segundos em todas as reações exceto, e a extensão foi feita a 72°C por 45 segundos, por 30 ciclos. No último ciclo o tempo de extensão foi aumentado por 5 minutos de forma a esgotar todo o restante de primers e dNTPs ainda presentes no meio de reação.

IV.3- Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) dos exons 16 e 17 do gene da proteína precursora de amilóide

A análise dos produtos de PCR foi feita através da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) a 7%, para a pesquisa de mutações nos exons 16 e 17 do gene APP. No método a migração das amostras é controlada por tempo, estando as condições para cada fragmento descritas na tabela 10. O volume de amostra em cada canaleta variou entre 10 e 30 microlitros de acordo com a intensidade da banda de cada amostra evidenciada na eletroforese em gel de agarose a 2%.

O DGGE foi utilizado na análise de cada fragmento de DNA estudado tendo sido empregados primers gerados à partir de informações fornecidas pelo programa de Lermman & Silverstein (figuras 5 e 6).

Tabela 9:

Condições de DGGE para os exons 16 e 17 do gene da proteína precursora de amilóide

	Gradiente	Tempo
Exon 16	20-60	3 horas e 30 minutos
Exon 17	30-70	3 horas e 30 minutos

Todos os produtos de PCR das amostras obtidas dos pacientes a serem investigados mostraram padrão de migração atípico para o gene APP capaz de sugerir alguma mutação genética, exceto em duas amostras nos quais foram detectadas padrão de migração anormal sugerindo uma sequência homozigótica ou heterozigótica, uma no exon 16 de um paciente alemão e outra no exon 17 de um paciente japonês.

Em contraste, a análise do produto de PCR da amostra contendo a mutação já conhecida no exon 16, confirmou nitidamente um padrão de migração anormal.

Esses achados foram confirmados e reproduzidos após repetição do DGGE feito a partir de amostras obtidas a partir de novas amplificações dos fragmentos em questão por reações de cadeia da polimerase.

Figura 7:

DGGE de material genômico de DNA amplificado de 14 tecidos cerebrais (Exon 16, produtos de PCR de 190 bp, 20-60%)

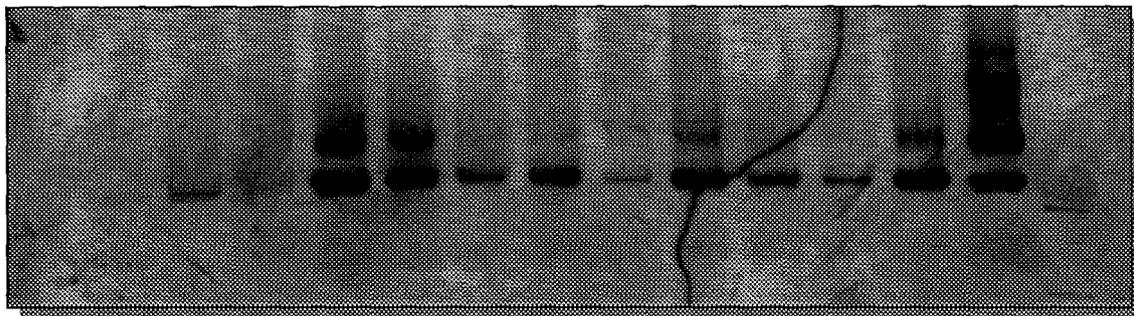
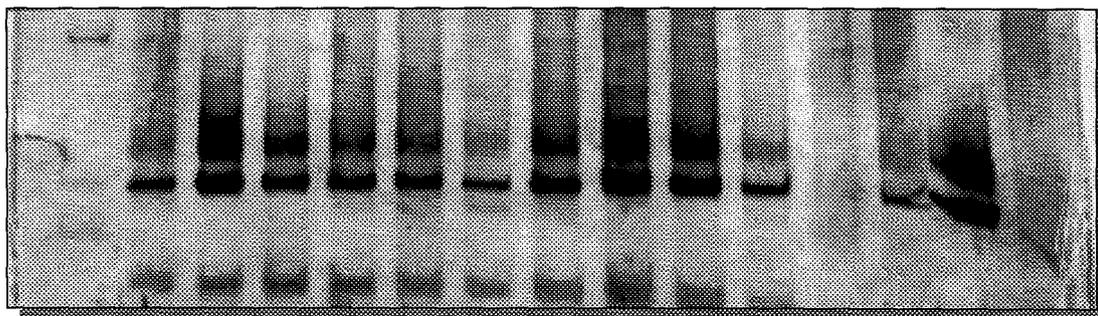


Figura 8:

DGGE de material genômico de DNA amplificado de 14 tecidos cerebrais (Exon 17, produtos de PCR de 240 bp, 30-70%)



IV.4 - Sequenciamento direto dos exons 16 e 17 do gene da proteína precursora de amilóide

O sequenciamento direto dos produtos de PCR foi realizado nos fragmentos de PCR que mostraram anormalidades no padrão de migração quando investigados por DGGE, bem como nos fragmentos de PCR de uma das amostras de tecido cerebral obtidas de pacientes normais (controle negativo).

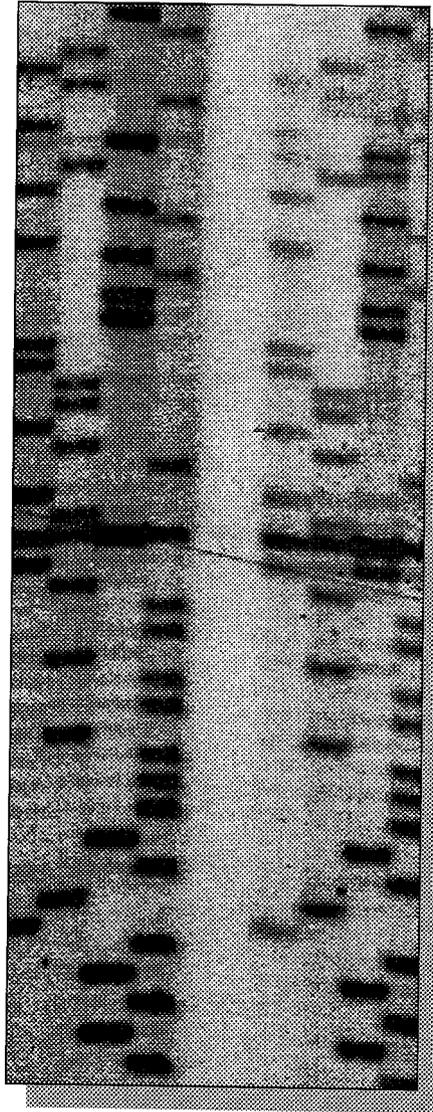
Na análise do resultado foi detectado em uma das amostras suspeitas a presença de mutação no codon 717 (GTC para CTC) causando a substituição de valina para leucina, como evidenciado na figura 9.

Na tentativa de reproduzir tal resultado foi feito nova análise de sequenciamento direto através de outro produto de PCR da mesma amostra. Como resultado não se confirmou a presença da mutação anteriormente descrita.

Portanto nenhuma diferença das sequências previamente publicadas foi notada na análise de todos os produtos de PCR sequenciados dos fragmentos dos exons 16 e 17 do gene APP.

Figura 9:

Radiografia de dois geis de sequenciamento de parte do exon 17 do gene APP de somente um tecido cerebral feito através de dois produtos diferentes de PCR, mostrando a sequência normal do lado esquerdo e a alteração de apenas um dos pares de bases a direita. A substituição do G para o C ocasionou a mudança do aminoácido valina para isoleucina no codon 717



IV.5 - Genotipagem da Apolipoproteína E através da reação de cadeia da polimerase (PCR)

Após a investigação de possíveis mutações nos exons 16 e 17 do gene APP, procedemos à análise das amostras de DNA de tecido cerebral fresco dos pacientes portadores de doença de Alzheimer, forma esporádica, para a investigação do genótipo Apo E.

Inicialmente foram escolhidos os primers, a saber: APOE - A (5'-CGG CGA CGG CTG TCC AAG GAG-3') e APOE-C (5'-CAC GCC CTG TTC CAC GAG-3') (Tsai et al., 1994).

A reação de PCR foi feita com um volume final de 25 microlitros, contendo 50 mM de cloreto de potássio, 10 mM de Tris HCl (pH=8.3), 1.5 mM de cloreto de magnésio MgCl₂ 0.2 mM de cada deoxinucleotídeo, 20 picomoles de cada um dos primer, 0.1 mg/ml de gelatina, 1 unidade de Taq DNA polimerase (Boeringer Mannheim, GmbH Germany) e 10% DMSO coberta com 25 µl de óleo mineral.

A reação foi feita em um aparelho PTC 100-60 thermocycler (m.J. Reaserch, Watertoen MA, USA). O ciclo consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos seguido de trinta ciclos de desnaturação a 94°C (30 segundos), anelamento a 65°C (30 segundos) e extensão 72°C (30 segundos), sendo a extensão final de 5 minutos a 72°C.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (2%) e corados por brometo de etídio. Os produtos bem amplificados (303 pares de bases) foram subsequentemente digeridos por HhaI. Dez microlitros do produto de PCR foram digeridos por HhaI, uma enzima de restrição ou endonuclease (New England Biolabs) a 37°C durante 1 hora. A corrida ocorreu em gel de poliacrilamida (8%) a 250V por 2 horas e seguiu-se visualização do gel em brometo de etídeo.

Após digeridos, os produtos foram analisados para investigação da frequência de halotipos.

A frequência dos halotipos E3/E3 foi de 59.7%, E3/E4 foi de 26.8%, E3/E2 foi de 1.5%, E2/E2 foi de 3% e E4/E4 foi de 8.9% como demonstrado na figura 11. Desta forma, as frequências de Apo E alelos em nossa amostra foi de E3= 73.9%, E4=22.4% e E2=3.7%.

V-DISSCUSSÃO

Os mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento da doença de Alzheimer permanecem amplamente desconhecidos. De acordo com uma das hipóteses, o aumento no depósito de substância amilóide no cérebro é presumivelmente de importância primária na patogênese da doença de Alzheimer.

O depósito de amilóide no cérebro ocorre devido a uma clivagem proteolítica, como produto de uma molécula precursora grande, a proteína precursora de amilóide (APP). Parte da estrutura do gene APP é formada pelos exons 16 e 17, responsáveis por mutações de células germinativas encontradas em um pequeno grupo de pacientes portadores da rara forma da doença de Alzheimer conhecida como forma familiar de início precoce (Goate et al., 1991; Axelman et al., 1994; Peacock et al., 1994).

Estudos experimentais *in vitro* demonstraram que essas mutações propiciam um aumento da produção de amilóide insolúvel pela células neuronais (Fujigasaki et al., 1994). Além disso, um modelo em rato transgênico demonstrou claramente que uma das mutações mais comuns (valina no codon 717 que é substituída por fenilalanina) é relevante na patogênese da doença (Citron et al., 1992).

Recentemente, mutações em células germinativas em novos genes, tais como, S182 (Presenilina 1) no cromossoma 14 (Sherrington et al., 1995) e Presenilina 2 (Rogarv et al., 1995) e STM-2 ambos no cromossoma 1 (Ephrat et al., 1995), foram detectadas em pacientes portadores da forma familiar da doença de Alzheimer.

A base molecular exata para doença de Alzheimer que resulta em mutações de células germinativas não é conhecida até o momento. Entretanto, baseado na estrutura presumida da proteína, esses genes parecem estar envolvidos no transporte de proteína através da membrana celular, e talvez aumento do transporte extracelular de APP que resulta num acúmulo excessivo de amilóide. O achado desses novos genes pode ainda mais enfatizar o papel da proteína precursora de amilóide na patogênese da doença de Alzheimer.

É ainda incerto, se, como, e em qual extensão as mutações do gene APP estão envolvidas na patogênese das formas mais comuns da doença de Alzheimer. Essa incerteza tem resultado em muitos debates, sendo que alguns investigadores advogam um papel preponderante dos produtos do gene APP na patogênese da doença de Alzheimer, e outros desmistificam o papel da APP alegando que a proteína teria uma contribuição insignificante no desenvolvimento da doença (Selkoe, 1994; Prince et al., 1994).

Caso o APP mutante realmente tenha um papel importante na patogênese da doença de Alzheimer, forma esporádica, é plausível o fato de que o gene possa abrigar mutações somáticas adquiridas durante a embriogênese, em células derivadas do sistema nervoso central. Desta forma, as mutações resultantes seriam exibidas apenas somaticamente nas áreas do cérebro que apresentam "bone fide" com a doença de Alzheimer histopatológica e não em células germinativas, ou mesmo em áreas do cérebro que não tenham achados patológicos da doença de Alzheimer.

Um exemplo de achado similar de tecido limitado, padrão mosaico, de mutações ocorridas somaticamente, é a síndrome de McCune-Albright. Nessa síndrome esporádica, as mutações, dentro da sub-unidade alfa estimuladora da proteína ligadora GTP heterotrimérica (Gsalfa), são detectadas em lesões somáticas em um padrão mosaico, compatível com o conceito de uma mutação constitucional e não de células germinativas.

Nesse estudo, mutações somáticas nos exons 16 e 17 do gene APP em 99 cérebros de pacientes falecidos com diagnóstico de doença de Alzheimer, forma esporádica, não puderam ser demonstrados. Esses exons que codificam a proteína β A4, o maior componente dos depósitos de amiloide cerebral na doença de Alzheimer, foram escolhidos devido as descrições prévias de mutações de células germinativas, neles localizadas, que são responsáveis em várias famílias pela forma familiar da doença, de início precoce (Goate et al., 1991; Naruse et al., 1991; Murrell et al., 1991; Mullan et al., 1992). Porém, as

áreas testadas no atual estudo, foram de regiões do cérebro que apresentam evidência histopatológica conclusiva de doença de Alzheimer.

Várias razões podem ser responsáveis pela impossibilidade de demonstrar mutações somáticas nesses exons dos cérebros dos pacientes falecidos com doença de Alzheimer. As técnicas usadas para rastreamento das mutações, tais como DGGE, podem ter falhado na demonstração de uma mutação existente. Essa possibilidade é porém remota, dado a comprovada especificidade e sensibilidade das técnicas usadas, com taxas de detecção de mutação bem acima de 15% (Myers et al., 1985). Além disso, um controle positivo que incluía uma mutação conhecida dentro de um dos dois fragmentos foi claramente demonstrada, com um padrão de migração anormal, que era diferente das amostras não mutantes, cujo padrão era normal. Além do mais foi feito sequenciamento direto dos casos suspeitos, o que torna improvável a possibilidade de não detecção de qualquer mutação existente.

Outra possibilidade é que as mutações somáticas ocorram nesse gene, em pacientes com doença de Alzheimer, mas não na população testada ou nos exons testados. As amostras analisadas incluem pacientes acometidos pela doença de Alzheimer, forma esporádica, de início tardio, de três diferentes origens étnicas: alemã, japonesa e americana. Existe a possibilidade de que mutações somáticas acometam outros pacientes com doença de Alzheimer, com outras origens étnicas, ou portadores da doença porém com fenótipos diferentes (por exemplo, início precoce, esporádica).

Seja qual for a real explicação, mutações somáticas estruturais dentro da região do gene APP que codifica a proteína β A4, provavelmente não ocorrem em cérebros de uma população grande, não selecionada, portadora de doença de Alzheimer, forma esporádica, de início tardio.

Os achados negativos podem ter varias implicações. Primeiro, podem ser um indício de que o depósito de amiloide não seja um fator contribuinte importante ou nem mesmo um evento primário na patogênese da doença de Alzheimer. Esse conceito é suportado pelo fato de existirem depósitos de amiloide em cérebros de pacientes com função cognitiva intacta e presumivelmente normal (Selkoe, 1994). Segundo, isso pode indicar que outros genes que afetam o acúmulo de amiloide, tais como S182(presenilina 1), E5-1 (presenilina 2) e STM-2 (9-11), possam estar envolvidos somaticamente na patogênese da doença de Alzheimer.

A frequência do genotipo Apo E encontrada foi intrigante. Como mencionado anteriormente, a maioria dos pacientes com doença de Alzheimer comprovada apresentam pelo menos um alelo E4. Na população testada de pacientes norte-americanos, a taxa de Apo E4, o alelo que confere um aumento na susceptibilidade para desenvolver a doença de Alzheimer, é de 22.4% se comparado a 16% na população geral na literatura (Scott, 1993). Resultados similares mostrando a não existência da associação entre o alelo E4 e doença de Alzheimer, forma esporádica, têm sido descritos em pacientes suecos (Lannfelt et al., 1994) e nigerianos (Osuntokun et al., 1995). Esses achados podem ser tomados como indicadores da existência de outros genes, que não o APo E, responsáveis por conferir uma susceptibilidade, na patogênese da doença de Alzheimer forma esporádica.

Em conclusão, nenhuma mutação somática pôde ser demonstrada em cérebros de pacientes portadores da doença de Alzheimer, forma esporádica, nos exons 16 e 17 do gene APP. A hipótese de que mutações somáticas possam sustentar o desenvolvimento da doença, necessita ser mais profundamente explorada, através da análise de diferentes populações de pacientes com diferentes fenótipos (formas) da doença. Adicionalmente outros genes, tais como S182, STM-2 e E5-1, que presumivelmente possam levar a achados histopatológicos semelhantes, devem ser adequadamente estudados.

VI - APÊNDICES

Apêndice 1

Condições descritas como causas de deficit de memória ou outras alterações cognitivas

- Distúrbios de memória idade-relacionados ou Esquecimento Senescente Benigno

- Retardo mental e desordens do desenvolvimento

- Delirium

- Desordens Cardiovasculares
 - Demência multi-infarto
 - Arritmias cardíacas
 - Insuficiência cardíaca congestiva
 - Oclusão vascular
 - Doença de Binswanger
 - Síndrome do arco aórtico
 - Má formação arteriovenosa

- Psicopatologia
 - Depressão ou outras desordens do humor
 - Ansiedade
 - Parafrenia
 - Psicose reativa
 - Esquiofrênia
 - Desordens de stresse pós-traumáticas
 - Histeria
 - Desordens dissociativas (Síndrome de Ganser)
 - Desordens factícias
 - Desordens de ajustamento

- Doenças do Sistema Nervoso Central

- Doença de Alzheimer

- Doença de Pick

- Doença de Huntigton

- Doença de Parkinson

- Parkinson-demência complexo de guam, esclerose lateral amiotrófica.

- Doença de Hallervorden-Spatz

- Esclerose múltipla

- Distrofia muscular

- Carcinoma (efeito remoto)

- Degenerações espinocerebelares

- Epilepsia mioclónica progressiva

- Paralisia supranuclear progressiva

- Outras desordens raras, incluindo doença de Kufs,

- Leucodistrofia metacromática de início tardio

- Trauma

- Lesões cerebrais-traumas abertos ou fechados c/ contusão cerebral

- Demência pugilística

- Intoxicações

- Álcool

- Drogas ou combinações de drogas

- Medicações: esteróides adreno-corticais, compostos para alergia, agentes anti-inflamatórios, antidepressivos, antihistamínicos, anti-hipertensivos, atropina e correlatos, barbitúricos, benzodiazepínicos, brometos, descongestionantes, diuréticos, neurolépticos, analgésicos opióides, fenotiazinas, sulfoniluréias; também aspirina, cimetidina, clonidina, digitálicos, dissulfiram, flufenazina, haloperidol, insulina, carbonato de lítio, metildopa, fenitoína, propranolol, ranetidina Qualquer agente químico usado em drogas (ex.: cola para heroína)

Alumínio

Metais pesados (arsênico, manganês, mercúrio, tálio)

Compostos orgânicos (organofosforados, solventes, pesticidas)

Monóxido de carbono

•Hipóxia e anóxia

Parada cardíaca

Insuficiência cardíaca severa

•Infecções

Síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids)

Demência relacionada à Aids

Infecções oportunistas

Meningites ou encefalites bacterianas

Encefalites herpéticas

Encefalites por parasitas

Doença de Creutzfeldt-Jacob

Síndrome de Gerstmann-Straussler

Kuru

Doença de Wipple

Leucoencefalopatia multifocal progressiva

Neurosífilis

Endocardite

Paresia generalizada

Influenza

Pneumonia

Tuberculose

•Estados Carênciais

Síndrome de Wernicke-Korsakoff (deficiência de tiamina)

Pelagra (deficiência de vitamina B6)

Deficiência de Folato

Deficiência de Vitamina B12 ou anemia perniciosa

Doença de Marchiafava-Bignami

•Desordens Metabólicas e Endócrinas

Hipo e Hipertireoidismo

Hipo e hipercalcemia

Insuficiência Hepática

Doença de Wilson

Degeneração hepatolenticular não-Wilsoniana

Insuficiência renal

Encefalopatia por diálise

Hipo e Hiperglicemia

Síndrome de Cushing

Hipopituitarismo

Doença de Addison

Hiperlipidemia

Porfiria

Anemia (severa)

Hipo e hiperparatireoidismo

Distúrbios hidro-eletrolíticos incluindo hipo e hipernatremia, hipercapnia

•Condições Intracranianas

Tumores cerebrais intracranianos primários

Metástases (carcinomas, leucemias, linfomas, sarcomas)

Tumores cerebrais

Abcessos cerebrais

Hematoma subdural

Hidrocéfalo de pressão normal

Acidente cérebro vascular

Micro-infartos corticais

Demência lacunar

Doença embólica cerebral

•Desordens vasculares do colágeno

Síndrome de Behçet

Lupus eritematoso disseminado

Arterites temporais

Vasculites

•Outras Desordens

Epilepsia

Sarcoidose

Restrição sensorial (incluindo deficit visual e auditivo)

*Fonte: US Veterans Administration, Dementia Guidelines for Diagnosis and Treatment
2nd edn. , Office of Geriatrics and Extended Care, Washington DC 1989.*

Apêndice 2

Critérios diagnósticos para Demência do tipo Alzheimer do Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação Americana de Psiquiatria (DSM-IV)

A. O desenvolvimento de deficits cognitivos múltiplos manifestos por ambos:

- (1) deficit de memória (redução da habilidade de aprender novas informações ou recordar informações previamente aprendidas).
- (2) um (ou mais) dos seguintes distúrbios cognitivos:
 - (a) afasia (distúrbio de linguagem);
 - (b) apraxia (redução da habilidade em executar atividades motoras apesar de apresentar função motora intacta);
 - (c) agnosia (incapacidade de reconhecer ou identificar objetos apesar de apresentar função sensorial intacta);
 - (d) distúrbio da função executora (exemplos: planejamento, organização, sequenciamento, abstração).

B. Os deficits cognitivos dos critérios A1 e A2 isoladamente interferem significativamente nas funções sociais e ocupacionais e representam um declínio significativo em relação ao nível prévio de funcionamento.

C. O curso é caracterizado por início gradual e declínio cognitivo progressivo e contínuo.

D. Os deficits cognitivos dos critérios A1 e A2 não se devem a nenhum dos seguintes:

- (1) outra condição do sistema nervoso central que cause deficit progressivo da memória e cognição (exemplos: doença cerebrovascular, doença de Parkinson, doença de Huntington, hematoma subdural, hidrocefalo de pressão normal, tumor cerebral);

(2) doenças sistêmicas sabidamente causadoras de demência (exemplos: hipotireoidismo, deficiência de vitamina B12 e ácido fólico, deficiência de niacina, hipercalcemia, neurosífilis, infecção por HIV);

(3) condições induzidas por substâncias.

E. Os déficits não ocorrem exclusivamente durante o curso de *delirium*.

F. Os distúrbios não se devem a desordens tais como Depressão maior ou esquizofrenia.

O código usado no DSM-IV é baseado na data de início da doença e achados predominantes, como se segue:

• **de início precoce:** se o início ocorre até a idade de 65 anos:

290.11 com Delirium: superposição de delirium e demência;
290.12 com Delírio: idéias delirantes como sintoma predominante;
290.13 com Humor Deprimido: humor deprimido como característica predominante (incluindo apresentações que preencham os critérios para depressão maior). Não foi feito o diagnóstico isolado de desordem do humor devido a qualquer condição médica;

290.10 não Complicada: caso nenhum dos acima predomine na atual apresentação clínica.

• **de início tardio:** se o início ocorre após os 65 anos de idade:

290.3 com Delirium: superposição de delirium e demência;
290.20 com Delírio: idéias delirantes como sintoma predominante;
290.21 com Humor Deprimido: humor deprimido como característica predominante (incluindo apresentações que preencham os critérios para depressão maior). Não foi feito o diagnóstico isolado de desordem do humor devido a qualquer condição médica;

290.0 não Complicada: caso nenhum dos acima predomine na atual apresentação clínica.

Apêndice 3

Critérios diagnósticos para Demência na doença de Alzheimer de acordo com a Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento da Classificação Internacional das Doenças - CID-10 (10ª Revisão) da Organização Mundial de Saúde

F00 - Demência na Doença de Alzheimer

Diretrizes diagnósticas

- (a) Presença de uma demência.

- (b) Início insidioso com deterioração lenta. Embora o início usualmente pareça difícil de ser determinado no tempo, a percepção pelos outros de que os déficits existem pode ocorrer repentinamente. Um aparente platô pode aparecer na progressão.

- (c) Ausência de evidência clínica ou achados de investigações especiais que sugiram que o estado mental possa ser decorrente de outra doença sistêmica ou cerebral, a qual possa induzir uma demência (p.ex. hipotireoidismo, hipercalcemia, deficiência de vitamina B12, deficiência de niacina, neurosífilis, hidrocefalia de pressão normal ou hematoma subdural).

- (d) Ausência de início súbito, apoplético, ou de sinais neurológicos de lesão focal, tais como hemiparesia, perda sensorial, defeitos do campo visual e incoordenação, ocorrendo precocemente na doença (embora esses fenômenos possam se sobrepor mais tarde).

F00.0 - Demência na doença de Alzheimer de início precoce

Diretrizes diagnósticas

Como para demência de Alzheimer, iniciando-se antes da idade de 65 anos. Há deteriorização relativamente rápida, com marcantes e múltiplos transtornos das funções corticais superiores. Afasia, agrafia, alexia e apraxia ocorrem relativamente cedo no curso da demência, na maioria dos casos.

F00.1 - Demência na doença de Alzheimer de início tardio

Diretrizes diagnósticas

Como para demência, descrita acima, com atenção para a presença ou ausência de aspectos que diferenciem o transtorno do subtipo de início precoce.

Apêndice 4

Crítérios diagnósticos da doença de Alzheimer de acordo com “National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) Work Group”

1. Os critérios para o diagnóstico clínico de **PROVÁVEL doença de Alzheimer** incluem:

- demência estabelecida por exame clínico e documentada por testes psicométricos tais como o Mini Mental State Exam e Blessed Dementia Scale ;
- deficits em duas ou mais áreas de cognição;
- piora progressiva da memória e outras funções cognitivas;
- início entre 40 e 90 anos de idade, frequentemente após 65 anos;
- ausência de desordens sistêmicas ou outras doenças cerebrais que possam ser responsabilizadas pelo deficit de memória e cognição.

2. O diagnóstico de **PROVÁVEL doença de Alzheimer** é apoiado em:

- progressiva deterioração de funções cognitivas específicas tais como linguagem (afasia), habilidades motoras (apraxia) e percepção (agnosia);
- incapacidades nas atividades de vida diária e alteração nos padrões de comportamento;
- história familiar de desordens similares, principalmente com confirmação neuropatológica;
- resultados laboratoriais:
 - *punção lombar normal avaliada por técnicas padronizadas;
 - *eletrocardiograma normal ou com alterações inespecíficas;
 - *evidências de atrofia cerebral à tomografia computadorizada de crânio com progressão documentada em exames seriados.

3. Outros achados clínicos consistentes com o diagnóstico de **PROVÁVEL doença de Alzheimer**, após exclusão de outras causas de demência, incluem:

- plateaus no curso de progressão da doença;
- associação com sintomas de depressão, insônia, incontinência, delírios, ilusões, alucinações, agressividade verbal, física, perda de peso, desordens sexuais ou emocionalismo;
- outras anormalidades neurológicas, principalmente na doença mais avançada, incluindo-se sinais motores tais como aumento do tonus muscular, mioclonus ou desordens de marcha;
- crises convulsivas na doença avançada;
- tomografia computadorizada de crânio normal para a idade.

4. Achados que tornam o diagnóstico de **PROVÁVEL doença de Alzheimer** improvável ou incerto, incluem:

- início súbito;
- sinais neurológicos focais, tais como, hemiparesia, perda sensorial, e perda de coordenação, precocemente, no curso da doença;
- convulsões e distúrbios de marcha, no início ou muito precocemente no curso da doença.

5. O diagnóstico clínico de **POSSÍVEL doença de Alzheimer**:

- pode ser feito baseando-se num quadro de síndrome demencial, na ausência de desordens neurológicas, psiquiátricas ou sistêmicas que possam ser responsabilizadas pelo quadro de demência, levando-se em consideração data de início, apresentação e evolução;
- pode ser feito na presença de desordens sistêmicas ou cerebrais capazes de produzir quadros demenciais, mas não consideradas como causa da demência em questão;
- pode ser usado em pesquisas científicas quando existe um único déficit cognitivo severo gradualmente progressivo na ausência de outra causa identificável.

6. Critérios para o diagnóstico **DEFINITIVO de doença de Alzheimer**:

- critérios diagnósticos de provável doença de Alzheimer e evidência histopatológica obtida por biópsia ou autópsia.

7. A classificação da doença de Alzheimer para fins de pesquisa deve especificar as características que tornam possível a diferenciação da desordem em sub-tipos, tais como:

- ocorrência familiar
- início antes dos 65 anos de idade
- presença de trissomia-21
- co-existência de outras condições, tais como, doença de Parkinson.

Apêndice 5

Abreviaturas

•bp	pares de bases (base pairs)
•DGGE	eletroforese em gel de gradiente desnaturante
•DMSO	dimetilsulfóxido
•DNA	ácido deoxirribonucléico
•dNTP	deoxi-nucleotídeo trifosfato
•dTTP	deoxi-tirosina trifosfato
•EDTA	ácido tetra etileno diamínico
•ELISA	enzyme-linked immunossorbent assay
•GSalfa	subunidade α ligada à proteína gestimulatória (forma ativa)
•Kb	Kilo bases
•Kd	constante de dissociação
•nt	nucleotídeos
•PAGE	eletroforese me gel de poliacrilamida
•PCR	reação de cadeia da polimerase
•PHF	filamentos helicoidais pareados
•PS1	presenilina 1
•PS2	presenilina 2
•RIE	radioimunoensaio
•SDS	dodecil sulfato
•SOD	superoxidodismutase
•TAE	tampão tris-acetato de sódio - EDTA
•TEMED	N,N,N',N' - tetrametiletlenodiamino
•Tris	tris-hidroximetilaminometano
•UA	unidade de absorvância
•UV	ultra violeta

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexlman K, Basun H, Winblad B, et al. (1994) A large Swedish family with Alzheimer's disease with a codon 670/671 amyloid precursor protein mutation. *Arch Neurol* 51:1193-1197.

Alzheimer A (1907) Ueber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Centralblatt fur Nervenheilkunde und Psychiatrie* 30: 177-179.

Alzheimer's Disease Collaborative Group (1995) The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families., *Nature Genet* 11: 219-222.

American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th ed. Washington, DC.

Bassam MJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Anal Biochem* 196: 80-83.

Bayer A (1991) Cognitive Impairment - Diagnosis and Management. In: Principles and Practice of Geriatric Medicine, 2nd Edition (Pathy MSJ, ed), John Wiley & Sons Ltd, 933-951.

Blessed G, Tomlinson BE, Roth M (1968) The association between quantitative measures of dementia and of senile changes in the cerebral grey matter of elderly subjects. *British Journal of Psychiatry* 114: 797-811.

Bondareff W, Mountjov CQ, Roth M (1982) Loss of neurons of origin of the adrenergic projection of cerebral cortex (nucleus locus ceruleus) in senile dementia. *Neurology* 32: 164-168.

Boom R, Dol CJA, Salimans MMM, et al. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28(3): 495-503.

Breitner JCS, Silverman JM, Mohs RC, et al. (1988) Familial aggregation in Alzheimer's disease: comparison of risk among relatives of early- and late-onset cases, and among male and female relatives in successive generations. *Neurology* 38: 207-212.

- Campion D et al. (1995) Mutations of the presenilin 1 gene in families with early-onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 4: 2373-2377.
- Candy JM, Klinowski J, Perry RH, et al. (1986) Aluminosilicates and senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Lancet* i(8477): 354-357.
- Carman WF (1991) The Polymerase Chain Reaction. *Quart J Med* 287: 195-203.
- Carter DA, Desmarais E, Bellis M, et al. (1992) More missense in amyloid gene. *Nature Genet* 2: 255-256.
- Chartier-Harlin M-C, Crawford F, Houlder H, et al. (1991) Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nature* 353: 844-846.
- Citron M, Vigo-Pelfrey C, Teplow DB, et al. (1994) Excessive production of amyloid β -protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer's disease mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11993-11997.
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, et al. (1992) Mutation of the amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases protein production. *Nature* 360: 672-674.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, et al. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261: 921-923.
- Corsellis JAN (1978) Posttraumatic dementia. In: Katzman R, Terry RD, Bick KL (eds) *Alzheimer's disease: Senile dementia and related disorders*. Raven Press, New York, p 125-133.
- Corsellis JAN (1962) *Mental Illness and the Ageing Brain* O.U.P. London.

Cummings JL, Benson DF (1987) The role of the nucleus basalis de Meynert in dementia: review and reconsideration. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1(3): 128-145.

Cruts M et al. (1995) Molecular genetic analysis of familial early-onset Alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3. *Hum Mol Genet* 4: 2363-2371.

Davies LG, Dibner MD, Battey JF (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, 1st ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc. New York, NY.

Davies P, Wolozin BL (1987) Recent advances in the neurochemistry of Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry* 48: 5(suppl), 23-30.

Ephrat LL, Wasco W, Poorkaj P, et al. (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269: 973-977.

Flier JS, Underhill LH, Yankner BA, et al. (1991) β amyloid and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 325: 1849-1857.

Folstein JF, Folstein SE, McHugh PR (1975) 'Mini-mental State' - a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12: 189-198.

Friedland RP (1992) Dementia. In: *Oxford Textbook of Geriatric Medicine* (Evans GE & Williams TF, eds). Oxford Medical Publ, 483-489.

Fujigasaki H, Naruse S, Kaneko K, et al. (1994) Mutation analysis of the amyloid precursor protein gene in Japanese familial Alzheimer's disease kinders. *Human Genet* 93: 460-462.

Games D, Adams D, Alessandrini R T, et al. (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature* 373: 523-527.

- Glennner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120: 885-890.
- Goate A, Chartier-Harlein M-C, Mullan M, et al. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349: 704-706.
- Goate AM, Haynes AR, Owen MJ, et al. (1989) Predisposing locus for Alzheimer's disease on chromosome 21. *Lancet* 1: 352-355.
- Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, et al. (1987) Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 235: 877-880.
- Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, et al. (1991) PCR amplification from paraffin embedded tissues, effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol* 95: 117-124.
- Gyllentein UB, Erlich A (1988) Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc Natl Acad Sci* 85: 7652-7656.
- Hachinski V (1992) Preventable senility: a call for action against the vascular dementias. *Lancet* 340: 645-648.
- Hirano A, Zimmerman HM (1962) Alzheimer's neurofibrillary changes: a topographic study. *Arch Neurol* 7: 227-242 (Sept).
- Huff FJ, Auerbach J, Chakravarti A, et al. (1988) Risk of dementia in relatives of patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 38: 786-790.
- Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, et al. (1984) Alzheimer's disease: Cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* 225: 1168-1170.

Innis MA, Gelfand DH (1989) Optimization of PCRs. In: PCR protocols: a guide to methods and applications (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, Eds.)

International Classification of Diseases and Related Health Problems. (1992) The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders - Clinical descriptions and diagnostic guidelines, 10th ed. Geneva, World Health Organization.

Jarvik LF, Lavretsky EP, Neshkes RE (1992) Dementia and delirium in old age. In: Textbook of Geriatric Medicine and Gerontology, 4th edition (Brocklehurst JC, Tallis RC, Fillit HM, eds), Churchill Livingstone, 326-348.

Jones CT, Morris S, Yates CM, et al. (1992) Mutation in codon 713 of the β amyloid precursor protein gene presenting with schizophrenia. Nature Genet 1: 306-309.

Katzman R (1986) Alzheimer's disease. N Engl J Med 314: 964-973.

Khachaturian ZS (1985) Diagnosis of Alzheimer's disease. Arch Neurol 42: 1097-1105.

Kosik KS (1994) The Alzheimer's disease sphinx: a riddle with plaques and tangles. J Cell Biol 127: 1501-1504.

Kukul WA, Larson EB (1989) Distinguishing Alzheimer's disease from other dementias: questionnaire responses of close relatives and autopsy results. J Am Geriatr Soc 37: 521.

Lannfelt L, Lilius L, Nastase M, et al. (1994) Lack of association between apolipoprotein E allele E4 and sporadic Alzheimer's disease. Neurol Lett 169: 175-178.

Larson EB, Kukull WA, Katzman RL (1992) Cognitive impairment: dementia and Alzheimer's disease. Annu Rev Public Health 13: 431-349.

- Lerman LS, Silvestein K (1987) Computacional simulation of DNA melting and its application to denaturing gradient gel electrophoresis. *Meth Enzymol* 155: 482-501.
- Lerman LS, Fischer SG, Hurley I, et al. (1984) Sequence-determined DNA separations. *Annu Rev Biophys Bioengin.* 13: 399-423.
- Levy-Lahad E, et al. (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Med.* 2: 864-870.
- Levy E, Carmana MK, Fernandez-Madrid IJ, et al. (1990) Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* 248: 1124-1126.
- Lewey FH (1953) "Alois Alzheimer (1864-1915)." In: *The Founders of Neurology* (Haymaker W, ed.) Springfield Ill Charles C Thomas, Publ, 165-168.
- McKhann G, Drackman D, Folstein M, et al. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease. Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of the Department of Health and Human Services Task force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34: 939-944.
- McMenemey WH (1963) "The Dementias and Progressive Diseases of the Basal Ganglia". In: *Greenfield's Neuropathology* (Blackwood W et al, eds), Baltimore: Williams & Eilkins Co., ed 2, 520-576.
- Margolis G (1959) Senile Cerebral Disease: A critical survey of traditional concepts based upon observations with newer technics. *Lab Invest* 8: 335-370 (March-April).
- Matsuyama SS (1995) Genetics of dementias. In: Kaplan HI & Sadock BJ: *Comprehensive Textbook of Psychiatry*. Vol. 2. Baltimore, Williams & Wilkins.

- Meyer JE (1959) "Alois Alzheimer (1864-1915). In: Grosse Nervenärzte (Kolle K, ed), Stuttgart Georg Thieme, 2: 32-38.
- Mirra SS, Heyman A, Mckeel D, et al. (1991) The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD), Part II Standardization of the neuropathological assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41: 1091-1105.
- Mullan M, Houlden H, Windespecht M, et al. (1992) A locus for familial early-onset Alzheimer on the long arm of chromosome 14, proximal to the alfa 1-antichymo-trypsin gene. *Nat Genet* 2; 340-342.
- Mullan M, Crawford F, Axelman K, et al. (1992) A pathologic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of the beta-amyloid. *Nature Genet* 1: 345-347.
- Murrell J, Farlow M, Ghetti B, et al. (1991) A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* 254: 97-99.
- Myers RM, Maniatis T, Lerman LS (1987) Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. In: *Methods in enzymology* (Wu R ed.), Academic Press; San Diego 155: 501-527.
- Myers RM, Fischer SG, Lerman LS, et al. (1985) Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucl Acid Res* 13: 3131-3145.
- Nacmias B, Latorraca S, Piersanti P, et al. (1995) Apo E genotype and familial Alzheimer's disease: a possible influence on age of onset in APP 717 Val- Ile mutated families. *Neuroscience Lett* 183: 1-3.
- Naruse S, Igara S, Aoki K, et al. (1991) Missense mutation Val-Ile in exon 17 of amyloid precursor protein gene in Japanese familial Alzheimer's disease. *Lancet* 337: 978-979.

- Nishimoto I, Okamoto T, Matsuura Y, et al. (1993) Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G. *Nature* 362: 75-79.
- Osuntokun BO, Sahara A, Ogunniyi AO, et al. (1995) Lack of an association between Apolipoprotein E4 and Alzheimer's disease in elderly Nigerians. *Ann Neurol* 38: 463-465.
- Payami H, Montee K, Kaye J (1994) Evidence for familial factors that protect against dementia and outweigh the effect of increasing age. *Am J Hum Genet* 54: 650-657.
- Peacock ML, Murman DL, Sima AA, et al. (1994) Novel amyloid precursor protein gene mutation (codon 665 ASP) in a patient with late-onset Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 35: 432-438.
- Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC, et al. (1991) Linkage studies in familial Alzheimer's disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet* 48: 1034-1050.
- Plum F (1979) Dementia: an approaching epidemic. *Nature* 279: 372-373.
- Poulter L, Barrat D, Scott CW, et al. (1993) Locations and immunoreactivities of phosphorylation sites on bovine and porcine tau proteins and a PHF-tau fragment. *J Biol Chem* 268: 9636-9644.
- Price DL & Sisodia SS (1994) Cellular and molecular biology of Alzheimer's disease and animal models. *Annu Rev Med* 45: 435-446.
- Quon D, Wang Y, Catalano R, et al. (1991) Formation of β -amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. *Nature* 352: 239-241.
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, et al. (1995) Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376: 775-778.

- Saiki RK (1989) The design and optimization of PCR. In: PCR technology - principles and applications for DNA amplification (HA Erlich ed.), Stockton press; 1: 7-16.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory Manual 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger F (1981) Determination of nucleotide sequence in DNA. Science 214: 1205-1210.
- Sapienza A (1995) AD and related dementias: whose cost? Pharmaceutical News 2: 27-28.
- Schellenberg GD, Deeb SS, Boehnke M, et al. (1992) Association of an apolipoprotein CII allele with familial dementia of the Alzheimer type. J Neurogenet 4: 97-108.
- Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, et al. (1988) Absence of linkage of chromosome 21q21 markers to familial Alzheimer's disease. Science 241: 1507-1510.
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, et al. (1993) Increased amyloid β -peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci USA 90: 9649-9653.
- Scinto LFM, Daffner KR, Dressler D, et al. (1994) A potential noninvasive neurobiological test for Alzheimer's disease. Science 266: 1051-1054.
- Scott J (1993) Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. Lancet 342: 696.
- Seeman P, Laccone F, Reiss J, et al. (1985) Absence of mutation in the apolipoprotein E (Apo E) gene in patients with Alzheimer's disease. Hum Mut 5: 103-104.

Selkoe DJ (1994a) Amyloid beta-protein precursor: new clues to the genesis of Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* 4: 708-716.

Selkoe DJ (1994b) Alzheimer's disease: A central role for amyloid. *J Neuropathol Exp Neurol* 53: 438-447.

Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, et al. (1989) Attachment of a 40- base pair G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results improved detection of single base changes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86: 232-236.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, et al.(1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375: 754-760.

Siegel JS (1980) Recent and prospective demographic trends for the elderly population and some implications for health care. In: *Second conference on the epidemiology of aging* (Haynes SG & Feinleib M eds), US Government Printing Office, Washington, DC, 289-315.

Skoog I, Nilsson L, Palmertz B, et al. (1993) A population-based study of dementia in 85-year-olds. *N Engl J Med* 328: 153-158.

Small GW (1995) Alzheimer's disease and other dementing disorders. In: Kaplan HI & Sadock BJ: *Comprehensive Textbook of Psychiatry. Geriatric Psychiatry*. Chapter 49. Sixth Edition. Baltimore, Williams & Wilkins.

Sorbi S et al. (1995) Missense mutation of S182 gene in Italian families with early onset Alzheimer's disease. *Lancet* 346: 439-440.

St George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinsky RJ, et al. (1987) The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* 235: 885-890.

Strub R, Black FW (1981) Organic brain syndromes: An introduction to neurobehavioral disorders. FA Davis, Philadelphia.

Syvänen AC, Aalto-Setälä K, Kontula K, et al. (1989) Direct Sequencing of affinity-captured amplified human DNA application to the detection of apolipoprotein E polymorphism. FEBS Lett 258: 71-74.

Tanahashi H et al. (1995) Missense mutation of S182 gene in Japanese familial Alzheimer's disease. Lancet 346: 440.

Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, et al. (1987) Amyloid β protein gene: cDNA, mRNA distribution and genetic linkage near the Alzheimer locus. Science 235: 880-884.

Thomas DR, Jones W, Warner N, et al. (1988) Peripheral serotonergic receptor sensitivity in senile dementia of the Alzheimer type. Biol Psychiatry 23: 136-140.

Tomlinson BE, Blessed G, Roth M (1970) Observations on the brains of non-demented old people. J Neurol Sci 11: 205-242.

Tsai MS, Tangalos EG, Petersen RC et al. (1994) Apolipoprotein E: Risk Factor for Alzheimer's Disease. Am J Hum Genet 54: 643-649.

US Veterans Administration (1989) Dementia Guidelines for Diagnosis and Treatment 2nd edn. Prepared by the Office of Geriatrics and Extended Care, Washington DC 1989.

van Duijn CM, Hendriks L, Farre LA, et al. (1994) A population-based study of familial Alzheimer's disease: linkage to chromosomes 14, 19, and 21. Am J Hum Genet 55: 714-727.

van Broeckhoven C et al. (1995) Presenilins and Alzheimer's disease. Nature Genet 11: 230-232.

Wasco E et al. (1995) Familial Alzheimer's chromosome 14 mutations. Nature Med 1: 848.

Young AW (1936) "Franz Nissl, 1860-1918, Alois Alzheimer, 1864-1915". In: Neurological Biographies and Addresses, Foundation Volume, Published for the Staff, to Commemorate the Opening of the Montreal Neurological Institute, of McGill University, London: Oxford University Press, 107-113.

Yu C-E, Payami H, Olson J, et al. (1994) The apolipoprotein E/CI/CII gene cluster and late-onset Alzheimer's disease. Am J Hum Genet 54: 631-642.

Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, et al. (1991) Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. N Engl J Med 325: 1688-1695.

Wisniewski KE, Wisniewski H, Wen GY (1985) Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. Ann Neurol 17: 281-282.

World Health Organization (1991) The neurological adaptation of the international classification of diseases (ICD-10NA). Geneva: World Health Organization.