

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

RENALICE NEVES VIEIRA

**Associação entre polimorfismos dos genes *APOE*, *BDNF*, *DCHS2*
e *GAB2* com o risco e os endofenótipos relacionados ao
Comprometimento Cognitivo Leve Amnésico e à Demência de
Alzheimer**

Orientadora: Maria Aparecida Camargos Bicalho

**Belo Horizonte
2014**

RENALICE NEVES VIEIRA

**Associação entre polimorfismos dos genes *APOE*, *BDNF*, *DCSH2*
e *GAB2* com o risco e os endofenótipos relacionados ao
Comprometimento Cognitivo Leve Amnésico e à Demência de
Alzheimer**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Medicina Molecular

Orientadora: Maria Aparecida Camargos Bicalho

Belo Horizonte

2014

2

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio e confiança, essenciais para que eu possa estar aqui hoje concluindo essa importante etapa.

Ao Lucas, meu companheiro de todas as horas, que sempre me incentivou a ir mais longe.

À minha orientadora, professora Maria Aparecida Camargos Bicalho pela oportunidade oferecida, pelos dados cedidos, pelo incentivo e por todos os ensinamentos.

Ao Marco Túlio Cintra, seus alunos e toda a equipe do ambulatório de CCL pela preciosa seleção dos pacientes, coleta e organização dos dados. Agradeço especialmente a Fabiana e ao Moacir pelas companhias tão agradáveis naquelas tardes de quarta-feira e a Joalce por ter enfrentado comigo todos os prontuários.

A todos os funcionários do Instituto Jenny de Andrade: especialmente aos residentes com a seleção dos pacientes; as secretárias por todos os prontuários solicitados; a equipe da coleta do 1º andar por me ceder o espaço e pela boa vontade em ajudar nos casos difíceis e todos os outros que gentilmente auxiliaram na coleta dos dados.

À Rafaela Ávila, Laiss Bertola e toda a equipe da neuropsicologia pela avaliação neuropsicológica dos pacientes ao longo do projeto e por disponibilizar os dados da Escala Mattis – parte importante do projeto.

Aos professores Luiz Armando de Marco e Débora Marques de Miranda por terem aberto as portas de seus laboratórios, me permitindo conviver e aprender com grandes pesquisadores.

À Luciana e as meninas do laboratório pela paciência, amizade e ensinamentos de bancada.

Aos alunos e pós-graduandos anteriores a mim que montaram esse grande acervo de DNA e dados dos idosos.

Especialmente agradeço a todos os pacientes e familiares deste estudo que gentilmente aceitaram participar, mesmo estando em um momento delicado de suas vidas.

Enfim, a todos citados acima e também aqueles que eu não mencionei, mas que contribuíram de alguma forma para a concretização desse estudo, muito obrigada.

RESUMO

A forma esporádica da Doença de Alzheimer (DA) é complexa e heterogênea com numerosos polimorfismos genéticos que interagem entre si e com fatores ambientais influenciando a susceptibilidade à doença. O principal fator de risco genético estabelecido é o alelo $\epsilon 4$ da apolipoproteína E (*APOE*). O Comprometimento Cognitivo Leve Amnésico (CCLa) é uma síndrome heterogênea que representa um estágio intermediário entre o envelhecimento cognitivo normal e a demência. No CCLa ocorre comprometimento da memória exclusivo - CCLa único domínio - ou associado ao comprometimento de outros domínios da cognição - CCLa múltiplos domínios. O risco de evolução para DA é maior no CCLa.

Nosso objetivo neste trabalho foi estudar o impacto de polimorfismos genéticos de quatro genes (*APOE*, *BDNF*, *DCHS2* e *GAB2*) e de fatores de risco sociodemográficos e clínicos no risco de desenvolver CCLa e DA e em seus endofenótipos - idade de início da doença e desempenho em testes cognitivos (Mini-Exame do Estado Mental [MEEM] e escala para avaliação de demência Mattis). Selecionamos 536 indivíduos com idade superior a 60 anos que foram submetidos ao mesmo protocolo de pesquisa e separados em três grupos: controles com cognição normal para idade e escolaridade, CCLa e DA.

Nossos resultados mostraram associação entre diabetes *mellitus* tipo 2 (DM) e o CCLa; entre dislipidemia e o CCLa apenas em mulheres; entre idade avançada e baixa escolaridade com a DA; e entre a hipertensão arterial e a DA apenas no subgrupo não carreador do alelo $\epsilon 4$. Com relação aos polimorfismos, os genes *DCHS2* e *APOE* foram associados com o CCLa e com DA. A presença do alelo $\epsilon 4$ foi correlacionada com início mais precoce da DA. Além disso, observamos que os genes *BDNF* e *APOE* influenciaram o desempenho em testes cognitivos dos grupos controle e CCLa.

Nossos dados sugerem diversos fatores associados com a DA em diferentes momentos evolutivos de acordo com o *background* genético e com o sexo dos participantes ressaltando a importância de se levar em consideração essas diferenças nos estudos.

ABSTRACT

The late onset form of Alzheimer's disease (AD) is complex and heterogeneous and there are several genetic polymorphisms that interact each other and with non-genetic factors influencing its susceptibility. The main established genetic risk factor is the $\epsilon 4$ allele of the apolipoprotein E (*APOE*). The amnesic form of the Mild Cognitive Impairment (aMCI) is a heterogeneous syndrome that represents an intermediate stage between cognitive changes from normal aging and dementia. The aMCI characterizes only by memory impairment – single domain aMCI - or associated with other cognitive impairments – multiple domains aMCI. The aMCI is a risk factor for progression to AD.

In this cross-sectional study we aimed to study the impact of genetic polymorphisms of four genes (*APOE*, *BDNF*, *DCHS2* e *GAB2*), and socio-demographic and clinic factors on the risk of developing AD and its endophenotypes - age-at-onset of disease and performance on cognitive tests (MMSE and Mattis Dementia Rating Scale). 536 elderly subjects were selected, submitted to the same research protocol and divided into three groups: controls, aMCI and AD.

Our results demonstrated an association of type 2 diabetes mellitus and aMCI; dyslipidemia and aMCI only in women; advanced age and low level of education with AD and between arterial hypertension and AD only in $\epsilon 4$ non-carrier subgroup. Regarding the genetic polymorphisms, the *DCHS2* and *APOE* genes were associated with aMCI and AD. The $\epsilon 4$ allele was correlated with an earlier onset of AD. We also observed that *BDNF* and *APOE* genes influenced the cognitive performance of controls and aMCI individuals.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Bateria de testes cognitivos e funcionais utilizados para avaliação dos sujeitos	26
Tabela 2 - Resumo dos genes e polimorfismos estudados	29
Tabela 3 - Descrição da amostra.....	32
Tabela 4 - Descrição do subgrupo <i>APOE</i> ϵ 4 positivo.....	33
Tabela 5 - Descrição do subgrupo <i>APOE</i> ϵ 4 negativo.....	34
Tabela 6 - Distribuição alélica da <i>APOE</i> nos três grupos	35
Tabela 7 - Distribuição genotípica da <i>APOE</i> nos três grupos	35
Tabela 8 - Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo <i>rs6265</i> do gene <i>BDNF</i>	36
Tabela 9 - Distribuição alélica e genotípica do gene <i>DCSH2</i> (<i>rs1466662</i>) na amostra total e estratificada pela presença do alelo ϵ 4	37
Tabela 10 - Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo <i>rs2373115</i> na amostra total...	38
Tabela 11 - Modelo final para os fatores associados ao CCL amnésico	39
Tabela 12 - Modelo final para os fatores associados a doença de Alzheimer	39
Tabela 13 - Resultados (valor de “p”) das análises univariadas comparando a pontuação do MEEM entre os genótipos.....	41
Tabela 14 - Pontuação da escala Mattis nas subescalas e valor total	42
Tabela 15 - Valor de “p” das análises univariadas comparando a pontuação na escala Mattis entre os genótipos	43

LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela Suplementar 1 – Resultados das análises (valor p) para amostra total e o teste estatístico utilizado.....	70
Tabela Suplementar 2 - Resultados das análises (valor p) para subgrupo $\epsilon 4$ positivo e o teste estatístico utilizado.....	70
Tabela Suplementar 3 - Resultados das análises (valor p) para subgrupo $\epsilon 4$ negativo e o teste estatístico utilizado.....	71
Tabela Suplementar 4 - Distribuições alélicas da <i>APOE</i> em homens e mulheres.....	71
Tabela Suplementar 5 - Distribuições alélicas e genotípicas do <i>BDNF</i> para os subgrupos $\epsilon 4$ positivo e negativo	72
Tabela Suplementar 6 - Distribuições alélicas e genotípicas do <i>DCSH2</i> para homens e mulheres	72
Tabela Suplementar 7 - Distribuições alélicas e genotípicas do <i>GAB2</i> para homens e mulheres	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Papel potencial dos genes relacionados com a patogênese de DA.....	16
Figura 2 - Idade de início da DA de acordo com a presença do alelo $\epsilon 4$	40

ABREVIATURAS E SIGLAS

A β – Peptídeo beta-amilóide
APOE – Apolipoproteína E
APP - Proteína precursora amilóide
BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-derived neurotrophic factor*)
CCL - Comprometimento Cognitivo Leve
CCLa – Comprometimento Cognitivo Leve Amnésico
CDR – Escala Clínica de Demência (*Clinical Dementia Rating*)
CERAD – Consórcio para Estabelecimento de Registro para a Doença de Alzheimer (*Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*)
COEP – Comitê de Ética em Pesquisa
DA – Doença de Alzheimer
DCHS2 - *Dachsous cadherin-related 2*
DM – *Diabetes Melitus* tipo 2
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DSM-IV - *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV*
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
GAB2 - Proteína de ligação 2 associada ao Grb (Grb-associated binding protein 2)
GDS - Escala de depressão geriátrica (*Geriatric Depression Scale*)
GSK3 – Glicogênio Sintase Quinase 3
GWAS - *Genome-wide association study*
HAS - Hipertensão arterial sistêmica
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IP - Iniciação e Perseveração (Subescala da Escala Mattis)
FAB - *Frontal and Assessment Battery*
MDRS – Escala para Avaliação de Demência de Mattis (*Mattis Dementia Rating Scale*)
MEEM - Mini-Exame do Estado Mental
NHIS - *National Health Interview Survey*
NINCDS-ADRDA - *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*
NPI – Inventário neuropsiquiátrico (*Neuropsychiatric Inventory*)
OR – *Odds Ratio*
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
PIK3 - Fosfoinositídeo 3-quinase
SNP – Polimorfismo de um único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphism*)
TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES.....	7
LISTA DE FIGURAS	7
ABREVIATURAS E SIGLAS	8
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 A transição epidemiológica e o envelhecimento no Brasil	11
1.2 A Doença de Alzheimer	11
1.2.1 Epidemiologia e Apresentação Clínica	11
1.2.2 Patogênese e Neuropatologia	13
1.2.3 Fatores de risco	14
1.3 O Comprometimento Cognitivo Leve	14
1.4 A Genética e os endofenótipos	16
1.5 APOE	17
1.6 BDNF	19
1.7 DCHS2	21
1.8 GAB2	22
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Geral.....	24
2.2 Específicos.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Desenho do estudo e seleção da amostra	25
3.2 Variáveis analisadas.....	27
3.2.1 Dados sociodemográficos e clínicos.....	27
3.2.2 Escala para Avaliação de Demência Mattis	28
3.2.3 Variáveis Genéticas – Polimorfismos de um único nucleotídeo (<i>SNPs</i>)	29
3.3 Genotipagem.....	29
3.3.1 Extração do DNA da amostra.....	29
3.3.2 Genotipagem por PCR em Tempo Real (Ensaio <i>Taqman</i> [®]).....	29

3.4	Análises Estatísticas.....	30
3.5	Considerações Éticas	31
4.	RESULTADOS	32
4.1	Descrição da Amostra	32
4.2	Genotipagem.....	34
4.3	Análise Multivariada.....	38
4.4	Idade de início da doença	40
4.5	Testes Cognitivos.....	41
5.	DISCUSSÃO	44
6.	CONCLUSÕES	55
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
8.	TABELAS SUPLEMENTARES	70
9.	ANEXOS.....	74
	Anexo 1 – Critérios diagnósticos para demência (DSM IV) - Critérios diagnósticos da NINCDS-ADRDA para o diagnóstico de Doença de Alzheimer	74
	Anexo 2 – TCLE: Abordagem multidisciplinar do binômio depressão-demência no idoso	77
	Anexo 3 – TCLE - Coorte prospectiva de pacientes com Comprometimento Cognitivo Leve Amnésico – Determinação de fatores de risco para conversão para demência de Alzheimer no Brasil (Versão para participantes e para representantes legais)	79
	Anexo 4 – Parecer do Conselho de ética em Pesquisa (COEP).....	85

1. INTRODUÇÃO

1.1 A transição epidemiológica e o envelhecimento no Brasil

O Brasil tem passado nas últimas décadas por um acelerado processo de envelhecimento e um aumento na expectativa de vida da população. Segundo o DATASUS, em 2010, o Brasil apresentava uma população total de 190.755.799 habitantes, sendo 20.590.599 com idade acima de 60 anos, correspondendo 10,8% da população brasileira. Em 2000 essa porcentagem era de 8,6% e, em 1991, 7,3%. Projeções populacionais do IBGE estimam que em 2020 uma parcela de 13,7% dos habitantes terá idade superior a 60 anos (IBGE, 2008).

Esse processo determina importantes alterações no perfil epidemiológico e no quadro de morbi-mortalidade. Embora seja um processo desigual nas diferentes regiões do país, essas mudanças demográficas e epidemiológicas têm um grande impacto sobre as políticas sociais e de saúde (IBGE, 2009), exigindo um melhor planejamento dos recursos e adequação da infraestrutura. Nesse contexto, as doenças crônico-degenerativas estão adquirindo cada vez mais importância, sendo a demência uma das mais importantes causas de morbi-mortalidade (Nitrini, 1999).

1.2 A Doença de Alzheimer

1.2.1 Epidemiologia e Apresentação Clínica

Os transtornos de demência caracterizam pelo desenvolvimento de déficits em múltiplas funções cognitivas, incluindo memória, atenção e aprendizado, pensamento, orientação, compreensão, cálculo, linguagem e julgamento. Os déficits cognitivos são suficientemente graves para comprometer o funcionamento ocupacional ou social e representam um declínio em relação a um nível anteriormente superior de funcionamento. Apresentam três características principais: prejuízo da memória, problemas de comportamento e perda das habilidades (DSM-IV).

A prevalência média mundial de demência varia de 2,2% na África a 9,4% na Europa (Lopes & Bottino, 2002). A Doença de Alzheimer (DA) é o tipo mais comum de demência, sendo responsável por 60 a 80% dos casos (Sosa-Ortiz e cols., 2012). Contabiliza-se em 35,6

milhões portadores de DA em todo o mundo e a expectativa é que este número cresça atingindo 65,7 milhões em 2030 – reflexo do envelhecimento da população mundial (*World Alzheimer Report*, 2010). Estima-se que a prevalência de DA dobre a cada cinco anos após os 65 anos de idade (Ferri e cols., 2005). Semelhante aos números mundiais, no Brasil a prevalência de demência na população com mais de 65 anos é de 7,1% - sendo a DA responsável por 55% dos casos. Idade, sexo feminino e baixos níveis educacionais estão significativamente associados com uma alta prevalência de demência (Herrera e cols., 2002).

A DA é uma doença cerebral degenerativa primária de etiologia desconhecida (exceto em casos familiares que correspondem 1 a 5% dos casos) com aspectos neuropatológicos e neuroquímicos característicos. Manifesta-se por deterioração da memória e outras funções cognitivas, comprometimento progressivo das atividades de vida diária (AVD) (incapacidade funcional) e pela presença de sintomas neuropsiquiátricos e alterações comportamentais (Minnati e cols., 2009). O transtorno é usualmente insidioso no início e se desenvolve lenta e progressivamente durante um período de vários anos. Nos estágios iniciais, o paciente apresenta esquecimento de fatos recentes, dificuldade para guardar novas informações e queda em seu rendimento funcional em tarefas complexas. Com a progressão da doença, há um comprometimento de outras áreas da cognição (como a linguagem e função executiva) que tipicamente está associado com dificuldade no trabalho, em situações sociais ou em atividades domésticas. Nas fases mais avançadas, o paciente perde a capacidade de funcionar de modo independente, tornando-se dependente de um cuidador (Abreu e cols., 2005; Bekris e cols., 2010).

Em um estudo epidemiológico brasileiro, Tatsch e cols. (2006) observaram que 78,3% dos pacientes apresentavam um ou mais sintomas neuropsiquiátricos e alterações comportamentais, entre os quais apatia (53,3%), depressão (38,3%), alterações do sono (38,3%), ansiedade (25%) e agitação/agressividade (20%) foram os mais comuns. Os sintomas neuropsiquiátricos somados ao declínio cognitivo contribuem para o comprometimento da funcionalidade e da independência destes pacientes aumentando os custos com os cuidados (Vega e cols., 2007).

O diagnóstico de DA baseia-se no quadro clínico. O diagnóstico envolve uma avaliação completa do histórico do início e da progressão dos sintomas, revisão do histórico médico do

paciente, exame físico completo, avaliação das habilidades funcionais e das funções cognitivas nos domínios de memória, atenção, linguagem e habilidades visuoespaciais. Testes laboratoriais (hemograma completo, TSH, enzimas hepáticas, vitamina B12, sorologia para sífilis e AIDS, entre outros) e de neuroimagem estrutural e funcional também podem ser utilizados. A avaliação cognitiva é feita com o auxílio de testes de rastreio cognitivo como o Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) e com baterias multifuncionais de testes neuropsicológicos (McKhann e cols., 2011).

1.2.2 Patogênese e Neuropatologia

Do ponto de vista neuropatológico, a DA caracteriza-se por placas extracelulares compostas por peptídeos beta-amilóides ($A\beta$) e emaranhados intracelulares da proteína tau (τ) hiperfosforilada em várias regiões cerebrais, denominados emaranhados neurofibrilares, associados à perda neuronal e sináptica (Braak & Braak, 1996). Observa-se também dano microvascular, pronunciada inflamação nas regiões cerebrais afetadas, déficit no transporte axonal, disfunção mitocondrial e depleção de neurotrofinas e neurotransmissores (Querfurth & LaFerla, 2010). A progressiva atrofia cortical é o principal correlato anatômico da DA ocorrendo primeiramente no lobo temporal medial (incluindo o hipocampo) (Minati e cols., 2009).

O atual entendimento da patogênese da DA baseia-se na hipótese da cascata amilóide. De acordo com esta hipótese, é o acúmulo e deposição do peptídeo $A\beta$ no cérebro o evento inicial que leva a neurodegeneração observada na DA (Hardy & Selkoe, 2002). $A\beta$ é produzido pela clivagem da proteína precursora amiloide (APP) durante o metabolismo normal. Evidências de estudos genéticos, patológicos e funcionais têm demonstrado que o acúmulo e agregação de $A\beta$ se deve ao desequilíbrio entre a sua produção e a depuração no cérebro (Liu e cols., 2013). A forma oligomérica do peptídeo apresenta significativa neurotoxicidade o que leva a morte celular e degeneração sináptica (Kaye e cols., 2003; Niedowicz e cols., 2011).

Outro marco neuropatológico da doença é a presença de emaranhados neurofibrilares. A proteína axonal tau promove a formação e estabilidade dos micrótubulos e o transporte vesicular. A sua forma hiperfosforilada é insolúvel, sem afinidade com os microtúbulos e se agrega em filamentos helicoidais formando os emaranhados. Assim como $A\beta$, os agregados

de tau são citotóxicos e causam disfunção sináptica, perda axonal e danos cognitivos (Minati e cols., 2009; Querfurth & LaFerla, 2010).

1.2.3 Fatores de risco

A DA é classificada de acordo com o início dos sintomas clínicos: a DA de início precoce tem seu início antes dos 60 anos e a DA de início tardio (do inglês LOAD - *Late Onset Alzheimer's Disease* ou forma esporádica) após os 60 anos de idade (Tanzi, 2012). A forma esporádica é a mais frequente sendo responsável por 95% dos casos.

A LOAD é considerada uma desordem poligênica e multifatorial sendo influenciada por múltiplos fatores de risco genéticos e ambientais. A idade avançada e história familiar da doença são os principais fatores de risco.

Além de fatores de risco genéticos, outros fatores vasculares e relacionados ao estilo de vida têm sido associados com a doença. Apesar das diferenças entre as populações estudadas, a idade, o baixo nível educacional e os fatores de risco cardiovasculares são identificados como importantes fatores de risco para o desenvolvimento da doença. Outros fatores de risco estão relacionados ao estilo de vida (tabagismo e alto consumo alcoólico), dieta (ingestão de gordura saturada, baixa ingestão de vitamina B e alta ingestão de homocisteína) e outros (depressão e injúria cerebral traumática). Por outro lado, alguns fatores psicossociais (alto nível educacional, alta complexidade no trabalho, engajamento social e atividades mentalmente estimulantes), fatores relacionados ao estilo de vida (atividade física e consumo moderado de álcool) e a dieta (dieta mediterrânea, consumo de vitamina D e vitaminas antioxidantes, entre outros) estão associados como fatores protetores contra a DA (Imtiaz e cols., 2014; Reitz & Mayeux, 2014; Solomon e cols., 2014). Os fatores de risco genéticos serão discutidos em sessão posterior.

1.3 O Comprometimento Cognitivo Leve

A trajetória clínica da DA é considerada por muitos autores um contínuo fisiopatológico com três estágios principais: estágio assintomático ou pré-clínico; sintomático prodromico ou

comprometimento cognitivo leve (CCL) devido a DA; e a demência de Alzheimer (Morris e cols., 2014).

O CCL representa um estado intermediário entre as alterações cognitivas normais do envelhecimento e a demência. Pacientes portadores de CCL apresentam declínio cognitivo maior do que o esperado para a idade e o seu nível educacional. Entretanto, estas alterações não interferem significativamente no desempenho das AVD e o paciente não preenche os critérios para demência (Petersen e cols., 1999; Petersen, 2011). Esta condição tem sido alvo de grande interesse dos pesquisadores por ser favorável a possíveis intervenções terapêuticas em estudo no presente e promissoras para um futuro próximo (Petersen e cols., 2001).

O CCL é uma síndrome heterogênea que pode progredir para DA ou outras demências, permanecer estável ou, até mesmo reverter para o funcionamento cognitivo normal (Sachdev e cols., 2012). A incidência de demência entre esses pacientes é significativamente mais alta do que na população em geral variando entre 5 a 15% por ano. A prevalência estimada de CCL em pessoas acima de 65 anos varia de 10 a 20% (Petersen, 2011). A prevalência aumenta com a idade, em sujeitos portadores do alelo $\epsilon 4$ da *APOE* e em homens e diminui com altos níveis educacionais (Petersen e cols., 2010). Em um estudo epidemiológico brasileiro, a taxa de incidência de CCL em sujeitos acima de 60 anos foi 13,2 para cada 1000 pessoas por ano (Chaves e cols., 2009).

O CCL é dividido em dois subtipos baseado na presença de comprometimento da memória: amnésico e não amnésico. O tipo amnésico é o mais comum e envolve predominantemente prejuízo na memória. Pacientes com CCL amnésico (CCLa) tem maior probabilidade de desenvolver a DA. O tipo não amnésico envolve outros domínios da cognição como, por exemplo, a função executiva, atenção ou linguagem. De acordo com o número de domínios cognitivos afetados, o CCL também pode ser dividido em único ou múltiplos domínios (Petersen, 2011).

Idade avançada, baixo nível educacional e hipertensão arterial sistêmica (HAS) estão associados com elevada incidência de CCL. A presença do alelo $\epsilon 4$ da *APOE* também é um fator de risco para o CCL e para uma progressão mais rápida para demência (Gauthier e cols., 2006; Luck e cols., 2010).

1.4 A Genética e os endofenótipos

A forma tardia da DA tem um padrão de herança geneticamente complexo em que os fatores de risco genéticos agem em conjunto com os ambientais determinando a susceptibilidade à doença (Tanzi, 2012). A herdabilidade dos casos tardios é estimada em 60 a 80% (Gatz e cols., 2006), envolvendo numerosos fatores de riscos genéticos de frequência relativamente alta mas com baixa penetrância (Bertram e cols., 2010).

Nos últimos anos as análises genéticas têm focado na identificação de variantes comuns através de estudos de *GWAS* (*Genome-wide Association Studies*). Desde 2009 *GWAS* em larga escala já identificaram 20 *loci* potencialmente relacionados à doença (Medway & Morgan, 2014). A identificação de novos genes de susceptibilidade tem consolidado a importância do metabolismo da APP e da tau e relacionado também a resposta imune, a inflamação, o metabolismo lipídico, a endocitose e o transporte intracelular nos processos da doença (Tosto & Reitz, 2013). Os principais genes identificados (fora da região do gene *APOE*) foram: *clusterin*, *CR1*, *PICALM* e *BIN1* (Figura 1).

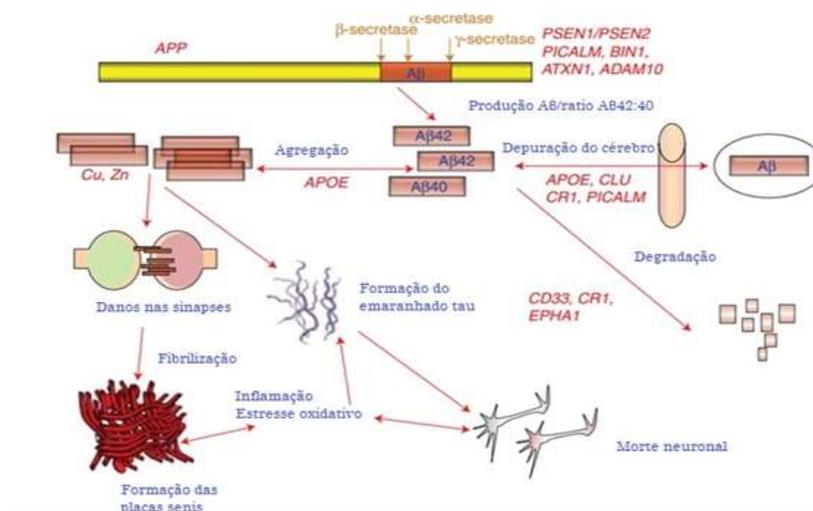


Figura 1 - Papel potencial dos genes relacionados (em vermelho) com a patogênese de DA. (Adaptado de Tanzi, 2012)

Entretanto esses *loci* apresentam um efeito pequeno com *odds ratio* (OR) variando de 1,1 a 1,5, permanecendo ainda o alelo $\epsilon 4$ da *APOE* como o principal fator de risco genético (Bertram e cols., 2010; Tosto & Reitz, 2013). Além disso, replicações positivas e negativas

dos mesmos genes têm sido reportadas na literatura. A heterogeneidade biológica e genética entre as populações pode ser uma causa da falta de reprodutibilidade entre os estudos (Bettens e cols., 2010). Uma proporção substancial da variância genética continua inexplicada pelos genes de susceptibilidade conhecidos (Tanzi, 2012). Essa “herdabilidade perdida” pode ser atribuída a variantes comuns com efeito pequeno, variantes raras de grande efeito e/ou variações estruturais cromossômicas e de números de cópias (Bertram e cols., 2010; Bettens e cols., 2010). Efeitos epistáticos e interações entre genes também devem ser levados em consideração (Tosto & Reitz, 2013).

Nesse contexto o estudo de endofenótipos pode ser uma abordagem alternativa ao tradicional fenótipo de doença binário (caso/controle) para a identificação de genes de susceptibilidade para a DA. Os endofenótipos (ou fenótipos intermediários) são fenótipos biologicamente relevantes, quantitativos e herdáveis. Representam um desfecho intermediário entre os genes e o diagnóstico clínico, portanto estão mais próximos da variação genética e mais fácil de detectar. São estatisticamente mais poderosos do que a abordagem caso-controle e constituem uma medida mais homogênea e precisa (Ertekin-Taner e cols., 2013). São características geneticamente correlacionadas com a doença e podem ser medidas em indivíduos afetados e não afetados (Reitz & Mayeux, 2009).

Os endofenótipos mais comumente estudados na DA são a idade de início da doença, o desempenho em testes cognitivos, exames de neuroimagem e biomarcadores no sangue e no líquido cefalorraquidiano (Reitz e Mayeux, 2009; Shulman e cols., 2010).

1.5 APOE

O gene *APOE* (cromossomo 19q13.2) codifica a apolipoproteína E (apoE, massa molecular de 34 kDa) que tem função na regulação da homeostase lipídica através do transporte e entrega de lipídios no plasma e no sistema nervoso central. É expressa em vários órgãos, com as maiores expressões no fígado e no cérebro (Mahley & Rall, 2000). No cérebro, é produzida principalmente pelos astrócitos seguido da microglia e, em algumas condições, pelos neurônios (Kim e cols., 2009). As lipoproteínas contendo a apoE se ligam a receptores nos neurônios, promovendo a entrega de colesterol que é utilizado para crescimento, reparo e sinaptogênese (Vance & Hayashi, 2010).

O gene *APOE* possui três variantes alélicas principais, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$, que codificam proteínas que diferem entre si por substituições de um único aminoácido (arginina – cistina) nas posições 112 e 158. Os alelos ϵ são formados pela combinação dos nucleotídeos C/T dos polimorfismos *rs429358* e *rs4712*. As diferenças entre aminoácidos alteram a carga e a propriedade estrutural das proteínas, influenciando a função das isoformas e a ligação com os seus receptores e outros lipídios. As diferentes isoformas têm impactos diferentes nos níveis sanguíneos dos lipídios e lipoproteínas. Estima-se que a apoE é responsável por 10% da variação total nos níveis de colesterol (Mahley & Rall, 2000). O alelo $\epsilon 4$ está associado com hiperlipidemia e hipercolesterolemia o que eleva o risco de aterosclerose e doenças cardiovasculares (Lahoz e cols., 2001; Mahley & Rall, 2000).

O alelo $\epsilon 4$ (Arg112, Arg158) é o principal fator de risco genético conhecido para a DA; cada cópia do alelo aumenta o risco aproximadamente 3 a 4 vezes e diminui a idade de início da doença (Corder e cols., 1993; Coon e cols., 2007). Por outro lado, o alelo $\epsilon 2$ parece exercer um efeito protetor (Corder e cols., 1994). Segundo revisão de Liu e cols. (2013), a prevalência do alelo $\epsilon 4$ também é substancialmente mais elevada em pacientes com CCLa comparado com controles, e pode ser considerado como um fator preditivo para determinar o desfecho clínico e a progressão para a DA. Condizente com as frequências mundiais, na população brasileira o alelo $\epsilon 3$ é o mais frequente (77%), seguido pelo $\epsilon 4$ (16%) e $\epsilon 2$ (7%) (Ojopi e cols., 2004).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar o papel das isoformas da apoE na patogênese da DA. Evidências sugerem que o principal mecanismo é através da ação no metabolismo do peptídeo A β (produção e depuração), influenciando a deposição do peptídeo e a formação das placas senis. As isoformas afetam diferencialmente cada um dos processos que culminam na formação da placa amilóide. Outros mecanismos como efeitos na função sináptica, plasticidade neuronal, neurotoxicidade, metabolismo lipídico anormal, hiperfosforilação da tau e mediação da resposta inflamatória também podem contribuir com o processo da doença (Dorey e cols., 2014; Kim e cols., 2009; Liu e cols., 2013).

Enquanto o impacto da *APOE* no risco e na idade de início da doença é consistente entre os vários estudos, há controvérsias se os alelos influenciam os fenótipos cognitivos e a taxa de

declínio cognitivo que se segue após o início da doença. Apesar das discrepâncias na literatura sobre o efeito no desempenho cognitivo, o alelo $\epsilon 4$ parece estar associado com um pior desempenho em testes de função cognitiva e maior taxa de declínio cognitivo em pacientes com CCLa e DA (Cosentino e cols., 2008; Liu e cols., 2013; Whitehair e cols., 2010; Wisdom e cols., 2011). Alguns estudos sugerem que o efeito do alelo $\epsilon 4$ no declínio cognitivo é mais forte nos estágios iniciais da DA e mais fraco no estágios mais tardios (Cosentino e cols., 2008; Kim e cols., 2009). O alelo também pode estar relacionado a um pior desempenho em testes de memória episódica, funcionamento executivo e habilidades cognitivas globais em sujeitos cognitivamente normais (Small e cols., 2004; Wehling e cols., 2007; Wisdom e cols., 2011). Entretanto o efeito pode depender da idade, da escolaridade e dos domínios cognitivos avaliados (Shin e cols., 2014).

Conforme revisado por Panza e cols. (2011), os alelos da *APOE* podem influenciar também as manifestações neuropsiquiátricas que acompanham a doença. Vários estudos relataram uma significativa associação entre o alelo $\epsilon 4$ e um aumento na depressão de início tardio, na ansiedade, na apatia, nos sintomas psicóticos e na agitação e agressividade de pacientes com DA. Entretanto os resultados são inconsistentes entre os estudos.

1.6 BDNF

O fator neurotrófico derivado do cérebro - BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) pertence a uma família de neurotrofinas amplamente expressa no sistema nervoso central com as maiores concentrações no hipocampo e no córtex cerebral (Hofer e cols., 1990). As neurotrofinas são importantes reguladoras da neurogênese, sobrevivência, função e plasticidade neuronal durante o desenvolvimento e a vida adulta (Huang & Reichardt, 2001; Mattson e cols., 2004).

Devido as suas variadas funções no sistema nervoso, o BDNF e seus polimorfismos genéticos têm sido relacionados com a patogênese de várias doenças neuropsiquiátricas e desordens de personalidade (Hong e cols., 2011). O BDNF tem um papel chave na modulação da transmissão sináptica e da plasticidade no cérebro (Bekinschtein e cols., 2008). Como os processos de aprendizagem e memória que dependem desses mecanismos celulares estão afetados na DA e no envelhecimento (Tapia-Arancibia e cols., 2008), várias evidências

implicam a neurotrofina nos processos patológicos associados a DA (Diniz & Teixeira, 2011; Fumagali e cols., 2006; Schindowski e cols., 2008; Zhang e cols., 2012).

A expressão de BDNF e seus receptores estão diminuídos no hipocampo e em algumas áreas corticais em pacientes com DA (Tapia-Arancibia e cols., 2008). Achados sugerem que o peptídeo β -amilóide pode comprometer a sinalização e a produção do BDNF (Mattson e cols., 2004). Ye e cols. (2011) sugeriram que o início da doença está intimamente relacionado com a disfunção mitocondrial e o comprometimento do transporte axonal de BDNF. A disfunção mitocondrial observada na DA é decorrente do metabolismo anormal do peptídeo A β . Esse processo compromete o transporte axonal de BDNF e sua sinalização, agravando a sobrevivência neuronal e induzindo a perda de neurônios e de sinapses, o que contribui para a patogênese da doença. Por outro lado, foi observado em modelos *in vivo* e *in vitro* que o BDNF pode ter um efeito protetor contra a neurotoxicidade causada por A β (Arancibia e cols., 2008). Outras evidências também apontam a neurotrofina em outros processos relacionados à DA, como na fosforilação da proteína tau, na atividade inflamatória e na neurogênese hipocampal (Diniz & Teixeira, 2011; Schindowski e cols., 2008; Zhang e cols., 2012).

A variedade de funções nas quais o BDNF está envolvido parece estar correlacionada com a complexidade do seu gene e a sua delicada regulação. O gene está localizado no cromossomo 11p13-p14 e é composto por onze éxons e nove promotores (Tapia-Arancibia e cols., 2008). Seus transcritos podem estar envolvidos em diferentes funções celulares devido a sua localização e tradução seletiva dentro dos neurônios (Ann e cols., 2008).

O polimorfismo funcional *rs6265* (G/A) que resulta na troca do aminoácido valina (Val) pela metionina (Met) no códon 66 (Val66Met) tem sido alvo de estudo na DA, apresentando resultados discordantes. Enquanto alguns estudos tem demonstrado o alelo Val mais frequente em pacientes com DA do que em controles (Ventriciglia e cols., 2002; Fehér e cols., 2009; Huang e cols., 2007), outros não confirmam tal associação (Nacmias e cols., 2004; Bodner e cols., 2005; Desai e cols., 2005). Apesar de não alterar a função da proteína madura, o polimorfismo resulta no rompimento do empacotamento do BDNF em grânulos secretórios, comprometendo a sua secreção dependente de atividade (Chen e cols., 2004; Egan e cols., 2003). Quando as duas variantes (Val e Met) são expressas juntas na mesma célula há a

formação de heterodímeros de BDNF que são menos eficientes na formação dos grânulos secretórios, resultando em uma secreção quantitativamente diminuída (Chen e cols., 2004).

Um endofenótipo associado com a variante é o comprometimento das habilidades cognitivas. Voineskos e cols. (2011) observaram que o polimorfismo conferia risco de uma forma dependente da idade nas estruturas cerebrais vulneráveis nos estágios iniciais da DA e na função cognitiva de adultos saudáveis. A influência do BDNF na função cognitiva pode mudar ao longo da vida e o alelo Met pode ser neuroprotetor durante as fases mais tardias da vida (Erickson e cols., 2008). Carreadores do alelo Met têm volume hipocampal reduzido e déficits em tarefas de memória que dependem do hipocampo, como recordação de locais e eventos (Egan e cols., 2003; Chen e cols., 2008). Por outro lado, em indivíduos idosos, a homozigose Val/Val está associada com um pior desempenho cognitivo em tarefas de memória e função executiva (Nagata e cols., 2012; Voineskos e cols., 2011; Erickson e cols., 2008).

Além das células do sistema nervoso central, as plaquetas e células endoteliais vasculares também são fontes de BDNF (Laske e cols., 2007). Há uma correlação positiva ($r = 0,81$) entre os níveis de BDNF sérico e do córtex e hipocampo (Erickson e cols., 2010). Concentrações alteradas de BDNF no soro e no plasma têm sido relatadas em pacientes com CCLa e DA. Relatos de aumento (Angelucci e cols., 2010; Faria e cols., 2014; Laske e cols., 2006), diminuição (Laske e cols., 2007; Lee e cols., 2009; Leyhe e cols., 2008; Ventriglia e cols., 2013) e nenhuma diferença significativa nas concentrações sanguíneas (O'Bryant e cols., 2010; Woolley e cols., 2012) já foram descritos nas diversas publicações. Os resultados inconsistentes podem ser explicados em parte pelos diferentes estágios da doença estudados. As concentrações séricas variam com o curso da doença e se correlacionam com a gravidade da demência (Laske e cols., 2007).

1.7 DCHS2

O gene *DCHS2* (*dachshous cadherin-related 2* - cromossomo 4q31.3) codifica a glicoproteína protocaderina-23, expressa no córtex cerebral e pertencente à superfamília das caderinas (Hoeng e cols., 2004). Sua função não é exatamente conhecida ainda, mas sabe-se que outros

membros da família à qual está inserida (Fat-Dachsous) controlam a proliferação e a polaridade planar das células (Hirano & Takeich, 2012).

A superfamília das caderinas compreende proteínas transmembranas de adesão celular dependentes de cálcio. A adesão celular mantém a integridade funcional e estrutural dos organismos multicelulares, sendo essencial em vários processos biológicos e em vias de sinalização. A maioria destas proteínas é expressa no sistema nervoso central onde contribuem para o desenvolvimento e adesão seletiva do tecido neuronal, na formação das redes neuronais, na sinaptogênese e na plasticidade sináptica (Hirano & Takeich, 2012). Devido ao seu papel na regulação da morfogênese e em várias vias de sinalização intracelulares, as caderinas já foram relacionadas a vários transtornos neuropsiquiátricos como o autismo, a esquizofrenia e o retardo mental. Disfunções na adesão celular mediada por essas proteínas podem alterar a conectividade e o processamento coerente de informações no cérebro humano (Redies e cols., 2012).

Kamboh e cols. (2012) realizaram uma meta-análise com dados de três *GWAS* independentes com o objetivo de identificar genes associados com a idade de início da doença. Como esperado, o sinal mais significativo foi observado na região do gene *APOE* no cromossomo 19 ($p < 5 \times 10^{-08}$). Fora dessa região, a associação mais significativa foi com o gene *DCHS2* (*rs1466662* T/A, $p = 4,95 \times 10^{-07}$), seguido de outros dez *loci*. Como é expresso no córtex cerebral, o gene se torna particularmente relevante como candidato para modificar a idade de início da DA.

1.8 GAB2

O gene *GAB2* (cromossomo 11q13.4-q13.5) codifica a proteína de ligação 2 associada ao Grb (peso molecular: 97 – 100 kD). A proteína Gab2 pertence a uma família de moléculas intracelulares que interagem ou se ligam a várias proteínas de sinalização, agindo como mediadores, integrando e amplificando diferentes sinais celulares. Esses sinais são críticos para o crescimento, sobrevivência, diferenciação e apoptose celular (Pan e cols., 2010).

Reiman e cols. (2007) conduziram um *GWAS* no qual foi observado pela primeira vez a associação de *GAB2* com o risco para desenvolver a DA. As análises feitas sugerem que o

gene *GAB2* interage com o alelo $\epsilon 4$ da *APOE* modificando o risco para a DA. Seis polimorfismos e um bloco haplotípico foram associados com a doença sendo o *SNP* (polimorfismo de um único nucleotídeo) *rs2373115* (G/T) o mais significativo. Em pacientes portadores do alelo $\epsilon 4$ o genótipo GG se correlacionou com risco aumentado para DA (OR = 2,36) enquanto no grupo não carreador deste genótipo não se observou diferença significativa.

Gab2 pode ter um papel protetor contra a formação dos emaranhados neurofibrilares e a morte neuronal (Reiman e cols., 2007). Gab2 é o principal ativador da via de sinalização PI3K. As reações em cascata que se seguem após a ativação do PI3K promovem a inativação do Gsk3 o que por sua vez é responsável pela fosforilação da tau (Pan e cols., 2010). As variantes genéticas de *GAB2* podem proteger os neurônios através do aumento de sua expressão, o que por sua vez está associado com uma diminuição da patologia da DA (Reiman e cols., 2007; Zou e cols., 2013).

Apesar dos estudos subsequentes terem apresentado resultados contrastantes, duas meta-análises publicadas recentemente sugerem *GAB2* como um forte gene candidato para explicar a susceptibilidade para DA (Jin e cols., 2013; Zou e cols., 2013).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a associação entre polimorfismos dos genes *APOE* (alelos ϵ), *BDNF* (*rs6265*), *DCSH2* (*rs1466662*) e *GAB2* (*rs2373115*) e o CCLa e a DA em uma amostra de idosos brasileiros.

2.2 Específicos

- a. Avaliar a frequência dos polimorfismos descritos acima na amostra estudada comparada com um grupo controle;
- b. Avaliar a associação entre os polimorfismos descritos acima, variáveis clínicas e sociodemográficas e o risco para o CCLa e para a DA;
- c. Avaliar a influência dos polimorfismos descritos acima na idade de início da DA;
- d. Avaliar a influência dos polimorfismos descritos acima no desempenho em testes cognitivos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo e seleção da amostra

No período entre 2007 e 2013 foram selecionados 536 indivíduos com idade superior ou igual a 60 anos em controle ambulatorial no Centro de Referência em Atenção ao Idoso do Instituto Jenny de Andrade Faria de Atenção ao Idoso e à Mulher do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A seleção foi não probabilística, por conveniência. Os participantes são pacientes atendidos ambulatorialmente na instituição supracitada, que é considerada como referência no diagnóstico e tratamento de transtornos cognitivos em Belo Horizonte e utiliza protocolo padronizado para a avaliação dos pacientes. Realizamos um estudo genético de associação com corte transversal.

Todos os indivíduos foram submetidos à avaliação geriátrica completa com a aplicação do Protocolo de Avaliação Multidimensional do Idoso (disponível em: <http://www.hc.ufmg.br/geriatria/>). O Protocolo para diagnóstico da DA com as baterias de testes funcionais, cognitivos e de avaliação dos sintomas psiquiátricos e comportamentais encontra-se elencado na Tabela 1. O diagnóstico foi feito por geriatras capacitados. Os casos eram discutidos e revistos periodicamente entre as equipes de geriatria, de psicogeriatrics e de neuropsicologia do Centro de Referência. Os prontuários também foram revisados. Todos os portadores de CCLa foram submetidos à avaliação neuropsicológica para confirmação diagnóstica. O protocolo de avaliação neuropsicológica é constituído dos seguintes questionários:

- a. Instrumentos de caracterização clínica: anamnese e Mini-Plus (Sheehan e cols., 1998);
- b. Instrumentos de avaliação cognitiva global: Escala Mattis para Avaliação de Demência (Porto e cols., 2003), MEEM (Bertolluci e cols., 1994) e Teste das Matrizes Progressivas de Raven (Raven, 2000);
- c. Instrumentos de avaliação cognitiva de funções específicas: Teste de Aprendizagem Auditivo-verbal de Rey (Malloy-Diniz e cols., 2007), Teste da Figura Complexa de Rey (Strauss e cols., 2006), Testes de Fluência Verbal Fonológica e Semântica (Strauss e cols., 2006), Teste da Fluência de Desenhos (Strauss e cols., 2006), Teste da

Torre de Londres (Schlottfeldt e cols., 2010), Desenho do Relógio (Schulman e cols., 2000), Dígitos (Nascimento, 2004); Cubos de Corsi (Corsi, 1973), Token Test – Versão Resumida (Renzi & Faglioni, 1978) e BAPX (Bateria de avaliação das praxias, elaborado pela equipe de neuropsicologia do Núcleo de Geriatria e Gerontologia do Hospital das Clínicas - UFMG).

Tabela 1 - Bateria de testes cognitivos e funcionais utilizados para avaliação dos sujeitos

Testes	Referências
Mini Exame do Estado Mental (MEEM)	Folstein e cols., 1975; Brucki e cols., 2003
Fluência verbal	Brucki e cols., 1997
Lista de palavras CERAD	Morris e cols., 1989; Bertolucci e cols., 1998
Reconhecimento de figuras	Nitrini e cols., 1994
Teste do relógio	Nitrini e cols., 1994
Inventário neuropsiquiátrico (NPI)	Cummings e cols., 1994
Escala de demência clínica (CDR)	Morris e cols., 1993
Frontal and assessment battery (FAB)	Dubois e cols., 2000
Avaliação funcional Pfeffer	Pfeffer e cols., 1982
Avaliação funcional Lawton	Lawton & Brody, 1969
Avaliação funcional Katz	Katz e cols., 1963
Critérios diagnósticos para depressão	DSM IV (APA, 1994)
Escala de Depressão Geriátrica (GDS)	Almeida & Almeida, 1999
MINI PLUS	Amorim P, 2000
Escala de depressão de Hamilton	Hamilton M, 1960
Escala de Cornell	Alexopoulos GA, 1988; Carthery-Goular, 2007
Critérios diagnósticos provisórios de depressão na DA	Olin e cols., 2002

Após a aplicação dos testes de diagnóstico, os participantes foram divididos em três grupos distintos: portadores de CCLa (n = 80), portadores de DA início tardio (n = 307) e controles (n = 149). Os grupos foram comparados com relação aos dados sociodemográficos e clínicos, desempenho cognitivo na Escala de Avaliação de Demência Mattis e polimorfismos genéticos.

O diagnóstico de CCLa foi feito segundo recomendações do *The National Institute on Aging and the Alzheimer's Association* (Albert e cols., 2011). O diagnóstico de DA provável seguiu os critérios do *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) (Anexo 1).

Com o objetivo de excluir causas reversíveis de demência foram realizados os seguintes exames complementares: dosagem de TSH, ácido fólico, vitamina B12, uréia, creatinina, VDRL e anti-HIV e avaliação de funções hepática, conforme avaliação clínica. Também foram realizados exames de neuroimagem como tomografia computadorizada de crânio e/ou ressonância nuclear magnética de encéfalo. Os critérios a seguir foram considerados de exclusão para o grupo DA: DA de início precoce, outras causas de demência não DA, outras doenças neuropsiquiátricas associadas, como por exemplo, doença de Parkinson. Para o grupo CCL, os seguintes critérios foram considerados como excludentes: ausência de comprometimento de memória; portadores de comprometimento cognitivo secundários a doenças psiquiátricas; determinado por medicamentos; comorbidades clínicas, como por exemplo, hipotireoidismo, hipovitaminose B12, insuficiência cardíaca, renal e hepática.

O grupo controle foi composto por pacientes com cognição normal para idade e escolaridade que realizam controle clínico no mesmo serviço por diversas situações clínicas. O grupo também foi submetido ao mesmo protocolo de avaliação geriátrica. Como critério de exclusão estes indivíduos não possuíam história pessoal ou familiar (familiares de 1º grau) de doenças neuropsiquiátricas.

3.2 Variáveis analisadas

3.2.1 Dados sociodemográficos e clínicos

Os dados sociodemográficos (gênero, idade e escolaridade) e clínicos (idade de início da

doença, comorbidades e tabagismo) dos participantes, além de pontuação no MEEM e classificação no *Clinical Dementia Rating* (Escala de demência clínica) (CDR), foram utilizados para a caracterização dos grupos e para correlação com as outras variáveis do estudo.

A idade dos participantes do grupo de CCLa e DA baseou-se na data do diagnóstico enquanto para o grupo controle a idade baseou-se na data de avaliação e aplicação dos testes. A idade de início da doença foi considerada como aquela em que os participantes e/ou familiares do grupo de CCLa e DA relataram o início dos primeiros sintomas de declínio cognitivo e funcional. A escolaridade foi considerada como o número de anos de estudo de cada participante.

As seguintes comorbidades clínicas foram utilizadas no estudo: hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes *mellitus* tipo 2 (DM) e dislipidemia. O diagnóstico de HAS seguiu as recomendações da V Diretriz de Hipertensão Arterial da Sociedade Brasileira de Cardiologia. O diagnóstico também foi considerado quando o participante encontrava-se em tratamento anti-hipertensivo. O diagnóstico de DM seguiu as recomendações do *Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997)* e também foi considerado como portador de DM o participante que fazia uso de hipoglicemiantes. O diagnóstico de dislipidemia baseou-se nos critérios da IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemia e Prevenção da Aterosclerose (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007) e também foi considerado se o paciente estava em uso de hipolipemiantes. O tabagismo foi considerado quando o participante apresentava história de ter fumado 100 ou mais cigarros ao longo da vida, segundo critérios do *National Health Interview Survey – NHIS (CDC, 2009)*.

3.2.2 Escala para Avaliação de Demência Mattis

Em parte dos pacientes dos três grupos (24 Controles, 66 CCLa e 48 DA) foi aplicada a versão brasileira da escala para avaliação de demência de Mattis (MDRS – *Mattis Dementia Rating Scale*) (Porto e cols., 2003).

Esta escala é composta de 36 itens, distribuídos em cinco subescalas: Atenção (8 itens, total

de 37 pontos), Iniciação e Perseveração (I/P) (11 itens, total de 37 pontos), Construção (8 itens, total de 6 pontos), Conceituação (6 itens, total de 39 pontos) e Memória (5 itens, total de 25 pontos). A soma das cinco subescalas representa o grau de comprometimento cognitivo e/ou gravidade do quadro demencial (Porto e cols., 2003).

3.2.3 Variáveis Genéticas – Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs)

Foram genotipados e analisados os seguintes genes e seus SNPs potencialmente relacionados com o CCLa e a DA: *APOE* (*rs429358* e *rs7412*), *GAB2* (*rs2373115*), *DCHS2* (*rs1466662*) e *BDNF* (*rs6265*) (Tabela 2).

Tabela 2 - Resumo dos genes e polimorfismos estudados

Gene	SNP	Localização	Alelos	Alelo Ancestral	Troca de aminoácido
<i>APOE</i>	<i>rs429358</i>	Éxon	T/C	C	Cistina → Arginina
	<i>rs7412</i>	Éxon	T/C	C	Arginina → Cistina
<i>BDNF</i>	<i>rs6265</i>	Éxon	G/A	G	Valina → Metionina
<i>DCHS2</i>	<i>rs1466662</i>	Íntron	T/A	T	-
<i>GAB2</i>	<i>rs2373115</i>	Íntron	G/T	T	-

SNP: Single nucleotide Polymorphism

3.3 Genotipagem

3.3.1 Extração do DNA da amostra

O sangue venoso periférico dos participantes foi coletado em tubos com EDTA segundo os critérios de biossegurança e com material adequado. A extração do DNA genômico foi feita através do método de solução salina concentrada (Lahiri & Nurberger, 1991 – modificado por Cavalli, 1996 e Salazar, 1997). O DNA extraído foi armazenado a 4°C em solução tampão, quantificado e diluído para 30 ng/μL para análises posteriores.

3.3.2 Genotipagem por PCR em Tempo Real (Ensaio *Taqman*®)

O método de PCR em tempo real (*Real Time PCR*) no modo de discriminação alélica foi utilizado para o estudo dos polimorfismos propostos. Foram utilizadas sondas *Taqman*®

específicas (fragmento de DNA marcado usado para hibridizar outra molecular de DNA) para cada polimorfismo estudado e o *TaqMan*[®] *Genotyping Master Mix* (mistura que contém os reagentes necessários para a PCR), ambos fornecidos pela Life Technologies[®]. A PCR em tempo real é uma metodologia rápida, relativamente simples e padronizada com alta sensibilidade e especificidade.

Cada sonda adquirida contém dois *primers* (oligonucleotídeos de iniciação) para amplificação da sequência de interesse e duas sondas *Taqman*[®] específicas (marcadas com os fluoróforos FAM[®] *dye* e VIC[®] *dye*) para a detecção dos dois alelos variantes de um *SNP*. A fluorescência só é emitida após a clivagem exonucleásica da enzima *Taq* DNA polimerase que acontece durante a amplificação (sendo chamado de ensaio 5' nuclease). Com base na fluorescência emitida pelos marcadores associados com as sondas determina-se qual o genótipo do paciente com relação àquele polimorfismo.

A reação de PCR foi preparada com 2 µL do DNA (30 ng/µL), 5 µL do *Master Mix*, 3,9 µL de água purificada e 0,1 µL da sonda. As condições de ciclagem foram 10 minutos iniciais de desnaturação a 95°C seguido de 50 ciclos de anelagem e extensão de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60°C. A placa de reação utilizada contém 96 *wells* (poços de reação). Utilizamos pelo menos três controles negativos (reagentes da PCR sem o DNA) em cada placa. Para controle de qualidade dos resultados, o procedimento de genotipagem foi repetido para 10% das amostras selecionadas aleatoriamente para cada uma das sondas. A amplificação e leitura das placas de reação foram feitas no aparelho *7500 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA).

3.4 Análises Estatísticas

A normalidade das variáveis quantitativas foi verificada com o teste de Shapiro-Wilk. Os testes t, *one-way* Anova (para distribuições normais), Mann-Whitney, Kruskal-Wallis (para distribuições não paramétricas) e qui-quadrado (para variáveis categóricas) foram utilizados para comparar os dados sociodemográficos, clínicos e o desempenho no teste neuropsicológico entre os grupos de pacientes *versus* o grupo controle. As variáveis com o valor $p < 0,20$ nas análises univariadas foram selecionadas para uma análise de regressão logística multivariada com seleção *backward* dos melhores preditores para o CCLa e a DA. O

teste Hosmer-Lemeshow foi utilizado para verificar a adequação do modelo multivariado final.

Todas as análises foram feitas para a amostra total e depois em subgrupos de acordo com a presença do alelo $\epsilon 4$ e de acordo com o sexo dos sujeitos. As análises estatísticas descritas acima foram realizadas com o programa R (R *core team*, 2013). A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$.

O programa *Unphased* versão 3.1.4 (Dudbridge F., 2008) foi utilizado para avaliar as diferenças nas distribuições genótípicas e alélicas entre os grupos através do teste do qui-quadrado (χ^2). Para garantir a veracidade dos resultados, foi aplicada a análise de 1000 permutações.

3.5 Considerações Éticas

Todos os participantes e seus acompanhantes foram previamente orientados quanto ao protocolo de pesquisa e aos seus potenciais riscos e benefícios. A coleta de sangue dos participantes para as análises foi realizada no próprio Instituto Jenny de Andrade Faria de Atenção ao Idoso e à mulher, mencionado acima, no mesmo dia da consulta médica. O procedimento foi realizado em local de coleta apropriado e com material adequado. As amostras de sangue receberam um código numérico e as informações dos pacientes foram mantidas em sigilo durante todo o estudo.

Todos os participantes e/ou seus familiares/acompanhantes concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), de acordo com as normas éticas da resolução 196/96 (Anexos 2 e 3). Os participantes foram provenientes de dois projetos de pesquisa distintos nos quais não houve conflito de interesse entre as pesquisas e os pesquisadores. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais - ETIC 334/06 (Anexo 4).

4. RESULTADOS

4.1 Descrição da Amostra

A amostra foi constituída de 536 sujeitos divididos em três grupos: controles (149 sujeitos), CCLa (80 pacientes) e DA (307 pacientes). Estudamos as seguintes variáveis sociodemográficas e clínicas: idade, sexo, escolaridade, HAS, DM, dislipidemia e tabagismo. A pontuação no MEEM e gravidade estabelecida por meio do CDR também foram utilizadas para caracterizar a amostra (Tabela 3).

Tabela 3 - Descrição da amostra

	Controles	CCL Amnésico	DA
Total	149	80	307
Idade	76,5 ± 7,7	76,1 ± 7,5	78,4 ± 6,8*
Sexo (%Mulheres)	67,8%	57,5%	67,4%
MEEM	25,4 ± 3,3	23,0 ± 3,4**	14,4 ± 5,2**
CDR	0	0,5 (0,5 – 0,5)**	1 (1 - 2)**
Escolaridade (em anos)	4 (2 – 6)	4 (1 - 5)	3 (0 - 4)**
Hipertensão Arterial Sistêmica	73,2%	74,3%	76,5%
Diabetes Mellitus tipo 2	16,4%	34,7%*	19,0%
Dislipidemia	30,1%	39,7%	34,7%
Tabagismo	27,3%	23,6%	27,4%

Idade e MEEM apresentadas como média ± desvio padrão; CDR e escolaridade apresentadas como mediana (intervalo interquartil). * p < 0,05; ** p < 0,001 (comparado com o grupo controle). CCL: Comprometimento Cognitivo Leve; MEEM: Mini exame do estado mental; CDR: *Clinical Dementia Rating*; DA: Doença de Alzheimer.

O grupo controle foi significativamente mais novo que os pacientes com DA (p = 0,006) mas não em relação ao grupo CCLa (p = 0,759). Observamos uma grande porcentagem de mulheres e baixa escolaridade (p < 0,001) na amostra selecionada. Os pacientes com DA apresentaram menor nível educacional comparado aos controles (p < 0,001). A frequência de DM foi maior entre os pacientes com CCLa quando comparado aos controles (p = 0,003).

Posteriormente, a amostra foi segregada de acordo com a presença do alelo ε4 da *APOE*: carreadores deste alelo (ε4 positivo) e não carreadores (ε4 negativo) (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 - Descrição do subgrupo *APOE* ε4 positivo

	Controles	CCL Amnésico	DA
Total	39 (26,2%)	29 (36,3%)	157 (51,1%)
Idade	76,0 ± 8,3	74,9 ± 7,7	77,6 ± 6,5
Sexo (%Mulheres)	56,4%	51,7%	68,2%
MEEM	25,2 ± 3,6	23,4 ± 3,4	14,2 ± 5,1**
CDR	0	0,5 ± 0,3**	1,6 ± 0,7**
Escolaridade (em anos)	4 (1 - 7)	4 (2 - 5)	3 (0 - 4)
Hipertensão Arterial Sistêmica	85,7%	80,8%	72,1%
Diabetes Mellitus tipo 2	18,2%	36,0%	18,4%
Dislipidemia	43,8%	53,8%	36,3%
Tabagismo	32,4%	36,0%	29,8%

Total apresentado como número absoluto de sujeitos (% em relação à amostra total); Idade, MEEM e CDR apresentadas como média ± desvio padrão; escolaridade apresentada como mediana (intervalo interquartil). * p <0,05; ** p < 0,001 (comparado com o grupo controle). CCL: Comprometimento Cognitivo Leve; MEEM: Mini exame do estado mental; CDR: *Clinical Dementia Rating*; DA: Doença de Alzheimer.

No subgrupo carreador de ε4, as variáveis correlacionadas com o CCLa ou a DA foram apenas a pontuação no MEEM e na escala CDR – instrumentos utilizados como ferramenta diagnóstico e portanto auxiliar na alocação nos grupos. Por outro lado, no subgrupo ε4 negativo as associações observadas na amostra total permaneceram. O diagnóstico de DM foi mais frequente no grupo CCLa em relação aos controles (p = 0,015). Os pacientes com DA são mais velhos (p = 0,008) e apresentaram menor escolaridade (p = 0,001) do que os controles. Além disso, o diagnóstico de HAS foi mais frequente nos portadores de DA (p = 0,014). Dados complementares dos três subgrupos (valor de p e testes estatísticos utilizados) encontram-se nas tabelas suplementares 1, 2 e 3.

A amostra também foi segregada entre homens e mulheres e realizamos análises separadas destes subgrupos. As associações observadas na amostra total permaneceram iguais nos dois subgrupos. Todavia, não observamos diferença significativa entre os grupos controle e DA com relação à idade no subgrupo de homens (p = 0,147) (dados não mostrados).

Tabela 5 - Descrição do subgrupo *APOE* ϵ 4 negativo

	Controles	CCL Amnésico	DA
Total	107 (71,8%)	51 (63,8%)	147 (47,9%)
Idade	76,9 \pm 7,5	76,8 \pm 7,4	79,3 \pm 7,1*
Sexo (%Mulheres)	72,9%	60,8%	66,0%
MEEM	25,4 \pm 3,3	22,8 \pm 3,4**	14,5 \pm 5,1**
CDR	0	0,5 \pm 0,2**	1,6 \pm 0,7**
Escolaridade (em anos)	4 (2 – 5,5)	3,5 (1 - 4)	3 (0 – 4)**
Hipertensão Arterial Sistêmica	68,3%	70,8%	82,0%*
Diabetes Mellitus tipo 2	16,2%	34,0%*	20,1%
Dislipidemia	24,2%	31,9%	32,4%
Tabagismo	25,8%	17,0%	25,6%

Total apresentado como número absoluto de sujeitos (% em relação à amostra total); Idade, MEEM e CDR apresentadas como média \pm desvio padrão; Escolaridade apresentada como mediana (intervalo interquartil). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ (comparado com o grupo controle). CCL: Comprometimento Cognitivo Leve; MEEM: Mini exame do estado mental; CDR: *Clinical Dementia Rating*; DA: Doença de Alzheimer.

4.2 Genotipagem

As frequências dos polimorfismos dos genes selecionados (*APOE*, *BDNF*, *DCHS2* e *GAB2*) foram comparadas entre pacientes e controles através do programa *Unphased*. Os cinco polimorfismos estudados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$ - teste de qui-quadrado).

As frequências haplotípicas da *APOE* foram significativamente diferentes nos pacientes com CCLa e DA comparadas com os controles ($p = 0,035$ e $p < 0,001$, respectivamente) (Tabela 6). Após a segregação em homens e mulheres, a significância estatística apenas foi observada com relação ao grupo DA (Tabela suplementar 4). Dentre os haplótipos, o alelo ϵ 3 foi o mais frequente nos três grupos, chegando a proporção de 80% no grupo controle. A proporção do alelo ϵ 4 foi de 32% nos pacientes com DA e 21% nos pacientes com CCLa, contrastando com apenas 14% nos controles. O alelo ϵ 2 foi mais frequente nos controles (6%) que no grupo DA (2%) mas foi semelhante no grupo CCLa (11%). Através do teste z de comparação de proporções, foi observado que apenas a frequência do alelo ϵ 3 diferiu entre CCLa (69%) e

controles (80%) ($p = 0,009$). Para a DA, a proporção de todos os alelos diferiam significativamente dos controles (dados não mostrados).

Na tabela 7 encontram-se as proporções dos genótipos da *APOE* para cada grupo. Homozigotos $\epsilon 3$ constituem 61% do grupo controle, 50% do grupo CCLa e 45% do grupo DA. Homozigotos $\epsilon 4$ constituem 2% do grupo controle, 5% do grupo CCLa e 12% do grupo DA.

Tabela 6 - Distribuição alélica da *APOE* nos três grupos

	n	$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$	p
Controles	146	18 (6%)	237 (80%)	42 (14%)	
CCLa	80	17 (11%)	110 (69%)	33 (21%)	0,035
DA	304	14 (2%)	404 (66%)	192 (32%)	< 0,001

Número absoluto (%). Valor de p refere-se à comparação com o grupo controle com análise de 1000 permutações (teste qui-quadrado). CCLa: Comprometimento Cognitivo Leve Amnésico; DA: Doença de Alzheimer.

Tabela 7 - Distribuição genotípica da *APOE* nos três grupos

	$\epsilon 2/\epsilon 1$	$\epsilon 2/\epsilon 2$	$\epsilon 2/\epsilon 3$	$\epsilon 2/\epsilon 4$	$\epsilon 3/\epsilon 3$	$\epsilon 3/\epsilon 4$	$\epsilon 4/\epsilon 4$
Controles	0 (0%)	0 (0%)	16 (11%)	2 (1%)	91 (61%)	34 (23%)	3 (2%)
CCLa	0 (0%)	2 (3%)	9 (11%)	4 (5%)	40 (50%)	21 (26%)	4 (5%)
DA	1 (0,3%)	0 (0%)	9 (3%)	6 (2%)	137 (45%)	115 (37%)	36 (12%)

Número absoluto (%). A genotipagem não estava disponível para três pacientes controles (2%) e três DA (0,7%). CCLa: Comprometimento Cognitivo Leve Amnésico; DA: Doença de Alzheimer. $\epsilon 1$: haplótipo raro formado pela combinação dos nucleotídeos C (rs4239358) e T (rs7412).

As frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo *rs6265* (val66met) do gene *BDNF* para encontram-se na tabela 8. Nenhuma diferença estatística foi encontrada nas frequências em relação ao grupo controle na amostra global e nos grupos $\epsilon 4$. Entretanto, apenas entre os homens, foi observada uma significância estatística na frequência alélica no grupo CCLa ($p = 0,042$) e DA ($p = 0,046$) comparado ao grupo controle. O alelo G (que corresponde ao alelo Val) foi mais frequente nos grupos CCLa e DA. No subgrupo das mulheres não foram observadas diferenças significativas (Tabela suplementar 5).

Tabela 8 - Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo *rs6265* do gene *BDNF*

	n	Frequência Genotípica			p	Frequência Alélica		p
Amostra total		AA	AG	GG		A	G	
Controles	144	6 (4%)	31 (22%)	107 (74%)		43 (15%)	245 (85%)	
CCLa	77	2 (3%)	12 (15%)	63 (82%)	0,434	16 (10%)	138 (90%)	0,174
DA	284	6 (2%)	63 (22%)	215 (76%)	0,496	75 (13%)	493 (87%)	0,491
Homens								
Controles	46	3 (7%)	11 (23%)	33 (70%)		17 (18%)	77 (82%)	
CCLa	37	1 (3%)	3 (9%)	33 (88%)	0,139	5 (7%)	63 (93%)	0,042
DA	94	1 (1%)	16 (17%)	77 (82%)	0,128	18 (10%)	170 (90%)	0,046
Mulheres								
Controles	97	3 (3%)	20 (21%)	74 (76%)		26 (13%)	168 (87%)	
CCLa	43	1 (2%)	9 (21%)	33 (77%)	0,968	11 (13%)	75 (87%)	0,889
DA	190	5 (2%)	47 (25%)	138 (73%)	0,726	57 (15%)	323 (85%)	0,605

Número absoluto (%). Valor de p refere-se a comparação com o grupo controle com análise de 1000 permutações (teste qui-quadrado). CCLa: Comprometimento Cognitivo Leve Amnésico; DA: Doença de Alzheimer.

Com relação ao gene *DCHS2*, as frequências do polimorfismo estão apresentadas na tabela 9 para a amostra total e segregada pela presença do alelo $\epsilon 4$. Houve diferença significativa nas frequências genotípicas e alélicas dos pacientes com CCLa ($p = 0,006$ e $0,021$ respectivamente), sendo o alelo A mais frequente nesses pacientes. Após a divisão da amostra, apenas o subgrupo $\epsilon 4$ negativo manteve a diferença observada. Para os pacientes com DA, observamos diferença nas frequências alélicas no subgrupo $\epsilon 4$ negativo ($p = 0,046$). No subgrupo positivo nenhuma diferença estatística foi encontrada. Após a segregação em

homens e mulheres, o resultado se manteve semelhante ao encontrado na amostra total apenas entre as mulheres do grupo CCLa (Tabela suplementar 6).

Por último, analisamos as frequências do polimorfismo *rs2373115* do gene *GAB2* (tabela 10 e tabela suplementar 7). Não foram encontradas diferenças significativas com relação ao grupo controle na amostra total, nos subgrupos $\epsilon 4$ e nos subgrupos por sexo.

Tabela 9 - Distribuição alélica e genotípica do gene *DCHS2* (*rs1466662*) na amostra total e estratificada pela presença do alelo $\epsilon 4$

	n	Frequência Genotípica			p	Frequência Alélica		p
		TT	TA	AA		T	A	
Amostra total								
Controles	143	10 (7%)	54 (38%)	79 (55%)		74 (26%)	212 (74%)	
CCLa	79	0 (0%)	26 (33%)	53 (67%)	0,006	26 (17%)	132 (83%)	0,021
DA	299	14 (5%)	100 (33%)	185 (62%)	0,342	128 (21%)	470 (79%)	0,142
<i>APOE</i> $\epsilon 4$ +								
Controles	37	2 (6%)	9 (24%)	26 (70%)		13 (18%)	61 (82%)	
CCLa	29	0 (0%)	12 (41%)	17 (59%)	0,127	12 (21%)	46 (79%)	0,652
DA	153	8 (5%)	52 (34%)	93 (61%)	0,510	68 (22%)	238 (78%)	0,372
<i>APOE</i> $\epsilon 4$ -								
Controles	103	8 (8%)	43 (42%)	52 (50%)		59 (29%)	147 (71%)	
CCLa	50	0 (0%)	14 (28%)	36 (72%)	0,005	59 (14%)	147 (86%)	0,003
DA	144	6 (4%)	48 (33%)	90 (63%)	0,134	60 (21%)	228 (79%)	0,046

Número absoluto (%). Valor de p refere-se a comparação com o grupo controle com análise de 1000 permutações (teste qui-quadrado). CCLa: Comprometimento Cognitivo Leve Amnésico; DA: Doença de Alzheimer.

Tabela 10 - Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo *rs2373115* na amostra total

	n	Frequência Genotípica			p	Frequência Alélica		p
		GG	GT	TT		G	T	
Controles	114	64 (56%)	45 (40%)	5 (4%)		173 (76%)	55 (24%)	
CCLa	55	35 (64%)	16 (29%)	4 (7%)	0,358	86 (78%)	24 (22%)	0,638
DA	275	163(59%)	93 (34%)	19 (7%)	0,419	419 (76%)	131 (24%)	0,928

Número absoluto (%). Valor de p refere-se à comparação com o grupo controle com análise de 1000 permutações (teste qui-quadrado). CCLa: Comprometimento Cognitivo Leve Amnésico; DA: Doença de Alzheimer.

4.3 Análise Multivariada

Posteriormente, realizamos uma análise de regressão logística binária a fim de determinar os fatores independentes associados com a ocorrência de CCLa e DA.

A tabela 11 apresenta os melhores preditores do nosso estudo para a ocorrência de CCLa na amostra total e nos quatro subgrupos analisados. Na amostra total, a única variável associada com o CCLa foi o DM tipo 2 (OR = 2,71). No subgrupo $\epsilon 4$ positivo nenhuma das variáveis estudadas foi correlacionada, enquanto que no subgrupo $\epsilon 4$ negativo o genótipo AA do gene *DCHS2* foi um preditor independente (OR = 2,52). Para as mulheres o genótipo AA do gene *DCHS2* (OR = 3,06) e a presença de dislipidemia (OR = 2,36) foram os fatores correlacionados. No grupo dos homens, semelhante ao encontrado na amostra total, apenas o DM foi correlacionado, apresentando um risco quase duas vezes maior (OR = 4,19).

Para a ocorrência de DA, os preditores correlacionados estão apresentados na tabela 12. Como era esperado, a presença do alelo $\epsilon 4$ foi responsável por um aumento de 3,65 vezes no risco em desenvolver a doença. Outros fatores preditores incluem a idade avançada (cada ano aumenta o risco em 1,04 vezes) e a escolaridade (cada ano de estudo foi considerado protetor, OR = 0,90). Semelhante ao observado para o grupo CCLa, nenhuma variável foi correlacionada no subgrupo $\epsilon 4$ positivo. No subgrupo $\epsilon 4$ negativo as variáveis predictoras independentes foram escolaridade (OR = 0,84) e o diagnóstico de HAS (OR = 2,02). Os preditores observados entre as mulheres foram semelhantes à amostra total. Entretanto, nos

homens, a idade não se associou com a doença. Além disso, a presença de $\epsilon 4$ nas mulheres é responsável por um risco cerca de duas vezes maior do que nos homens (4,06 vs. 2,24).

Tabela 11 - Modelo final para os fatores associados ao CCL amnésico

	Variáveis	Odds Ratio (IC 95%)	p
Amostra Total	DM	2,71 (1,39 – 5,28)	0,034
APOE $\epsilon 4$ -	<i>DCSH2</i> AA x TT/TA	2,52 (1,22 – 5,22)	0,013
Mulheres	<i>DCSH2</i> AA x TT/TA	3,06 (1,32 – 7,09)	0,009
	Dislipidemia	2,36 (1,04 – 5,35)	0,004
Homens	DM	4,19 (1,16 – 15,18)	0,029

Odds Ratio e IC obtidos por regressão logística multivariada com seleção *backward* dos preditores. Teste Hosmer-Lemeshow *goodness of fit* (GOF): $p > 0,05$ para todos os subgrupos. IC 95%: Intervalo de Confiança de 95%; DM: Diabetes *Mellitus* tipo 2.

Tabela 12 - Modelo final para os fatores associados a doença de Alzheimer

	Variáveis	Odds Ratio (IC 95%)	p
Amostra Total	Alelo $\epsilon 4$	3,65 (2,28 – 5,83)	< 0,001
	Idade	1,04 (1,01 – 1,07)	0,026
	Escolaridade	0,90 (0,85 – 0,96)	0,001
APOE $\epsilon 4$ -	Escolaridade	0,84 (0,77 – 0,93)	< 0,001
	HAS	2,02 (1,08 – 3,79)	0,029
Mulheres	Alelo $\epsilon 4$	4,66 (2,57 – 8,44)	< 0,001
	Idade	1,05 (1,01 – 1,09)	0,021
	Escolaridade	0,91 (0,83 – 0,99)	0,033
Homens	Alelo $\epsilon 4$	2,24 (1,03 – 4,89)	0,042
	Escolaridade	0,88 (0,81 – 0,97)	0,007

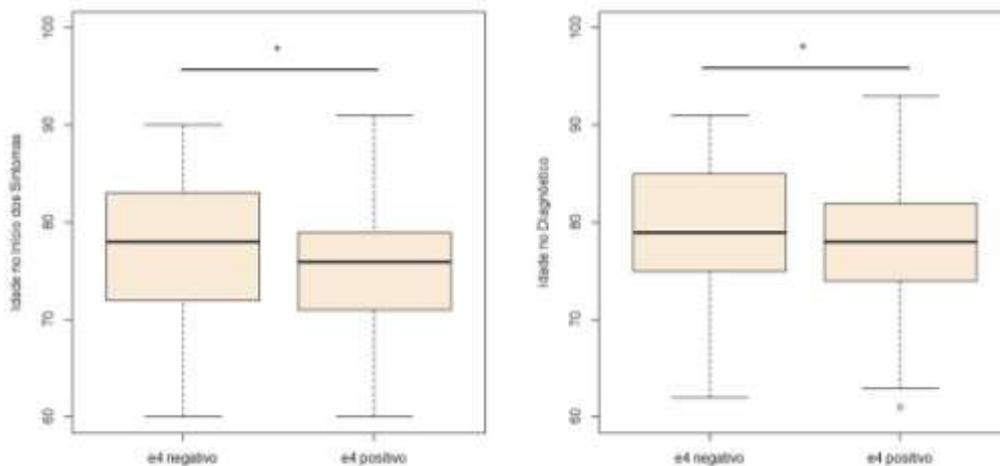
Odds Ratio e IC obtidos por regressão logística multivariada com seleção *backward* dos preditores. Teste Hosmer-Lemeshow *goodness of fit* (GOF): $p > 0,05$ para todos os subgrupos. IC 95%: Intervalo de Confiança de 95%. HAS: Hipertensão arterial sistêmica.

4.4 Idade de início da doença

Um dos endofenótipos estudados foi a idade de início da doença. Estava disponível a idade do paciente no início dos primeiros sintomas cognitivos (relatada pelo paciente e/ou familiares e cuidadores) e a idade no diagnóstico de CCL ou DA pelo geriatra. A média de idade de início dos sintomas de CCL foi 74 anos e a média no diagnóstico foi 76 anos. A média de idade de início dos sintomas de DA foi 76 anos e ao diagnóstico foi 78 anos. Em média houve uma lacuna de dois anos entre o início dos primeiros sintomas da doença e o diagnóstico para as duas condições.

Comparamos a média de idades dos pacientes entre os genótipos dos genes estudados e entre portadores e não portadores do alelo $\epsilon 4$. Indivíduos portadores de DA $\epsilon 4$ positivo tiveram início da doença cerca de 2 anos antes (75 vs. 77,1 anos para início dos sintomas, $p = 0,007$; 77,6 vs. 79,3 anos para diagnóstico, $p = 0,019$) em relação aos $\epsilon 4$ negativo (Figura 3). Não observamos diferença com relação aos outros genes.

Figura 2– Idade de início da DA de acordo com a presença do alelo $\epsilon 4$



* $p < 0,05$

4.5 Testes Cognitivos

Outro endofenótipo analisado foi o desempenho em testes cognitivos. Os testes disponíveis incluem o MEEM e a pontuação total e nos subdomínios da Escala Mattis. As análises foram feitas separadamente para controles, CCLa e DA.

A média das pontuações no MEEM foi comparada entre os genótipos dos genes selecionados para cada um dos três grupos de sujeitos. Os resultados dos testes estatísticos estão demonstrados na tabela 13. Observamos que o gene *BDNF* influenciou o desempenho do grupo controle no teste. A presença do genótipo GG (alelos Val/Val) do polimorfismo *rs6265* associou-se a uma pior pontuação ($25,0 \pm 3,5$ vs. $26,6 \pm 2,4$; $p = 0,033$). Como a escolaridade dos pacientes pode influenciar no resultado do teste, a escolaridade entre os dois grupos genéticos (GG vs. GA/AA) foi comparada. Entretanto não observamos diferença estatística na escolaridade entre os grupos ($p = 0,075$). Para os outros genes e grupos de estudo não foram observadas diferenças significativas.

Tabela 13 - Resultados (valor de “p”) das análises univariadas comparando a pontuação do MEEM entre os genótipos

	Controles	CCLa	DA
Alelo $\epsilon 4$	0,835	0,498	0,697
<i>GAB2</i> GG x GT/TT	0,963	0,358	0,592
<i>DCSH2</i> AA x AT/TT	0,998	0,176	0,082
<i>BDNF</i> GG x GA/AA	0,033	0,624	0,855

CCLa: Comprometimento Cognitivo Leve Amnésico; DA: Doença de Alzheimer.

Estudamos a relação entre os polimorfismos genéticos e a pontuação por categoria e total da escala de avaliação de demência Mattis. Os resultados dos testes para cada subdomínio e a pontuação total estavam disponíveis para 24 controles, 66 CCL A e 48 DA (Tabela 14).

Tabela 14 - Pontuação da escala Mattis nas subescalas e valor total

	Atenção	I/P	Construção	Conceituação	Memória	Total
Controles (n = 24)	35 (32–37)	35 (25–37)	6 (2 – 6)	33 (13 – 38)	23 (18 – 25)	130 (108 – 142)
CCLa (n = 66)	35 (21 – 37)	28,5 (21–37)	6 (1 - 6)	30 (12 – 39)	18 (12 – 25)	114,5 (91 – 140)
DA (n = 48)	34 (20 – 37)	21 (10 – 31)	3 (0 – 6)	23 (14 – 35)	12 (2 – 23)	98 (56 – 123)

Resultados apresentados como mediana (mínimo – máximo). I/P: Iniciativa e Perserveração; CCLa: Comprometimento Cognitivo Leve Amnésico; DA: Doença de Alzheimer.

Foi comparado o desempenho em cada subdomínio e no total entre os genótipos e haplótipos dos genes selecionados. Os resultados dos testes estatísticos realizados estão demonstrados na tabela 15. No grupo controle e no grupo DA não foram observadas diferenças significativas no desempenho do teste nos genes estudados. No grupo CCLa, observamos que carreadores do alelo $\epsilon 4$ tiveram um desempenho melhor na subescala Construção (média \pm dp: $5,9 \pm 0,5$ vs. $4,6 \pm 1,8$; $p = 0,003$) comparado aos não carreadores. A escolaridade entre os grupos foi comparada já que é um fator que influencia no desempenho da escala. Não houve diferença significativa na escolaridade entre carreadores e não carreadores do alelo ($p = 0,159$). O genótipo GG do gene *BDNF* também se correlacionou a um pior desempenho nos subdomínios Iniciativa e Perserveração (média \pm dp: $28,1 \pm 4,3$ vs. $31,1 \pm 5,0$; $p = 0,039$) e Conceituação (média \pm dp: $28,0 \pm 5,5$ vs. $32,3 \pm 6,3$; $p = 0,024$). A escolaridade dos grupos também foi comparada e não houve diferença estatística ($p = 0,658$). Para os outros grupos e genes não foram observadas diferenças no desempenho.

Tabela 15 - Valor de “p” das análises univariadas comparando a pontuação na escala Mattis entre os genótipos

		Atenção	I/P	Const.	Conceit.	Memória	Total
Controles	Alelo $\epsilon 4$	0,350	0,86	0,945	0,352	0,457	0,212
	<i>GAB2</i>	0,542	0,244	0,492	0,2	0,607	0,605
	<i>DCSH2</i>	0,098	0,328	0,389	0,157	0,562	0,246
	<i>BDNF</i>	0,584	0,519	0,850	0,894	0,745	0,866
CCLa	Alelo $\epsilon 4$	0,376	0,682	0,003	0,429	0,124	0,396
	<i>GAB2</i>	0,234	0,481	0,69	0,146	0,842	0,331
	<i>DCSH2</i>	0,924	0,302	0,547	0,934	0,473	0,641
	<i>BDNF</i>	1	0,039	0,13	0,024	0,360	0,071
DA	Alelo $\epsilon 4$	0,957	0,877	0,482	0,397	0,483	0,717
	<i>GAB2</i>	0,703	0,241	0,402	0,701	0,591	0,374
	<i>DCSH2</i>	0,380	0,434	0,580	0,932	0,945	0,695
	<i>BDNF</i>	0,296	0,070	0,380	0,131	0,150	0,123

Para o alelo $\epsilon 4$ foi feita a comparação $\epsilon 4$ positivo x negativo; para o gene *BDNF* foi feita a comparação GG x GT/AA; para os outros genes foram comparados os 3 genótipos de cada polimorfismo. I/P: Iniciativa e Perserveração; Const.: Construção; Conceit: Conceituação; CCLa: Comprometimento Cognitivo Leve Amnésico; DA: Doença de Alzheimer.

5. DISCUSSÃO

Os fatores de risco bem estabelecidos para a DA são a idade avançada e o histórico familiar de doença. Sem avanços no tratamento e com o envelhecimento da população, estima-se que ocorra aumento do número de casos de DA, determinando elevação dos custos para manter o cuidado e gerando incapacidade irreversível para os pacientes (Thies & Bleiler, 2013). Sendo assim, se faz necessário entender melhor sua etiopatogenia e compreender os mecanismos biológicos envolvidos, com o objetivo de desenvolver tratamentos farmacológicos e estratégias de prevenção da doença. Sabe-se que a DA apresenta um longo período de evolução que antecede anos ou até décadas o aparecimento dos primeiros sintomas cognitivos (Sperling e cols., 2011). Nesse contexto surge a importância do estudo do CCLa, já que é uma condição considerada por muitos autores como uma fase prodrômica da DA e alvo de possíveis intervenções terapêuticas (Petersen e cols., 2001).

O presente estudo avaliou polimorfismos genéticos potencialmente relacionados com o CCLa e a DA, seja influenciando o risco para o seu desenvolvimento ou influenciando os seus fenótipos intermediários. Também, avaliamos a relação entre estes polimorfismos com o desempenho cognitivo de idosos considerados como portadores de cognição normal para a idade e escolaridade.

Nossa amostra é formada por 536 sujeitos, divididos em 149 controles, 80 pacientes com CCLa e 307 com DA. Os polimorfismos foram comparados entre pacientes e controles em uma análise transversal caso-controle. Além disso, os dados genéticos foram cruzados com a idade de início da doença e com testes cognitivos – considerados endofenótipos associados à doença. Para caracterizar a amostra e controlar os fatores confundidores, utilizamos também dados sociodemográficos e clínicos.

A amostra caracterizou-se por apresentar uma elevada porcentagem de mulheres nos três grupos. Na população idosa brasileira nota-se predomínio das mulheres – fenômeno mundial conhecido como “feminização da velhice” (Caramano, 2002). Há também uma maior prevalência de DA nas mulheres comparada aos homens. Estimativas recentes apontam que quase 2/3 dos pacientes diagnosticados com DA são mulheres – porcentagem semelhante a nossa (67%). Todavia, a razão dessa alta prevalência pode ser explicada pela maior sobrevida

das mulheres em relação aos homens e não algum fator de risco específico ligado ao sexo (Mielke e cols., 2014; Lopes & Bottino, 2002).

Observamos que o grupo CCLa apresentou pontuações intermediárias no teste MEEM e escala CDR (Tabela 3) entre os controles e DA, dados consistentes com a posição de condição intermediária do CCL entre a cognição normal e a demência.

Como em outras doenças neurodegenerativas a idade é o maior fator de risco na etiologia da DA. Observamos que o grupo DA é mais velho que o grupo controle e que a idade foi um preditor independente na análise multivariada (OR = 1,04) (Tabelas 3 e 12). Estudos de prevalência indicam um aumento exponencial de DA com a idade a partir dos 65 anos ocorrendo uma estabilização acima dos 90 anos (Lopes & Bottino, 2002; Castellani e cols., 2010).

Outro fator associado com a DA que podemos confirmar foi o nível educacional (Tabelas 3 e 12). A escolaridade foi um fator protetor independente na nossa amostra (OR = 0,90). A hipótese da reserva cognitiva (RC) sugere que um alto nível educacional é um fator que contribui para atrasar as manifestações da demência por permitir que os indivíduos com a neuropatologia da DA utilizem abordagens compensatórias para lidar com o dano cerebral. RC é um construto que postula que certas experiências de vida como educação e ocupação aumentam a eficiência, capacidade e flexibilidade das redes neuronais resultando em uma maior habilidade para lidar com os danos cerebrais sem algum déficit notável na cognição. Indivíduos com alta reserva cognitiva podem sustentar altos níveis de patologia antes de apresentarem sintomas clinicamente significantes (Roe e cols., 2007; Soldan e cols., 2013).

Constatamos uma porcentagem significativamente elevada de DM tipo 2 no grupo CCLa comparados com o grupo controle - tanto em homens quanto mulheres. A associação se confirmou na análise multivariada, através da qual o DM foi o único preditor independente para o CCLa, responsável por um OR de 2,71 (Tabelas 3 e 11). Entretanto, na análise multivariada separada para homens e mulheres, o DM foi um preditor apenas para os homens, com um OR ainda maior (OR = 4,19). No subgrupo das mulheres a dislipidemia foi o fator clínico correlacionado com o CCLa (Tabela 11).

Diferentes fatores de risco para homens e mulheres já foram investigados em outros estudos sobre CCL e a DA. Nossos resultados demonstram uma discrepância dos fatores associados com o CCLa em homens e mulheres. As diferenças observadas podem ser explicadas em parte por fatores biológicos (genética e hormônios, por exemplo), por diferenças na exposição a riscos ambientais como dieta e injúrias e outros fatores como educação e ocupação (Artero e cols., 2008; Mielke e cols., 2014). A significância clínica desses preditores na população brasileira necessita futuros estudos que devem levar em consideração o gênero dos participantes.

Apesar de alguns estudos apresentarem resultados negativos, fatores de risco vasculares como o DM estão associados com declínio cognitivo e com um risco aumentado para a ocorrência de DA e demência (Duron & Hanon, 2008). A variação entre os resultados pode ser devido às diferenças de idade, etnias e sexo dos sujeitos, do perfil de risco entre as diferentes populações, além do delineamento do estudo e o período de seguimento (Akomolafe e cols., 2006). Evidências da associação do DM com o CCL também foram encontradas em alguns estudos transversais e longitudinais (Luchsinger e cols., 2007; Roberts e cols., 2014; Sachdev e cols., 2012; Artero e cols., 2008). Semelhante ao nosso resultado, Roberts e cols. (2014) em um estudo longitudinal observaram que o DM estava correlacionado com um risco aumentado de CCL amnésico e que essa associação era mais forte em homens. Essa associação mais forte em homens pode ser devido ao diagnóstico de DM mais precoce, maior duração e maior frequência de DM nos homens (Roberts e cols., 2014).

Os mecanismos patológicos da associação do DM com a demência ainda não estão claros. Três mecanismos principais foram propostos por Biessels e cols. (2006): o DM e suas comorbidades estão associados com um risco aumentado para aterosclerose e acidente vascular cerebral o que leva a patologia vascular cerebral; a hiperglicemia pode ter um efeito tóxico direto gerando progressivas anormalidades funcionais e estruturais no cérebro; e por fim a insulina e as enzimas que a degradam podem ter um papel importante no metabolismo amilóide.

Vale ressaltar que os pacientes apresentavam os níveis glicêmicos controlados, não sendo essa a causa do declínio cognitivo observado.

Ainda é controverso como o colesterol está envolvido na patogênese da DA. Sabe-se que há um efeito prejudicial da dislipidemia no risco para desenvolver a doença. Quatro genes (*APOE*, *CLU*, *ABCA7* e *SORLI*) já identificados em estudos genéticos associados a DA estão envolvidos no metabolismo do colesterol. Entretanto, nos estudos epidemiológicos longitudinais avaliando a contribuição da dislipidemia na susceptibilidade os achados são conflitantes, com os resultados dependendo da idade em que foi feita a medida (Reitz, 2013). Com relação ao CCL, hipercolesterolemia familiar e concentrações aumentadas de colesterol total e LDL foram associadas em estudos transversais com uma maior incidência de CCL e pior desempenho cognitivo (Zambón e cols., 2010; Zou e cols., 2014). Entretanto a maioria dos estudos que abordam a relação do CCL com a dislipidemia não especifica o gênero nas análises. Em um amplo estudo longitudinal envolvendo 4895 mulheres idosas os autores encontraram uma associação entre a síndrome metabólica (conjunto de fatores de risco vasculares como obesidade, hipertrigliceridemia e outros) e o desenvolvimento de comprometimento cognitivo (Yaffe e cols., 2009). Já em outro estudo transversal, a hipercolesterolemia foi um preditor para o CCL apenas em homens (Lee e cols., 2012), contrário ao resultado observado no presente estudo.

Posteriormente, quando segregamos a amostra em carreadores e não carreadores do alelo $\epsilon 4$, observamos diferentes fatores associados em cada um dos subgrupos.

Nos sujeitos carreadores do alelo $\epsilon 4$, o DM não se correlacionou com o CCLa (Tabelas 4 e 11). Este resultado pode ser devido ao pequeno número de controles ($n = 39$) e pacientes ($n = 29$) nos dois grupos. Contudo, resultado semelhante foi observado em um estudo longitudinal em que o DM figurou como um fator de risco independente para a DA apenas na ausência de outros fatores de risco principais – como o alelo $\epsilon 4$. Evidências sugerem que o cérebro de indivíduos sem o alelo $\epsilon 4$ pode ser mais susceptível aos efeitos adversos da hiperinsulinemia (Akomolafe e cols., 2006). Com resultados opostos, outros estudos longitudinais relatam um risco aumentado de DA em indivíduos com DM e o alelo $\epsilon 4$ (Peila e cols., 2002; Irie e cols., 2008). A fisiopatologia subjacente a essa associação não é conhecida, mas várias hipóteses relacionadas ao aumento da produção e deposição ou depuração reduzida de $A\beta$ tem sido propostas (Irie e cols., 2008).

Com relação ao CCL, não localizamos trabalhos na literatura que encontraram diferenças entre os dois grupos genéticos. Entretanto, assim como já foi observado para a DA, podemos esperar também diferentes fatores associados com o CCL de acordo com o perfil genético do paciente. O CCL é uma síndrome heterogênea e seus subtipos podem ter diferentes etiologias e desfechos (Sachdev e cols., 2012). No subgrupo $\epsilon 4$ negativo, o DM foi significativamente mais frequente no CCLa mas não foi considerado como preditor na análise multivariada com adição de outras variáveis (Tabelas 5 e 11). Pode-se cogitar também que a divisão do grupo CCLa reduziu o “n” amostral dentro de cada subgrupo causando a perda da associação observada na amostra total.

Entre os portadores do alelo $\epsilon 4$, a escolaridade não foi um fator protetor contra a DA (Tabelas 4 e 12). Enquanto a reserva cognitiva na DA está bem estabelecida, há poucas evidências investigando o papel do perfil genético nessa associação. Um genótipo desfavorável pode influenciar a expressão e progressão da doença através da redução do potencial dos mecanismos de reserva. Evidências sugerem que a apoE modula os processos de neurodegeneração e que pode impactar negativamente na plasticidade sináptica e na resposta a injúrias neuronais (Verghese e cols., 2011). Os alelos da *APOE* tem impactos diferentes na plasticidade – o alelo $\epsilon 4$ inibe o crescimento neurítico e a plasticidade dendrítica enquanto o alelo $\epsilon 3$ promove esses processos (Mesulam, 1999). Sabe-se que portadores do alelo $\epsilon 4$ apresentam uma patologia mais grave e declínio cognitivo mais rápido. Como consequência, o alelo pode ser considerado um fator que interfere com os mecanismos de reserva devido ao seu papel ineficaz em resistir à patologia (Garibotto e cols., 2012), justificando o motivo de não encontramos associação com a escolaridade dentro desse subgrupo. Dos escassos estudos que abordaram a associação entre a reserva cognitiva e os alelos da *APOE* os resultados indicam redução ou preservação dos mecanismos de reserva em carreadores da $\epsilon 4$ (Roe e cols., 2010; Garibotto e cols., 2012).

Observamos também que a HAS foi um preditor independente para a DA apenas na ausência do alelo $\epsilon 4$, ou seja, entre pessoas que tinham um baixo risco para a DA (Tabelas 5 e 12). De fato, HAS pode comprometer as funções cognitivas e está correlacionada com a ocorrência de DA e demência vascular em uma associação dependente da idade (Duron & Hanon, 2008. Imtiaz e cols., 2014). Essas diferenças entre os subgrupos $\epsilon 4$ pode ser explicada pelo papel da apoE no transporte de colesterol e lipídios. Vários estudos indicam uma importante relação

entre a deterioração da homeostase lipídica cerebral, alterações vasculares e a fisiopatologia da DA (Leduc e cols., 2010). As isoformas interagem diferencialmente com os receptores lipoproteicos alterando os níveis de colesterol circulantes (Eichner e cols., 2002). Nossos resultados sugerem que o genótipo *APOE* e a *HAS* podem interagir para modificar o risco para a DA.

Com relação às variantes genéticas, realizamos a genotipagem de cinco *SNPs* de 4 genes (*APOE*, *BDNF*, *GAB2* e *DCHS2*) potencialmente associados com a DA e comparamos as suas frequências alélicas e genotípicas entre os grupos. O CCL é uma condição geneticamente complexa e atualmente não são conhecidos os genes principais relacionados (Winblad e cols., 2004).

Como já está bem estabelecido na literatura, o haplótipo da *APOE* associou-se com a DA, com uma maior frequência do alelo $\epsilon 4$ comparado com os controles e foi responsável por um aumento de 3,65 vezes no risco (Tabelas 6 e 12). Em mulheres foi observado um risco maior cerca de duas vezes ($OR = 4,66$) do que nos homens ($OR = 2,24$). Conforme descrito previamente, o dimorfismo sexual com relação aos fatores associados com a DA já foi observado em vários estudos. A maioria deles tem mostrado que os efeitos do alelo $\epsilon 4$ são mais pronunciados em mulheres do que nos homens. As explicações biológicas para essas diferenças ainda não são bem compreendidas, mas podem estar relacionadas aos hormônios sexuais (Mielke e cols., 2014).

Como o CCLa é considerado como uma fase prodrômica da DA, pode-se supor que o alelo $\epsilon 4$ também represente um fator de risco para CCLa. Entretanto, vários estudos que abordaram essa associação reportaram uma relação inconclusiva com relação ao risco atribuído ao alelo (Luck e cols., 2010). No entanto sabe-se que o alelo é um dos preditores da conversão do CCLa para a DA (Liu e cols., 2013). Ao observarmos as frequências da *APOE* na nossa amostra, notamos que a distribuição do grupo CCLa foi intermediária entre os controles e DA. Apesar das frequências do haplótipos da *APOE* estarem significativamente alteradas em relação ao controle, o alelo $\epsilon 4$ não foi um fator de risco independente para o CCLa na análise multivariada (Tabelas 6 e 11). De fato, o teste de comparação de proporções mostrou que o alelo responsável pela significância encontrada foi o $\epsilon 3$ - que estava em menor frequência no grupo CCLa. Na população geral, o alelo $\epsilon 3$ é o mais frequente dentre os haplótipos e como

nossa amostra de CCLa é pequena pode-se esperar que ele seja o responsável pela diferença entre os haplótipos observados. Acreditamos que em uma amostra maior de pacientes o alelo $\epsilon 4$ seja estatisticamente significativa. O pequeno número amostral incluídos nestes subgrupos constitui uma limitação de nosso estudo.

O gene *BDNF* foi correlacionou-se com o CCLa e a DA apenas no grupo masculino (Tabela 8). O alelo G (Val) do polimorfismo val66met foi mais frequente nesses grupos do que nos controles. Resultado semelhante sem especificar o sexo já foi observado em alguns estudos (Ventriglia e cols., 2002; Feher e cols., 2009; Huang e cols., 2007) enquanto outros encontraram resultados negativos (Bodner e cols., 2005; Nacmias e cols., 2004; Desai e cols., 2005). Contudo, em nossa análise multivariada o polimorfismo não foi um preditor para nenhum dos grupos (Tabelas 11 e 12). O BDNF é amplamente distribuído no sistema nervoso central e tem papel essencial na plasticidade sináptica e na função e sobrevivência neuronal. As alterações nos níveis sanguíneos de BDNF junto com os numerosos estudos genéticos reforçam o papel do BDNF na fisiopatologia do CCLa e da DA (Tapia-Arancibia e cols., 2008; Diniz & Teixeira, 2011).

A influência do sexo no polimorfismo val66met já foi reportada na DA, no transtorno de depressão maior e no transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (Hong e cols., 2011). Uma meta-análise com um grande número de sujeitos revelou que o alelo Met conferia susceptibilidade para a DA apenas em mulheres (Fukumoto e cols., 2009). Outra meta-análise de estudos envolvendo depressão maior mostrou que o alelo Met se correlacionou com um risco aumentado de depressão apenas em homens (Verhagen e cols., 2010).

As frequências alélicas desse polimorfismo variam com as etnias – na população caucasiana a frequência do alelo Met é de 25 a 32% enquanto na população asiática a frequência aumenta para 40 a 50% (Verhagen e cols., 2010). A frequência do alelo Met na nossa amostra foi menor, variando de 10 a 15%. Essas diferentes frequências podem explicar as discrepâncias observadas com outros estudos. Nossa amostra é genomicamente heterogênea sendo composta por uma mistura de três ancestralidades: europeia, africana e ameríndia (Bicalho e cols., 2013).

Observamos também, uma associação genotípica e alélica significativa do gene *DCSH2* nos dois grupos de pacientes (Tabela 9). O alelo A e o genótipo AA foram mais frequentes no grupo CCLa na amostra global e no subgrupo $\epsilon 4$ negativo. Quanto ao grupo DA, apenas observamos associação alélica no subgrupo $\epsilon 4$ negativo. A associação deste gene com o CCLa foi confirmado posteriormente na análise multivariada, através da qual observamos que o genótipo AA foi um preditor independente para o CCLa no subgrupo $\epsilon 4$ negativo (OR = 2,52) e nas mulheres (OR = 3,06). Contudo, na análise multivariada, o gene não se associou se com a DA (Tabelas 11 e 12). Este gene foi reportado pela primeira vez na DA em uma meta-análise de três estudos *GWAS* (Kamboh e cols., 2012) na qual se avaliou a influência do polimorfismo na idade de início da doença e, até onde sabemos, nenhum outro artigo foi publicado sobre essa associação. Para o CCLa também não foram encontrados estudos. O gene compreende 25 exóons localizados na fita complementar da região 4q31.3 do cromossomo 4 (Hoeng e cols., 2004). Embora a função da sua proteína ainda seja desconhecida, as outras proteínas que pertencem à mesma superfamília das caderinas têm sido implicadas em várias doenças neuropsiquiátricas por causa de seus papéis na formação, desenvolvimento e função das redes neuronais (Hirano & Takeichi, 2012; Redies e cols., 2012). Foi proposto que as disfunções na adesão mediada pelas caderinas podem alterar a conectividade e o processamento de informação no cérebro humano (Redies e cols., 2012). Por causa dessa possível função e por ser um gene expresso no córtex cerebral, essa associação deve ser confirmada com outros estudos em amostras maiores.

Com relação ao gene *GAB2*, não encontramos associação significativa com a DA nem com o CCLa (Tabela 10). Recentemente, em uma meta-análise, foi observado significativa heterogeneidade nos estudos publicados para as variantes do gene. E como já foi dito acima, nossa amostra tem uma ancestralidade genômica heterogênea. Além do mais, a susceptibilidade atribuída ao gene pode ser dependente de um *background* haplotípico ao invés de uma só variante. É necessária uma complexa interação de múltiplas variantes funcionais entre os haplótipos para conferir a proteção contra a DA (Zou e cols., 2013). O gene *GAB2* pode estar ligado à neuropatologia da DA através da diminuição da fosforilação da tau (Reiman e cols., 2007).

Observamos um atraso de dois anos entre o aparecimento dos primeiros sintomas cognitivos e o diagnóstico pelo médico para ambas as condições clínicas. Verificamos em nossa amostra

que o alelo $\epsilon 4$ da *APOE* correlacionou-se com um início cerca de dois anos mais precoce da DA – dados condizentes com numerosos estudos na literatura (Corder e cols., 1993; Liu e cols., 2013) (Figura 2). Para os outros genes, não observamos a influência genética no início da doença.

A idade de início da doença é um fenótipo quantitativo que pode ser utilizado para identificar *loci* de susceptibilidade para doenças complexas, como a DA, já que possui um maior poder estatístico para detectar pequenos efeitos genéticos. A idade em que se inicia a DA é geneticamente influenciada, com uma herdabilidade estimada em 42% (Li e cols., 2002). Entretanto apenas 4% da variação genética podem ser explicadas pelos alelos da *APOE*, sugerindo que *loci* adicionais podem estar envolvidos (Tunstall e cols., 2000). A identificação dos genes relacionados ao início da doença pode ajudar na compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na sua etiologia.

É importante notar que a medição da idade de início da doença pode ser imprecisa já que é susceptível a erros que incluem variações na capacidade do informante de detectar as mudanças na cognição do paciente e na habilidade do médico em avaliar o início da doença (Thambisetty e cols., 2013), sendo esta uma das limitações encontradas no presente estudo.

Por último estudamos a influência dos polimorfismos citados no desempenho dos sujeitos em testes cognitivos – MEEM e a Escala Mattis. O MEEM é um instrumento utilizado na prática clínica para avaliação cognitiva global dos pacientes que permite a investigação de várias funções cognitivas como orientação, memória, cálculo, linguagem e habilidade visuoespacial. Já as subescalas I/P e Conceituação da Mattis apresentam tarefas que avaliam o funcionamento executivo. As funções executivas correspondem a um conjunto de habilidades que, de forma integrada, permitem ao indivíduo direcionar comportamentos a metas, avaliar a eficiência e a adequação desses comportamentos, abandonar estratégias ineficazes e, desse modo, resolver problemas imediatos, de médio e de longo prazo (Fuentes e cols., 2014).

Observamos que entre os controles a presença do genótipo GG (Val/Val) do gene *BDNF* associou-se com um pior desempenho na pontuação total do MEEM enquanto para os pacientes do grupo CCLa o genótipo foi responsável por um pior desempenho nas subescalas Iniciativa e Perserveração (I/P) e Conceituação da Escala Mattis (Tabelas 13 e 15).

O BDNF tem um papel essencial na plasticidade sináptica, no desenvolvimento do cérebro e nos processos de aprendizagem e memória. Nossos resultados sugerem que variantes genéticas desta neurotrofina afetem a cognição tanto dos controles quanto dos pacientes com CCLa. A maioria dos estudos apresentam evidências de associação dependente da idade entre o polimorfismo val66met e a cognição. Além de ser um fator de susceptibilidade para a DA, o alelo Val parece correlacionar-se com um pior desempenho em testes de memória e função executiva em idosos (Harris e cols., 2006; Erickson e cols., 2008; Voineskos e cols. 2011; Nagata e cols., 2012). A influência do polimorfismo no desempenho cognitivo depende da idade dos sujeitos – em indivíduos com média de idade de 75 anos o alelo Val associou-se a um pior desempenho cognitivo enquanto em indivíduos com media de idade de 65 anos, o alelo Met foi o responsável pelo déficit (Erickson e cols., 2008).

Observamos também que pacientes do grupo CCLa carreadores $\epsilon 4$ obtiveram uma melhor pontuação na subescala Construção da Escala Mattis (Tabela 15). A subescala apresenta as tarefas de copiar figuras geométricas o que avalia as habilidades visoconstrutivas dos sujeitos. Na contramão dos nossos resultados, o alelo $\epsilon 4$ já foi associado na literatura com uma taxa maior de declínio cognitivo e funcional em pacientes com CCLa e DA e um pior desempenho em testes cognitivos (Cosentino e cols., 2008; Whitehair e cols., 2010; Liu e cols., 2013). Entretanto, o efeito da *APOE* sobre a cognição pode depender da idade e do nível educacional (Cosentino e cols., 2008; Shin e cols., 2014). E, o alelo $\epsilon 4$ pode ser um preditor de declínio cognitivo apenas entre aqueles com alto nível educacional (acima de 6 anos) (Shin e cols., 2014), o que justifica os resultados por nós observados. É possível também que outros fatores que não controlamos estejam influenciando o desempenho desses sujeitos nesse domínio cognitivo, como fatores relacionados à execução do teste pelos pacientes e outras condições clínicas. Recomenda-se também que o domínio cognitivo seja avaliado por dois testes neuropsicológicos independentes para confirmar o déficit (Fuentes e cols., 2014). Por fim, como já foi dito acima, o CCL é uma condição heterogênea e nossa amostra é constituída por pacientes com comprometimento em um único ou em múltiplos domínios. Estes diferentes subtipos podem ter diferentes etiologias e desfechos.

Devido a sua natureza transversal, nosso estudo apresenta algumas limitações. Estudos longitudinais podem permitir uma avaliação da progressão das medidas cognitivas de acordo

com os genótipos ao longo do tempo (Voineskos e cols., 2011). O acompanhamento longitudinal dos pacientes com CCL e controles está sendo realizado e futuramente poderá esclarecer melhor o papel dos genes estudados na doença e em seus endofenótipos. Nossos resultados com relação ao CCLa precisam ser confirmados em amostras maiores levando em consideração também o número de domínios afetados.

Apesar das limitações, nosso trabalho encontrou uma associação ainda não reportada na literatura para o gene *DCSH2* com o CCLa, constatou diferentes fatores de risco entre homens e mulheres e entre carreadores e não carreadores do alelo $\epsilon 4$ e observou também o impacto de variações genéticas no desempenho cognitivo de idosos considerados com cognição normal para a idade e escolaridade e pacientes com CCLa.

6. CONCLUSÕES

A Doença de Alzheimer é multifatorial com numerosos fatores de risco genético-ambientais influenciando a sua susceptibilidade. O CCLa é considerado por muitos autores uma fase pré-clínica da DA por ser um estágio intermediário entre as alterações cognitivas normais do envelhecimento e a demência. A identificação dos genes que contribuem para o risco em desenvolver a doença e para seus fenótipos intermediários pode revelar mecanismos patogênicos, ressaltando proteínas-chave e vias para o desenvolvimento de novas medicações e intervenções terapêuticas.

Nossos dados sugerem diferentes fatores clínicos, sociodemográficos e genéticos associados com a DA e o CCLa que variam de acordo com o gênero e a presença do alelo $\epsilon 4$. Para o CCLa os seguintes fatores foram correlacionados: diabetes tipo 2, dislipidemia entre as mulheres, o gene *DCHS2*, o alelo Val do gene *BDNF* entre os homens e o alelo $\epsilon 3$ da *APOE*. Os fatores associados com a DA foram: idade avançada, escolaridade, HAS no subgrupo $\epsilon 4$ negativo, os alelos da *APOE*, o alelo Val do gene *BDNF* entre os homens e o alelo A do gene *DCHS2* no subgrupo $\epsilon 4$ negativo. A significância clínica desses fatores na população brasileira deve ser melhor compreendida com outros estudos que devem levar em consideração o gênero e o *background* genético dos participantes.

Observamos também a influência de fatores genéticos (*APOE* e *BDNF*) no desempenho cognitivo tanto de idosos com cognição normal para a idade e escolaridade quanto portadores do CCLa e na idade em que se inicia a DA. O estudo de endofenótipos não só aumenta o poder estatístico para a identificação de fatores de risco genéticos como também ajuda a compreender os mecanismos moleculares relacionados ao início e a progressão da doença. Entendendo esses mecanismos, intervenções terapêuticas podem ser desenvolvidas com o objetivo de atrasar o desenvolvimento ou atenuar os déficits cognitivos, reduzindo assim o impacto na funcionalidade e na qualidade de vida dos pacientes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu ID, Forlenza OV, Barros HL (2005) Demência de Alzheimer: correlação entre memória e autonomia. *Rev Psiq Clin* 32 (3): 131-136

Akomolafe A, Beiser A, Meigs J (2006) Diabetes mellitus and risk of developing Alzheimer disease: results from the Framingham Study. *Arch neu* 63:1551–1555.

Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, et al. (2011) The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7:270–9.

Alexopoulos GS (1988) Cornell scale for Depression in dementia. *Biological Psychiatry* 23:271-284

Allelic Discrimination Getting Started Guide. Disponível em: <www.lifetechnologies.com> Acesso em: 09 jun. 2014.

Almeida OP, Almeida AA (1999) Confiabilidade da versão brasileira da escala de depressão geriátrica (GDS) versão reduzida. *Arq Bras Neuro-Psiq* 57:421-426.

American Psychiatric Association: *Diagnosis and Statistical Manual of Mental Disorders* (1994). 4th Ed. Washington, APA

Amorim P (2000) MINI International Neuropsychiatric Interview (MINI): validation of a short structured diagnostic psychiatric interview. *Rev Bras Psiquiatr* 22:106-15.

Angelucci F, Spalletta G, Iulio F, Ciaramella A, Salani F, Varsi AE, Gianni W (2010) Alzheimer's Disease (AD) and Mild Cognitive Impairment (MCI) Patients are Characterized by Increased BDNF Serum Levels. *Curr Alzheimer Res* 15–20.

Ann JJ, Gharami K, Liao GY, Woo NH, Lau AG, Vanevski F, Torre ER, Jones KR, Feng Y, Lu B, Xu B (2008) Distinct role of long 3'UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Cell* 134:175–187.

Arancibia S, Silhol M, Moulière F, Meffre J, Höllinger I, Maurice T, Tapia-Arancibia L (2008) Protective effect of BDNF against beta-amyloid induced neurotoxicity in vitro and in vivo in rats. *Neurobiol Dis* 31:316–26.

Artero S, Ancelin M-L, Portet F, Dupuy A, Berr C, Dartigues JF, Tzourio C, Rouaud O, Poncet M, Pasquier F, Auriacombe S, Touchon J, Ritchie K (2008) Risk profiles for mild

cognitive impairment and progression to dementia are gender specific. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:979–84.

Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH (2008) BDNF and memory formation and storage. *Neurosci* 14:147–56.

Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW (2010) Genetics of Alzheimer's disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23:213–227.

Bertolucci PM (1998) Desempenho da população brasileira na bateria neuropsicológica do Consortium to Establish a Registry for Alzheimer Disease (CERAD). *Rev Psiq Clín* 2: 80-83.

Bertram L, Lill CM, Tanzi RE (2010) The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron* 68:270–81.

Bettens K, Sleegers K, Van Broeckhoven C (2010) Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Hum Mol Genet* 19:R4–R11.

Bicalho MAC, Pimenta FA, Bastos-Rodrigues L, et al. (2013) Sociodemographic characteristics, clinical factors, and genetic polymorphisms associated with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 28:640–6.

Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P (2006) Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* 5:64–74.

Bodner SM, Berrettini W, van Deerlin V, Bennett DA, Wilson RS, Trojanowski JQ, Arnold SE (2005) Genetic variation in the brain derived neurotrophic factor gene in Alzheimer's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 134B:1–5.

Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82: 239–259.

BRASIL. Ministério da Saúde. Datasus: Informações de Saúde. Demográficas e Socioeconômicas. Disponível em: <www.datasus.gov.br> Acesso em: 03 jun. 2014.

Brucki SM, Malheiros SM, Okamoto IH, Bertolucci PH (1997) Normative data on the verbal fluency test in the animal category in our milieu. *Arq Neuropsiquiatr* **55** (1): 56-61.

Brucki SM, Nitrini R, Caramelli P, Bertolucci PH, Okamoto IH (2003) Sugestões para o uso do mini-exame do estado mental no Brasil. *Arq Neuro-Psiquiatria* 61:777-781.

Caramano, AM. (2002) Repositório do conhecimento do IPEA: Envelhecimento da população brasileira: uma contribuição demográfica. Disponível em <hdl.handle.net/11058/2091> Acesso em 14 jun. 2014.

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

Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA (2011) Alzheimer Disease. *Dis Mon* 56:1–60.

Chaves ML, Camozzato AL, Godinho C, Piazenski I, Kaye J (2009) Incidence of mild cognitive impairment and Alzheimer disease in Southern Brazil. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 22:181–7.

Chen Z, Bath K, McEwen B, Hempstead BL, Lee F (2008) Impact of genetic variant BDNF (Val66Met) on brain structure and function. *Novartis Found Symp* 289:180–195.

Chen Z-Y, Patel PD, Sant G, Meng CX, Teng KK, Hempstead BL, Lee FS (2004) Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. *J Neurosci* 24:4401–11.

Coon KD, Myers AJ, Craig DW, et al. (2007) A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry* 68:613-8.

Corder E, Saunders A, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:912-923.

Corder E, Saunders AM, Risch NJ, et al. (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 7:180–184.

Corsi PM. Human memory and the medial temporal region of the brain. 1973. Tese de Doutorado - McGill University, 1973.

Cosentino S, Scarmeas N, Helzner E, Glymour MM, Brandt J, Albert M, Blacker D, Stern Y (2008) APOE ε4 allele predicts faster cognitive decline in mild Alzheimer disease. *Neurology* 70:1842–1849.

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

Desai P, Nebes R, DeKosky ST, Kamboh MI (2005) Investigation of the effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) polymorphisms on the risk of late-onset Alzheimer's disease (AD) and quantitative measures of AD progression. *Neurosci Lett* 379:229–34.

- Diniz BS, Teixeira AL (2011) Brain-derived neurotrophic factor and Alzheimer's disease: physiopathology and beyond. *Neuromolecular Med* 13:217–22.
- Dorey E, Chang N, Liu QY, Yang Z, Zhang W (2014) Apolipoprotein E, amyloid-beta, and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull* 30:317–30.
- Dubois B, Slachvsky A, Litvan I, Pillon B (2000) The FAB: a Frontal and Assessment Battery at bedside. *Neurology* 55:1621-1626
- Dudbridge F (2008) Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. *Human Heredity* 66:87-98
- Duron E, Hanon O (2008) Vascular risk factors, cognitive decline, and dementia. *Vasc Health Risk Manag* 4:363–81.
- Egan MF, Kojima M, Callicott JH, et al. (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112:257–69.
- Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC (2002) Apolipoprotein E Polymorphism and Cardiovascular Disease: A HuGE Review. *Am J Epidemiol* 155 (6):487-495.
- Erickson K, Kim J, Suever B, Voss MW, Francis BM, Kramer AF (2008) Genetic contributions to age-related decline in executive function: a 10-year longitudinal study of COMT and BDNF polymorphisms. *Front Hum Neurosci* 2:1–9.
- Erickson KI, Prakash RS, Voss MW, Chaddock L, Heo S, McLaren M, Pence BD, Martin AS, Vieira VJ, Woods JA, Kramer AF (2010) BDNF is Associated With Age-Related Decline in Hippocampal Volume. *J Neurosci* 30:5368–5375.
- Ertekin-Taner N, De Jager PL, Yu L, Bennett DA (2013) Alternative Approaches in Gene Discovery and Characterization in Alzheimer's Disease. *Curr Genet Med Rep* 1:39–51.
- Faria MC, Gonçalves GS, Rocha NP et al. (2014) Increased plasma levels of BDNF and inflammatory markers in Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res* 53:166–72.
- Fehér A, Juhász A, Rimanóczy A, Kálmán J, Janka Z (2009) Association between BDNF Val66Met polymorphism and Alzheimer disease, dementia with Lewy bodies, and Pick disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 23:224–8.
- Ferri C, Prince M, Brayne C, Brodaty H (2006) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366:2112–2117

Folstein MF, Folstein SE, McHugh (1975) Mini-mental state: a practical method for grading the cognitive status of patients for the clinician. *J Psychiatr Rev* 12:189-195.

Fuentes D et al. **Neuropsicologia: teoria e prática**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 423 p.

Fukumoto N, Fujii T, Combarros O, Kamboh MI, Tsai S-J, Matsushita S, Nacmias B, Comings DE, Arboleda H, Ingelsson M, Hyman BT, Akatsu H, Grupe A, Nishimura AL, Zatz M, Mattila KM, Rinne J, Goto Y, Asada T, Nakamura S, Kunugi H (2010) Sexually Dimorphic Effect of the Val66Met Polymorphism of BDNF on Susceptibility to Alzheimer's Disease: New Data and Meta- Analysis. *Am J Med Genet Part B* 153B:235–242.

Fumagalli F, Racagni G, Riva MA (2006) The expanding role of BDNF: a therapeutic target for Alzheimer's disease? *Pharmacogenomics J* 6:8–15.

Garibotto V, Borroni B, Sorbi S, Cappa SF, Padovani A, Perani D (2012) Education and occupation provide reserve in both ApoEε4 carrier and noncarrier patients with probable Alzheimer's disease. *Neurol Sci* 33(5):1037–1042.

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

Gauthier S, Reisberg B, Zaudig M, et al. (2006) Mild cognitive impairment. *Lancet* 367: 1262–70.

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

Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353–6.

Harris S, Fox H, Wright A, Hayward C (2006) The brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism is associated with age-related change in reasoning skills. *Mol Psychiatry* 11:505–513.

Herrera E Jr, Caramelli P, Silveira ASB, Nitrini R (2002) Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 16:103–108.

Hirano S, Takeichi M (2012) Cadherins in brain morphogenesis and wiring. *Physiol Rev* 92:597–634.

Hoeng JC, Höng JC, Ivanov N V, Hodor P, Xia M, Wei N, Blevins R, Gerhold D, Borodovsky M, Liu Y (2004) Identification of new human cadherin genes using a combination of protein motif search and gene finding methods. *J Mol Biol* 337:307–17.

- Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA (1990) Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J* 9: 2459–2464.
- Hong C, Liou Y, Tsai S (2011) Effects of BDNF polymorphisms on brain function and behavior in health and disease. *Brain Res Bull* 86:287–297.
- Huang E, Reichardt L (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677–736.
- Huang R, Huang J, Cathcart H, Smith S, Poduslo SE (2007) Genetic variants in brain-derived neurotrophic factor associated with Alzheimer’s disease. *J Med Genet* 44:e66.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores Sociodemográficos e de Saúde no Brasil. Disponível em <www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/indic_sociosaude/2009/> Acesso em: 03 jun. 2014.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Projeção da população do Brasil por sexo e idade 1980-2050 – Revisão 2008. Disponível em <www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2008/> Acesso em: 03 jun. 2014.
- Intiaz B, Tolppanen A-M, Kivipelto M, Soininen H (2014) Future directions in Alzheimer’s disease from risk factors to prevention. *Biochem Pharmacol* 88:661–670.
- Irie F, Fitzpatrick A, Lopez OL, et al. (2014) Enhanced Risk for Alzheimer Disease in Persons With Type 2 Diabetes and APOE E4. *Arch Neurol* 65:89–94.
- Jin C, Wu C-Z, Liu X, Zhang F, Tian L, Yuan J, Wang G, Cheng Z (2013) GAB2 polymorphism rs2373115 confers susceptibility to sporadic Alzheimer’s disease. *Neurosci Lett* 556:216–20.
- Kamboh M, Barmada M, Demirci F, et al. (2012) Genome-wide association analysis of age-at-onset in Alzheimer’s disease. *Mol Psychiatry* 17(12):1340-6.
- Katz S, Ford AB, Moskowitz RW, Jackson BA, Jaffe MW (1963) Studies of illness in the aged. The index of ADL: a standardized measure of biological and psychosocial function. *JAMA* 185:914-919
- Kayed R, Head E, Thompson JL, et al. (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300:486–9

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

Lahiri DK, Nurnberger, Jr JI (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444

Lahoz C, Schaefer EJ, Cupples LA, Wilson PW, Levy D, Osgood D, Parpos S, Pedro-Botet J, Daly JA, Ordovas JM (2001) Apolipoprotein E genotype and cardiovascular disease in the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis* 154:529–37.

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

Laske C, Stransky E, Leyhe T, et al. (2007) BDNF serum and CSF concentrations in Alzheimer's disease, normal pressure hydrocephalus and healthy controls. *J Psychiatr Res* 41:387–94.

Lawton MP, Brody EM (1969) Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist* 9:179-86

Leduc V, Jasmin-Bélanger S, Poirier J (2010) APOE and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 16(10):469-477.

Lee JG, Shin BS, You YS, Kim JE, Yoon SW, Jeon DW, Baek JH, Park SW, Kim YH (2009) Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in elderly Korean with dementia. *Psychiatry Investig* 6:299–305.

Lee LK, Shahar S, Chin A-V, Mohd Yusoff NA, Rajab N, Aziz SA (2012) Prevalence of gender disparities and predictors affecting the occurrence of mild cognitive impairment (MCI). *Arch Gerontol Geriatr* 54:185–91.

Leyhe T, Stransky E, Eschweiler GW, Laske C (2008) Increase of BDNF serum concentration during donepezil treatment of patients with early Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 258:124–8.

Li Y-J, Scott WK, Hedges DJ, et al. (2002) Age at onset in two common neurodegenerative diseases is genetically controlled. *Am J Hum Genet* 70:985–93.

Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G (2013) Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol* 9:106–18.

Lopes M, Bottino C (2002) Prevalência de demência em diversas regiões do mundo: análise dos estudos epidemiológicos de 1994 a 2000. *Arq Neuropsiquiatr* 60:61–69.

- Luchsinger JA, Reitz C, Patel B, Tang M-X, Manly JJ, Mayeux R (2007) Relation of diabetes to mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 64:570–5.
- Luck T, Luppá M, Briel S, Riedel-Heller SG (2010) Incidence of mild cognitive impairment: a systematic review. *Dement Geriatr Cogn Disord* 29:164–75.
- Mahley RW, Rall SC (2000) A POLIPOPROTEIN E: Far More Than a Lipid Transport Protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 01:507–37
- Malloy-Diniz LF et al. (2007) The Rey Auditory-Verbal Learning Test: applicability for the Brazilian elderly population. *Rev Bras Psiquiatr* 29:324-9.
- Mattson MP, Maudsley S, Martin B (2004) BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 27:589–94.
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. (2011) The diagnosis of dementia due to Alzheimer’s disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement* 7:263–9.
- Medway C, Morgan K (2014) Review: The genetics of Alzheimer’s disease; putting flesh on the bones. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40:97–105.
- Mesulam MM (1999) Neuroplasticity Failure in Alzheimer’s Disease: Bridging the Gap between Plaques and Tangles. *Neuron* 24(4): 521–529
- Mielke M, Vemuri P, Rocca W (2014) Clinical epidemiology of Alzheimer’s disease: assessing sex and gender differences. *Clin Epidemiol* 37–48.
- Minati L, Edginton T, Bruzzone MG, Giaccone G (2010) Current concepts in Alzheimer’s disease: a multidisciplinary review. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 24:95–121.
- Morris JC (1993) The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology* 43:2412-2414
- Morris JC, Mohs RC, Hughes JP, van Belle G, Fillenbaum G, Millits ED, Clark C (1989) The Consortium to establish a registry for Alzheimer’s disease. *Neurology* 39:1159-1165.
- Morris JC, Blennow K, Froelich L, et al. (2014) Harmonized diagnostic criteria for Alzheimer’s disease: recommendations. *J Intern Med* 275:204–13.
- Nacmias B, Piccini C, Bagnoli S, Tedde A, Cellini E, Bracco L, Sorbi S (2004) Brain-derived neurotrophic factor, apolipoprotein E genetic variants and cognitive performance in Alzheimer’s disease. *Neurosci Lett* 367:379–83.

Nagata T, Shinagawa S, Nukariya K, Yamada H, Nakayama K (2012) Association between BDNF polymorphism (Val66Met) and executive function in patients with amnesic mild cognitive impairment or mild Alzheimer disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 33:266–72.

Nascimento E. WAIS-III: manual para administração e avaliação. São Paulo: Casa do Psicólogo; 2004.

Niedowicz D, Nelson P, Murphy M (2011) Alzheimer's disease: Pathological mechanisms and recent insights. *Curr Neuropharm* 674–684.

Nitrini R (1999) Epidemiologia da doença de Alzheimer no Brasil. *Rev Psiq Clin* 26 (5).

Nitrini R, Lefèvre BH, Mathias SC, Caramelli P, Carrilho PE, Sauaia N, Massad E, Takiguti C, Da Silva IO, Porto CS (1994) Testes neuropsicológicos de aplicação simples para o diagnóstico de demência. *Arq Neuropsiquiatria* 52:456-465

O'Bryant SE, Hobson VL, Hall JR, Barber RC, Zhang S, Johnson L, Diaz-Arrastia R (2011) Serum brain-derived neurotrophic factor levels are specifically associated with memory performance among Alzheimer's disease cases. *Dement Geriatr Cogn Disord* 31:31–6

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

Olin et al. (2002) Provisional diagnostic criteria for depression of Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 10:125-8.

Pan XL, Ren RJ, Wang G, Tang HD, Chen SD (2010) The Gab2 in signal transduction and its potential role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurosci Bull* 26(3):241-6.

Panza F, Frisardi V, Seripa D, D'Onofrio G, Santamato A, Masullo C, Logroscino G, Solfrizzi V, Pilotto A (2012) Apolipoprotein E genotypes and neuropsychiatric symptoms and syndromes in late-onset Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 11:87–103.

Peila R, Rodriguez BL, Launer LJ (2002) Type 2 Diabetes, APOE Gene, and the Risk for Dementia and Related Pathologies. *Diabetes* 51:1256-1262.

Petersen R, Smith GE, Waring S, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E (1999) Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 56:303–309.

Petersen RC, Doody R, Kurz A, Mohs RC, Morris JC, Rabins PV, Ritchie K, Rossor M, Thal L, Winblad B (2001) Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 58:1985–92.

Petersen RC, Roberts RO, Knopman DS, et al. (2010) Prevalence of mild cognitive impairment is higher in men. The Mayo Clinic Study of Aging. *Neurology* 75:889–97.

Petersen RC (2011) Mild Cognitive Impairment. *N Engl J Med* 2227–2234.

Pfeffer RI, Kurosaki TT, Harrah CH Jr, Chance JM, Filos S (1982) Measurement of functional activities on older adults in the community. *J Gerontol* 37(3):323–329

Porto CS, Fichman HC, Caramelli P, Bahia VS, Nitrini R (2003) Brazilian Version of the Mattis Dementia Rating Scale. Diagnosis of mild dementia in Alzheimer's Disease. *Arq Neuropsiquiatr* 61:339–345.

Protocolo de Avaliação Multidimensional do Idoso. Disponível em: <www.hc.ufmg.br/geriatria> Acesso em 09 jun. 2014.

Querfurth HW, LaFerla FM (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362:329–44.

R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em <www.r-project.org> Acesso em: 09 jun. 2014.

Raven, JC. Matrizes Progressivas: escala geral. São Paulo: Casa do Psicólogo, 2000.

Real-time PCR handbook. Disponível em: <www.lifetechnologies.com> Acesso em: 09 jun. 2014.

Redies C, Hertel N, Hübner CA (2012) Cadherins and neuropsychiatric disorders. *Brain Res* 1470:130–44.

Reiman EM, Webster JA, Myers AJ, et al. (2007) GAB2 alleles modify Alzheimer's risk in APOE epsilon4 carriers. *Neuron* 54:713–20.

Reitz C (2013) Dyslipidemia and the risk of Alzheimer's disease. *Curr Atheroscler Rep* 15:307.

Reitz C, Mayeux R (2009) Endophenotypes in normal brain morphology and Alzheimer's disease: a review. *Neuroscience* 164:174–190.

Reitz C, Mayeux R (2014) Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol* 88:640–651.

Renzi E, Faglioni P. Normative data and screening power of a shortened version of the Token Test. *Cortex*. 1978;14(1):41–9.

Roberts RO, Knopman DS, Geda YE, Cha RH, Pankratz VS, Baertlein L, Boeve BF, Tangalos EG, Ivnik RJ, Mielke MM, Petersen RC (2014) Association of diabetes with amnesic and nonamnesic mild cognitive impairment. *Alzheimers Dement* 10:18–26.

Roe CM, Xiong C, Miller JP, Morris JC (2007) Education and Alzheimer disease without dementia: support for the cognitive reserve hypothesis. *Neurology* 68(3):223–228.

Sachdev PS, Lipnicki DM, Crawford J, et al. (2012) Risk profiles of subtypes of mild cognitive impairment: the sydney memory and ageing study. *J Am Geriatr Soc* 60:24–33.

Schindowski K, Belarbi K, Buée L (2008) Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes Brain Behav* 7:43–56.

Schlottfeldt CG, Naciff E, Levy A, Neves F, Fuentes, D, Malloy-Diniz LF. O Teste da Torre de Londres. In: Leandro F. Malloy-Diniz; Daniel Fuentes; Paulo Mattos; Neander Abreu. (Org.). *Avaliação Neuropsicológica*. 1ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, v. , p. 344-34

Sheehan DV et al. (1998) The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *J Clin Psychiatric* 59 Suppl 20:22-33;quiz 34-57.

Shin M-H, Kweon S-S, Choi J-S, et al. (2014) The effect of an APOE polymorphism on cognitive function depends on age. *J Neurol* 261:66–72.

Shulman JM, Chibnik LB, Aubin C, Schneider JA, Bennett DA, De Jager PL. (2010) Intermediate phenotypes identify divergent pathways to Alzheimer's disease. *PLoS One* 5:e11244.

Shulman KI (2000) Clock-drawing: is it the ideal cognitive screening test? *Int J Geriatr Psychiatry* 15:548-61.

Small BJ, Rosnick CB, Fratiglioni L, Bäckman L (2004) Apolipoprotein E and cognitive performance: a meta-analysis. *Psychol Aging* 19:592–600.

Sociedade Brasileira de Cardiologia - Departamento de Aterosclerose (2007) IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemia e prevenção da aterosclerose. *Arq Bras Cardiologia* 88 (Sup11).

Soldan A, Pettigrew C, Li S, Wang MC, Moghekar A, Selnes O, Albert M, O'Brien R (2013) Relationship of cognitive reserve and cerebrospinal fluid biomarkers to the emergence of clinical symptoms in preclinical Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 34(12):2827–2834.

Solomon A, Mangialasche F, Richard E, et al. (2014) Advances in the prevention of Alzheimer's disease and dementia. *J Intern Med* 275:229–50.

Sosa-Ortiz AL, Acosta-Castillo I, Prince MJ (2012) Epidemiology of dementias and Alzheimer's disease. *Arch Med Res* 43:600–8.

Sperling RA, Aisen PS, Beckett L a, et al. (2011) Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7:280–92.

Strauss E, Sherman EMS & Spreen O. (2006) *A Compendium of Neuropsychological Tests: Administration, Norms and Commentary* (3rd ed.). New York: Oxford University Press.

Tanzi RE (2012) The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2:a006296

Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, Arancibia S (2008) New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Res Rev* 59:201–20.

Tatsch MF, Bottino CM, Azevedo D, Hototian SR, Moscoso MA, Folquitto JC, Scalco AZ, Louzã MR (2006) Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer disease and cognitively impaired, nondemented elderly from a community-based sample in Brazil: prevalence and relationship with dementia severity. *Am J Geriatr Psychiatry*, 14:438-45

Thambisetty M, An Y, Tanaka T (2013) Alzheimer's disease risk genes and the age-at-onset phenotype. *Neurobiol Aging* 34:2696.e1–5.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (1997) Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 20:1183-1197

Thies W, Bleiler L (2013) 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 9:208–45.

Thorne SL, Malarcher A, Maurice E, Caraballo R (2009) Office on Smoking and Health, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, CDC. *JAMA* 301:373-375

Tierney MC, Fisher RH, Lewis AJ, Zorzitto ML, Snow WG, Reid DW, Nieuwstraten P (1988) The NINCDS-ADRDA Work Group criteria diagnosis of probable Alzheimer's disease: A clinicopathologic study of 57 cases. *Neurology* 38:359-364.

Tosto G, Reitz C (2013) Genome-wide association studies in Alzheimer's disease: a review. *Curr Neurol Neurosci Rep* 13:381.

Tunstall N, Owen MJ, Williams J, Rice F, Carty S, Lillystone S, Fraser L, Kehoe P, Neill D, Rudrasingham V, Sham P, Lovestone S (2000) Familial influence on variation in age of onset and behavioural phenotype in Alzheimer's disease. *Br J Psychiatry* 176:156–159.

V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol*, São Paulo, v. 89, n. 3, Set 2007. Disponível em: <www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2007001500012&lng=en&nrm=iso> Acesso em: 09 jun. 2014.

Vance JE, Hayashi H (2010) Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1801:806–18.

Vega Ú, Marinho V, Engelhardt E, Laks J (2007) Sintomas neuropsiquiátricos nas demências: relato preliminar de uma avaliação prospectiva em um ambulatório do Brasil. *Arq Neuropsiquiatr* 65:498–502.

Ventriglia M, Chiavetto L, Benussi L (2002) Association between the BDNF 196 A/G polymorphism and sporadic Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 4:8–9.

Ventriglia M, Zanardini R, Bonomini C, Zanetti O, Volpe D, Pasqualetti P, Gennarelli M, Bocchio-Chiavetto L (2013) Serum Brain-derived Neurotrophic Factor Levels in different neurological diseases. *BioMed Res Int* 901082

Verghese PB, Castellano JM, Holtzman DM (2011) Roles of Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol* 10(3):241–252.

Verhagen M, van der Meij A, van Deurzen PAM, Janzing JGE, Arias-Vásquez A, Buitelaar JK, Franke B (2010) Meta-analysis of the BDNF Val66Met polymorphism in major depressive disorder: effects of gender and ethnicity. *Mol Psychiatry* 15:260–71.

Voineskos AN, Lerch JP, Felsky D, Shaikh S, Rajji TK, Miranda D, Lobaugh NJ, Mulsant BH, Pollock BG, Kennedy JL (2011) The brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and prediction of neural risk for Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 68:198–206.

Wehling E, Lundervold AJ, Standnes B, Gjerstad L, Reinvang I (2007) APOE status and its association to learning and memory performance in middle aged and older Norwegians seeking assessment for memory deficits. *Behav Brain Funct* 3:57.

Whitehair DC, Sherzai A, Emond J, Raman R, Aisen PS, Petersen RC, Fleisher AS (2010) Influence of apolipoprotein E varepsilon4 on rates of cognitive and functional decline in mild cognitive impairment. *Alzheimers Dement* 6:412–9.

Winblad B, Palmer K, Kivipelto M, et al. (2004) Mild cognitive impairment--beyond controversies, towards a consensus: report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. *J Intern Med* 256:240–6.

Wisdom NM, Callahan JL, Hawkins KA (2011) The effects of apolipoprotein E on non-impaired cognitive functioning: a meta-analysis. *Neurobiol Aging* 32:63–74.

Woolley J, Strobl E, Shelly W, Karydas AM, Ketelle R, Wolkowitz OM, Miller BL, Rankin, KP (2012) BDNF serum concentrations show no relationship with diagnostic group or medication status in neurodegenerative disease. *Curr Alzheimer Res* 9:815–821.

World Alzheimer Report 2010: The Global Economic Impact of Dementia – Alzheimer’s Disease International. Disponível em <www.alz.co.uk/research/world-report-2010>. Acesso em 03 jun.2014.

Yaffe K, Weston A, Blackwell T, Krueger KA (2009) The metabolic syndrome and development of cognitive impairment among older women. *Arch Neurol* 66:324–328.

Ye X, Tai W, Zhang D (2011) The early events of Alzheimer’s disease pathology: from mitochondrial dysfunction to BDNF axonal transport deficits. *Neurobiol Aging* 33:1122.e1–10.

Zambón D, Quintana M, Mata P (2010) Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia. *Am J Med* 123:267–274.

Zhang F, Kang Z, Li W, Xiao Z, Zhou X (2012) Roles of brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B (BDNF/TrkB) signalling in Alzheimer’s disease. *J Clin Neurosci* 19:946–949.

Zou F, Belbin O, Carrasquillo MM, Culley OJ, Hunter TA, et al. (2013) Linking Protective GAB2 Variants, Increased Cortical GAB2 Expression and Decreased Alzheimer’s Disease Pathology. *PLoS ONE* 8(5): e64802.

Zou Y, Zhu Q, Deng Y, Duan J, Pan L, Tu Q, Dai R, Zhang X, Chu LW, Lü L (2014) Vascular risk factors and mild cognitive impairment in the elderly population in southwest china. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 29:242–7.

8. TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela Suplementar 1 – Resultados das análises (valor p) para amostra total e o teste estatístico utilizado.

	CCLa x controles	DA x controles	Teste estatístico
Idade	0,759	0,006	Mann-Whitney
Sexo	0,122	0,939	Qui-quadrado
MEEM	<0,001	<0,001	Mann-Whitney
CDR	<0,001	<0,001	Mann-Whitney
Escolaridade	0,589	<0,001	Mann-Whitney
Hipertensão Arterial	0,858	0,461	Qui-quadrado
Diabetes Mellitus	0,003	0,501	Qui-quadrado
Dislipidemia	0,160	0,346	Qui-quadrado
Tabagismo	0,563	0,984	Qui-quadrado

CCLa: Comprometimento cognitivo leve amnésico; MEEM: Mini exame do estado mental; CDR: *Clinical Dementia Rating*; DA: Doença de Alzheimer.

Tabela Suplementar 2 - Resultados das análises (valor p) para subgrupo $\epsilon 4$ positivo e o teste estatístico utilizado.

	CCLa x controles	DA x controles	Teste estatístico
Idade	0,577	0,273	Teste t
Sexo	0,701	0,166	Qui-quadrado
MEEM	0,058	<0,001	Teste t
CDR	<0,001	<0,001	Mann-Whitney
Escolaridade	0,335	0,203	Mann-Whitney
Hipertensão Arterial	0,606	0,096	Qui-quadrado
Diabetes Mellitus	0,125	0,980	Qui-quadrado
Dislipidemia	0,444	0,431	Qui-quadrado
Tabagismo	0,77	0,770	Qui-quadrado

CCLa: Comprometimento cognitivo leve amnésico; MEEM: Mini exame do estado mental; CDR: *Clinical Dementia Rating*; DA: Doença de Alzheimer.

Tabela Suplementar 3 - Resultados das análises (valor p) para subgrupo ε4 negativo e o teste estatístico utilizado.

	CCLa x controles	DA x controles	Teste estatístico
Idade	0,922	0,008	Teste t/Mann-Whitney ^a
Sexo	0,124	0,240	Qui-quadrado
MEEM	<0,001	<0,001	Mann-Whitney
CDR	<0,001	<0,001	Mann-Whitney
Escolaridade	0,158	0,001	Mann-Whitney
Hipertensão Arterial	0,756	0,014	Qui-quadrado
Diabetes Mellitus	0,015	0,438	Qui-quadrado
Dislipidemia	0,328	0,176	Qui-quadrado
Tabagismo	0,242	0,967	Qui-quadrado

^a Teste t para CCLa x controles e Teste Mann-Whitney para DA x controles. CCLa: Comprometimento cognitivo leve amnésico; MEEM: Mini exame do estado mental; CDR: *Clinical Dementia Rating*; DA: Doença de Alzheimer.

Tabela Suplementar 4 - Distribuições alélicas da *APOE* em homens e mulheres

		n	ε2	ε3	ε4	p
	Controles	47	6 (7%)	70 (74%)	18 (19%)	
Homens	CCLa	34	9 (13%)	43 (63%)	16 (24%)	0,501
	DA	100	4 (2%)	136 (68%)	60 (30%)	0,047
	Controles	101	11 (5%)	167 (83%)	24 (12%)	
Mulheres	CCLa	46	8 (9%)	67 (73%)	17 (18%)	0,171
	DA	204	9 (3%)	269 (65%)	131 (32%)	< 0,001

Número absoluto (%). Valor de p refere-se à comparação com o grupo controle com análise de 1000 permutações (teste qui-quadrado). CCLa: Comprometimento cognitivo leve amnésico; DA: Doença de Alzheimer.

Tabela Suplementar 5 - Distribuições alélicas e genóticas do *BDNF* para os subgrupos $\epsilon 4$ positivo e negativo

		Frequência genotípica				p	Frequência alélica		p
		n	AA	AG	GG		A	G	
$\epsilon 4$ positivo	Controles	37	2 (5%)	7 (19%)	28 (76%)		11 (15%)	63 (85%)	
	CCLa	28	2 (7%)	3 (11%)	23 (82%)	0,642	7 (13%)	49 (87%)	0,698
	DA	141	2 (1%)	31 (22%)	108 (77%)	0,405	35 (12%)	247 (88%)	0,581
$\epsilon 4$ negativo	Controles	104	4 (4%)	23 (22%)	77 (74%)		31 (15%)	177 (85%)	
	CCLa	49	0 (0%)	9 (18%)	40 (82%)	0,168	9 (9%)	89 (91%)	0,155
	DA	140	4 (3%)	31 (22%)	105 (75%)	0,912	39 (14%)	241 (86%)	0,761

Número absoluto (%). Valor de p refere-se à comparação com o grupo controle com análise de 1000 permutações (teste qui-quadrado). CCLa: Comprometimento cognitivo leve amnésico; DA: Doença de Alzheimer.

Tabela Suplementar 6 - Distribuições alélicas e genóticas do *DCSH2* para homens e mulheres

		Frequência genotípica				p	Frequência alélica		p
		n	TT	TA	AA		T	A	
Homens	Controles	47	2 (4%)	16 (34%)	29 (62%)		20 (21%)	74 (79%)	
	CCLa	33	0 (0%)	13 (39%)	20 (61%)	0,319	13 (20%)	53 (80%)	0,808
	DA	99	5 (5%)	30 (30%)	64 (65%)	0,893	40 (20%)	158 (80%)	0,832
Mulheres	Controles	96	8 (8%)	38 (40%)	50 (52%)		54 (28%)	138 (72%)	
	CCLa	46	0 (0%)	13 (28%)	33 (72%)	0,009	13 (14%)	79 (86%)	0,007
	DA	200	9 (5%)	70 (35%)	121 (60%)	0,254	88 (22%)	312 (78%)	0,155

Número absoluto (%). Valor de p refere-se à comparação com o grupo controle com análise de 1000 permutações (teste qui-quadrado). CCLa: Comprometimento cognitivo leve amnésico; DA: Doença de Alzheimer.

Tabela Suplementar 7 - Distribuições alélicas e genotípicas do *GAB2* para homens e mulheres

		Frequência genotípica				p	Frequência alélica		p
		n	GG	GT	TT		G	T	
Homens	Controles	36	19 (53%)	16 (44%)	1 (3%)		54 (75%)	18 (25%)	
	CCLa	26	14 (54%)	9 (35%)	3 (11%)	0,337	37 (71%)	15 (29%)	0,633
	DA	90	55 (59%)	32 (34%)	6 (7%)	0,449	142 (76%)	44 (24%)	0,821
Mulheres	Controles	78	45 (58%)	29 (37%)	4 (5%)		119 (76%)	37 (24%)	
	CCLa	29	21 (72%)	7 (24%)	1 (4%)	0,368	49 (85%)	9 (16%)	0,183
	DA	182	108 (59%)	61 (34%)	13 (7%)	0,745	277 (76%)	87 (24%)	0,964
ε4 positivo	Controles	28	14 (50%)	12 (43%)	2 (7%)		40 (71%)	16 (29%)	
	CCLa	19	11 (58%)	6 (32%)	2 (10%)	0,717	28 (74%)	10 (26%)	0,810
	DA	144	83 (58%)	48 (33%)	13 (9%)	0,629	214 (74%)	74 (26%)	0,656
ε4 negativo	Controles	85	49 (58%)	33 (39%)	3 (3%)		131 (77%)	39 (23%)	
	CCLa	36	24 (67%)	10 (28%)	2 (5%)	0,476	58 (81%)	14 (19%)	0,544
	DA	129	79 (61%)	44 (34%)	6 (5%)	0,748	202 (78%)	56 (22%)	0,764

Número absoluto (%). Valor de p refere-se à comparação com o grupo controle com análise de 1000 permutações (teste qui-quadrado). CCLa: Comprometimento cognitivo leve amnésico; DA: Doença de Alzheimer.

9. ANEXOS

Anexo 1 – Critérios diagnósticos para demência (DSM IV) - Critérios diagnósticos da NINCDS-ADRDA para o diagnóstico de Doença de Alzheimer

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

¹ Transtornos psiquiátricos do eixo I: O DSM-IV organiza cada condição psiquiátrica em cinco níveis (eixos), relacionados com os diferentes aspectos da doença:

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

Codificar com base no tipo de início e características predominantes:

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

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

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

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

I- DA provável:

- Presença de demência estabelecida por este teste objetivo, como mini-mental ou exame similar e confirmado por exame neuropsicológico;
 - Prejuízo da memória e de pelo menos uma função cognitiva;
 - Piora progressiva da memória e outras funções cognitivas;
 - Ausência de distúrbio da consciência;
 - Início entre os 40 e 90 anos, mas mais freqüente após 65 anos;
 - Ausência de condições sistêmicas e/ou outra doença do Sistema Nervoso Central (SNC) que possa justificar o déficit de memória e cognitivo progressivo;
- O diagnóstico de DA provável é apoiado por:
- Deterioração progressiva das funções cognitivas como linguagem, habilidades motoras e percepção;
 - Atividades do dia-a-dia prejudicadas e padrão de comportamento alterado;
 - História familiar de transtorno semelhante, particularmente se confirmado por exame neuropatológico;
 - Líquido céfalo-raquidiano normal, quando avaliado pela técnica padrão;

- Eletroencefalograma normal ou com padrão inespecífico, como aumento da atividade das ondas lentas; evidência de atrofia cerebral progressiva em exames de neuro-imagem seriados;
- Outros achados clínicos consistentes com o diagnóstico de DA, após exclusão de outras causas de demência:
 - Platô no curso da doença;
 - Sintomas associados de depressão, insônia, incontinência, delusões, ilusões, halucinações, surtos de descontrole (verbal, emocional ou físico), mudanças no comportamento sexual e perda de peso;
 - Outras alterações neurológicas em fase avançada da doença: aumento do tônus muscular, mioclonia e desordens da marcha;
- Achados que tornam o diagnóstico de DA improvável ou incerto:
 - Início súbito ou apoplético;
 - Sinais neurológicos focais, como hemiparesias, perda sensorial ou de campo visual, e incoordenação no início da doença;
 - Convulsões e distúrbios da marcha no início ou muito precoce no curso da doença;

II- DA possível:

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

III- DA definitiva:

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

IV- Classificação:

- Ocorrência familiar ou genética;
- Início antes dos 65 anos;
- Presença de trissomia do cromossomo 21²;
- Coexistência de outras condições relevantes, como Doença de Parkinson.

² Alguns casos de DA familiar mostram evidência de associação com o cromossomo 21, com mutações no locus da APP, determinados por hiperexpressão da APP.

Anexo 2 – TCLE: Abordagem multidisciplinar do binômio depressão-demência no idoso

Nº Registro COEP: ETIC334/06 _____

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

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

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

Objetivo do estudo

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

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

Procedimentos

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

Pesquisadores

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

Confidencialidade

Todos os dados gerados nessa pesquisa serão mantidos em sigilo e apenas a equipe de pesquisadores terá acesso a eles. Os dados de cada participante receberão um código e não terão nenhuma identificação que permita associá-lo a um participante em particular. Caso o senhor/senhora queira poderá ter acesso aos resultados individuais.

Benefícios e riscos

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

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

Desligamento

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

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

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

Belo Horizonte, ____ de _____ de 20 ____

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador:

Nome do pesquisador:

Anexo 3 – TCLE - Coorte prospectiva de pacientes com Comprometimento Cognitivo Leve Amnésico – Determinação de fatores de risco para conversão para demência de Alzheimer no Brasil (Versão para participantes e para representantes legais)

Termo de consentimento livre e esclarecido para participantes:

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “COORTE PROSPECTIVA DE PACIENTES COM COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE AMNÉSICO – DETERMINAÇÃO DE FATORES DE RISCO PARA CONVERSÃO PARA DEMÊNCIA DE ALZHEIMER NO BRASIL”, que tem como objetivo avaliar e acompanhar as pessoas que apresentam Comprometimento Cognitivo Leve, que eleva muito o risco de desenvolver a Demência de Alzheimer.

A Demência de Alzheimer é uma doença sem cura, mas que apresenta tratamento que lentifica a doença e reduz os sintomas. Para o Comprometimento Cognitivo Leve ainda não há medicação específica para evitar que a manifestação da Demência de Alzheimer. Mas entender o que ocorre com os pacientes com Comprometimento Cognitivo Leve é um passo importante para no futuro poder tratar estes pacientes e evitar o desenvolvimento da Demência de Alzheimer.

Por isso, você está sendo convidado a participar desta pesquisa, que irá acompanhar até 2016 os pacientes que apresentam Comprometimento Cognitivo Leve. Os objetivos principais são determinar os fatores que aumentam o risco deste pacientes de desenvolverem a Demência de Alzheimer e verificar se determinados exames são capazes de identificar quais pacientes irão desenvolver a demência. Além disso, os testes que serão aplicados podem favorecer o diagnóstico na fase inicial da demência. Indivíduos nesta fase da doença apresentam melhor resposta ao tratamento atualmente disponível.

Para participar desta pesquisa você precisará responder a um questionário com duração de 15 minutos e será submetido a testes que avaliam a memória, a presença de depressão e outras alterações do comportamento, com duração de 40 minutos. Estes testes serão repetidos a cada seis meses.

Você será submetido à punção venosa no antebraço para coleta de cerca de 20 ml de sangue para avaliar a presença do alelo APOE-ε4 e outros polimorfismos genéticos (alterações genéticas potencialmente envolvidas no desenvolvimento da doença de Alzheimer) e nível sérico de homocisteína, que podem ter relação com o maior risco de desenvolver Alzheimer. A coleta de sangue poderá acarretar incômodo leve curta de duração durante a punção. Ocasionalmente, pode se desenvolver um hematoma no local de punção e, mais raramente, complicações mais sérias como processos infecciosos locais. Estas complicações são inerentes a qualquer punção venosa. Os profissionais responsáveis pelo procedimento são experientes e treinados para a sua realização. O material é totalmente estéril e descartável. O sangue coletado será devidamente etiquetado e utilizado somente para os propósitos dessa pesquisa, não havendo quaisquer custos para a paciente.

Também será realizado um exame chamado Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência (P-300), que emite sons que serão identificados pelo cérebro do paciente, o que não acarreta riscos.

Outro exame que será realizado é uma tomografia encefálica por emissão de pósitrons, capaz de determinar as áreas do cérebro com funcionamento anormal. Através desta técnica, há exposição à radiação, mas numa dose baixa e que não acarreta riscos à saúde. Não haverá administração de contraste iodado na grande maioria dos casos. Entretanto, caso o médico nuclear ou radiologista identifique a necessidade de utilização de contraste, o mesmo somente será administrado após aplicação de questionário para avaliação do risco de sua utilização e mediante autorização do paciente ou seu responsável.

Os pacientes que desenvolverem demência de Alzheimer ao longo do acompanhamento serão encaminhados ao ambulatório de geriatria do Instituto Jenny de Andrade Faria de Atenção à Saúde do Idoso, visando manter o seguimento clínico e a introdução da medicação antidemência (anticolinesterásicos).

A pesquisa será suspensa caso ocorra disponibilização no mercado de tratamento eficaz para evitar a progressão de CCL para DA para que o paciente possa recebê-lo e possivelmente se beneficiar de seus resultados.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária, portanto, não implica em qualquer dano material, físico ou moral, assim como também não resulta em qualquer benefício material.

As informações coletadas terão um caráter confidencial, ou seja, seu nome não será divulgado em nenhuma hipótese. O resultado desta pesquisa será divulgado em artigo de revista científica, sem colocar em evidência a identidade dos participantes.

Você não terá nenhuma despesa, sendo de responsabilidade dos pesquisadores os gastos com impressão, cópias, realização de exames ou com qualquer outra eventualidade. Os gastos porventura existentes com transporte serão ressarcidos pelos pesquisadores.

Os pesquisadores ficam disponíveis a esclarecer quaisquer dúvidas, antes, durante e após o término do estudo e publicação dos resultados. Fica assegurado seu direito de se retirar da pesquisa a qualquer momento, sem que haja qualquer dano ou repressão, por parte dos pesquisadores.

Através deste documento fica assegurado o direito ao Sr(a) _____ que terá todos os esclarecimentos relativos à pesquisa, garantidos, incluindo os métodos utilizados. A partir do momento que o paciente participante da pesquisa não desejar mais fazer parte da pesquisa, reserve-lhe o direito de retirar o seu consentimento, livre de sofrer qualquer penalidade ou danos, quaisquer que sejam. Se no transcorrer da pesquisa tiver alguma dúvida, ou por qualquer outro motivo necessitar de orientações, poderá procurar um dos pesquisadores. Caso seja necessário, você poderá entrar em contato com o COEP/UFMG, sito à Av. Antonio Carlos 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005, CEP: 31270-901- Belo Horizonte – MG. telefax (31) 3409-4592, e-mail coep@prpq.ufmg.br, onde maiores esclarecimentos poderão ser obtidos.

Baseado neste termo, eu,

CI _____, órgão expedidor _____, aceito participar da pesquisa “COORTE PROSPECTIVA DE PACIENTES COM COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE AMNÉSICO – DETERMINAÇÃO DE FATORES DE RISCO PARA CONVERSÃO PARA DEMÊNCIA DE ALZHEIMER NO BRASIL” em acordo com as informações acima expostas.

Assinatura do participante:

Nome do familiar/acompanhante:

Assinatura do familiar/acompanhante:

Nome do pesquisador responsável:

Assinatura do pesquisador:

Belo Horizonte, _____ de _____ de 20____.

Pesquisadores:

- 1-Maria Aparecida Camargos Bicalho – médica especialista em geriatria, preceptora da residência de geriatria do Hospital das Clínicas-UFMG e professora adjunto do Departamento de Clínica Médica na Universidade Federal de Minas Gerais. T: 31-8478-8629.
- 2-Edgar Nunes de Moraes – médico especialista em geriatria, coordenador da residência de geriatria do Hospital das Clínicas-UFMG e professor adjunto do Departamento de Clínica Médica na Universidade Federal de Minas Gerais. T: 31-9115-7141.
- 3- Luiz Armando Cunha de Marco- médico, coordenador do Laboratório de Medicina Molecular da Faculdade de medicina da UFMG. T: 34099134.
- 4-Marco Aurélio Romano Silva- médico, coordenador do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Medicina Molecular. T: 3409-9135.
- 5- Débora Marques de Miranda- médica e professora adjunta do departamento de pediatria da UFMG.T 3409-9135.
- 6- Marcelo Mamede- médico nuclear e professor do departamento de propedêutica complementar da UFMG. T:3409-9774.
- 7-Leandro Fernandes Malloy Diniz – neuropsicólogo, coordenador do serviço de neuropsicologia do Instituto Jenny de Andrade Faria de Atenção ao Idoso e professor adjunto do departamento de psicologia da FAFICH. T: 31-8707-1986.
- 8-Denise Utsch Gonçalves – médica otorrinolaringologista, professora adjunto do Departamento de Otorrinolaringologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Tel: 31 8887-2533.
- 9- Rodrigo Nicolato – médico psiquiatra, especialista em psicogeriatrics, professor adjunto do departamento de saúde mental da Faculdade de Medicina da UFMG.
- 10-Marco Túlio Gualberto Cintra- médico especialista em geriatrics, preceptor da residência de geriatria do Hospital das Clínicas-UFMG e mestrando do Programa Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da UFMG. Tel: 31 9636-6108
- 11-Jonas Jardim de Paula – neuropsicólogo e mestrando pelo Programa de Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Tel: 31-9990-2760
- 12-Lafaiete Moreira dos Santos – neuropsicólogo e mestrando pelo Programa de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG. Tel: 31-8839-1480
- 13-Fabiana Carla Matos da Cunha Cintra – terapeuta ocupacional e gerontóloga. Tel: 31-9919-2793
- 14- Luciana Cristina Matos da Cunha – fonoaudióloga e mestre pelo Programa de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG. Tel: 31-9306-6806
- 15- Fernanda Monteiro de Castro Carvalho- médica radiologista e mestranda pelo Programa de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG. T: 8777-3458.
- 16-Flávia Lanna de Moraes- médica geriatrics e mestranda pelo Programa de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG. T: 9115-7142.
- 17-Fausto Aloísio Pimenta- médico geriatrics e professor de clínica médica da Faculdade de Medicina da UFOP. T: 3559-1018

Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG):

Av. Antonio Carlos 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005, CEP: 31270-901- Belo Horizonte – MG. telefax (31) 3409-4592, e-mail coep@prpq.ufmg.br.

Termo de consentimento livre e esclarecido para representantes legais de participantes:

O Sr (a) _____ está sendo convidado a participar da pesquisa “COORTE PROSPECTIVA DE PACIENTES COM COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE AMNÉSICO – DETERMINAÇÃO DE FATORES DE RISCO PARA CONVERSÃO PARA DEMÊNCIA DE ALZHEIMER NO BRASIL”, que tem como objetivo avaliar e acompanhar as pessoas que apresentam Comprometimento Cognitivo Leve, que eleva muito o risco de desenvolver a Demência de Alzheimer.

Indivíduos que apresentam impedimento cognitivo para entendimento ou assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deverão ser representados por um familiar ou representante.

A Demência de Alzheimer é uma doença sem cura, mas que apresenta tratamento que lentifica a doença e reduz os sintomas. Para o Comprometimento Cognitivo Leve ainda não há medicação específica para evitar que a manifestação da Demência de Alzheimer. Mas entender o que ocorre com os pacientes com Comprometimento Cognitivo Leve é um passo importante para no futuro poder tratar estes pacientes e evitar o desenvolvimento da Demência de Alzheimer.

Esta pesquisa pretende acompanhar até 2016 os pacientes que apresentam Comprometimento Cognitivo Leve. Os objetivos principais são determinar os fatores que aumentam o risco deste pacientes de desenvolverem a Demência de Alzheimer e verificar se determinados exames são capazes de identificar quais pacientes irão desenvolver a demência. Além disso, os testes que serão aplicados podem favorecer o diagnóstico na fase inicial da demência. Indivíduos nesta fase da doença apresentam melhor resposta ao tratamento atualmente disponível.

Para participar desta pesquisa os participantes precisarão responder a um questionário com duração de 15 minutos e serão submetidos a testes que avaliam a memória, a presença de depressão e outras alterações do comportamento, com duração de 40 minutos. Estes testes serão repetidos a cada seis meses.

Os participantes serão submetidos à punção venosa no antebraço para coleta de cerca de 20ml de sangue para avaliar a presença do alelo APOE-ε4 e outros polimorfismos genéticos (alterações genéticas potencialmente envolvidas no desenvolvimento da doença de Alzheimer) e nível sérico de homocisteína, que podem ter relação com o maior risco de desenvolver Alzheimer. A coleta de sangue poderá acarretar incômodo leve curta de duração durante a punção. Ocasionalmente, pode se desenvolver um hematoma no local de punção e, mais raramente, complicações mais sérias como processos infecciosos locais. Estas complicações são inerentes a qualquer punção venosa. Os profissionais responsáveis pelo procedimento são experientes e treinados para a sua realização. O material é totalmente estéril e descartável. O sangue coletado será devidamente etiquetado e utilizado somente para os propósitos dessa pesquisa, não havendo quaisquer custos para a paciente.

Também será realizado um exame chamado Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência (P-300), que emite sons que serão identificados pelo cérebro do paciente, o que não acarreta riscos.

Outro exame que será realizado é uma tomografia encefálica por emissão de pósitrons, capaz de determinar as áreas do cérebro com funcionamento anormal. Através desta técnica, há exposição à radiação, mas numa dose baixa e que não acarreta riscos à saúde. Não haverá administração de contraste iodado na grande maioria dos casos. Entretanto, caso o médico nuclear ou radiologista identifique a necessidade de utilização de contraste, o

mesmo somente será administrado após aplicação de questionário para avaliação do risco de sua utilização e mediante autorização do paciente ou seu responsável.

Os pacientes que desenvolverem demência de Alzheimer ao longo do acompanhamento serão encaminhados ao ambulatório de geriatria do Instituto Jenny de Andrade Faria de Atenção à Saúde do Idoso, visando manter o seguimento clínico e a introdução da medicação anti-demência (anticolinesterásicos).

A pesquisa será suspensa caso ocorra disponibilização no mercado de tratamento eficaz para evitar a progressão de CCL para DA para que o paciente possa recebê-lo e possivelmente se beneficiar de seus resultados.

A participação nesta pesquisa é voluntária, portanto, não implica em qualquer dano material, físico ou moral, assim como também não resulta em qualquer benefício material.

As informações coletadas terão um caráter confidencial, ou seja, o nome do participante não será divulgados em nenhuma hipótese. O resultado desta pesquisa será divulgado em artigo de revista científica, sem colocar em evidência a identidade dos participantes.

O participante não terá nenhuma despesa, sendo de responsabilidade dos pesquisadores os gastos com impressão, cópias, realização de exames ou com qualquer outra eventualidade. Os gastos porventura existentes com transporte serão ressarcidos pelos pesquisadores.

Os pesquisadores ficam disponíveis a esclarecer quaisquer dúvidas, antes, durante e após o término do estudo e publicação dos resultados. Fica assegurado o direito do participante de se retirar da pesquisa a qualquer momento, sem que haja qualquer dano ou repressão, por parte dos pesquisadores.

Através deste documento fica assegurado o direito ao Sr(a) _____ que terá todos os esclarecimentos relativos à pesquisa, garantidos, incluindo os métodos utilizados. A partir do momento em que o participante da pesquisa não desejar mais fazer parte da dela, seu o direito de retirar o seu consentimento será assegurado, livre de sofrer qualquer penalidade ou danos. Se no transcorrer da pesquisa tiver alguma dúvida, ou por qualquer outro motivo necessitar de orientações, poderá procurar um dos pesquisadores.

Caso seja necessário, você poderá entrar em contato com o COEP/UFMG, COEP/UFMG, sito à Av. Antonio Carlos 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005, CEP: 31270-901- Belo Horizonte – MG. telefax (31) 3409-4592, e-mail coep@prpq.ufmg.br, onde maiores esclarecimentos poderão ser obtidos.

Baseado neste termo, eu,

CI _____, órgão expedidor _____, familiar
(_____) ou responsável legal
por _____ autorizo sua

participação na pesquisa “COORTE PROSPECTIVA DE PACIENTES COM COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE AMNÉSICO – DETERMINAÇÃO DE FATORES DE RISCO PARA CONVERSÃO PARA DEMÊNCIA DE ALZHEIMER NO BRASIL” em acordo com as informações acima expostas.

Assinatura do familiar/responsável legal:

Nome do pesquisador responsável:

Assinatura do pesquisador:

Belo Horizonte, _____ de _____ de 20 ____.

Pesquisadores:

- 1-Maria Aparecida Camargos Bicalho – médica especialista em geriatria, preceptora da residência de geriatria do Hospital das Clínicas-UFMG e professora adjunto do Departamento de Clínica Médica na Universidade Federal de Minas Gerais. T: 31-8478-8629.
- 2-Edgar Nunes de Moraes – médico especialista em geriatria, coordenador da residência de geriatria do Hospital das Clínicas-UFMG e professor adjunto do Departamento de Clínica Médica na Universidade Federal de Minas Gerais. T: 31-9115-7141.
- 3- Luiz Armando Cunha de Marco- médico, coordenador do Laboratório de Medicina Molecular da Faculdade de medicina da UFMG. T: 34099134.
- 4-Marco Aurélio Romano Silva - médico, coordenador do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Medicina Molecular. T: 3409-9135.
- 5- Débora Marques de Miranda- médica e professora adjunta do departamento de pediatria da UFMG.T 3409-9135.
- 6- Marcelo Mamede- médico nuclear e professor do departamento de propedêutica complementar da UFMG. T: 3409-9774.
- 7-Leandro Fernandes Malloy Diniz – neuropsicólogo, coordenador do serviço de neuropsicologia do Instituto Jenny de Andrade Faria de Atenção ao Idoso e professor adjunto do departamento de psicologia da FAFICH. T: 31-8707-1986.
- 8-Denise Utsch Gonçalves – médica otorrinolaringologista, professora adjunto do Departamento de Otorrinolaringologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Tel: 31 8887-2533.
- 9- Rodrigo Nicolato – médico psiquiatra, especialista em psicogeriatrics, professor adjunto do departamento de saúde mental da Faculdade de Medicina da UFMG.
- 10-Marco Túlio Gualberto Cintra- médico especialista em geriatria, preceptor da residência de geriatria do Hospital das Clínicas-UFMG e mestrando do Programa Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da UFMG. Tel: 31 9636-6108
- 11-Jonas Jardim de Paula – neuropsicólogo e mestrando pelo Programa de Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Tel: 31-9990-2760
- 12-Lafaiete Moreira dos Santos – neuropsicólogo e mestrando pelo Programa de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG. Tel: 31-8839-1480
- 13-Fabiana Carla Matos da Cunha Cintra – terapeuta ocupacional e gerontóloga. Tel: 31-9919-2793.
- 14- Luciana Cristina Matos da Cunha – fonoaudióloga e mestre pelo Programa de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG. Tel: 31-9306-6806
- 15- Fernanda Monteiro de Castro Carvalho- médica radiologista e mestranda pelo Programa de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG. T: 8777-3458.
- 16-Flávia Lanna de Moraes- médica geriatra e mestranda pelo Programa de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG. T: 9115-7142.
- 17-Fausto Aloísio Pimenta- médico geriatra e professor de clínica médica da Faculdade de Medicina da UFOP. T: 3559-1018

Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG):

Av. Antonio Carlos 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005, CEP: 31270-901- Belo Horizonte – MG. telefax (31) 3409-4592, e-mail coep@prpq.ufmg.br

Anexo 4 – Parecer do Conselho de ética em Pesquisa (COEP)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE - 0318.0.203.000-11

Interessado(a): Profa. Maria Aparecida Camargos Bicalho
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 03 de agosto de 2011, o projeto de pesquisa intitulado "Coorte prospectiva de pacientes com comprometimento cognitivo leve amnésico- determinação de fatores de risco para demência de Alzheimer no Brasil" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG