



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

António José dos Santos Gabriel

AVALIAÇÃO DO SISTEMA
COLINÉRGICO NA DOENÇA DE
ALZHEIMER

Tese de doutoramento em Biociências, área de especialização em Biologia Celular e Molecular, orientada pela Doutora Inês Esteves Baldeiras, pelo Professor Doutor António Joaquim de Matos Moreno e pela Doutora Maria do Rosário Pires Maia Neves de Almeida e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Agosto de 2019

António José dos Santos Gabriel

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA COLINÉRGICO
NA
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Tese de doutoramento em Biociências, área de especialização em Biologia Celular e Molecular, orientada pela Doutora Inês Esteves Baldeiras, pelo Professor Doutor António Joaquim de Matos Moreno e pela Doutora Maria do Rosário Pires Maia Neves de Almeida e apresentada ao Departamento das Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

agosto de 2019

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Dedicatória

Este trabalho de tese é dedicado à Manéla, minha companheira de vida, durante mais de quatro décadas e que sempre me compreendeu e ajudou a fazer o meu percurso.

i

Para ti fica o reconhecimento pela tua imprescindível compreensão e ajuda no que tem sido o meu percurso académico e profissional, e a dedicação deste trabalho, com um reconhecido beijo.

Pensamento

Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida!

iii

*E mesmo quando alguns desses desafios parecem intransponíveis, há sempre alguém
que nos ajuda a vencê-los!*

Sócrates

AGRADECIMENTOS

Neste momento de conclusão deste árduo trabalho e de mais uma etapa da minha vida, cabe-me manifestar algumas palavras que gostaria que expressassem o meu sentimento de gratidão.

Em primeiro aos meus orientadores a Doutora Inês Baldeiras e a Doutora Rosário Almeida, sem cuja paciência, apoio e também incentivo, não teria sido possível atingir esta fase. Neste agradecimento quero, também, incluir todos os elementos do laboratório de Neuroquímica, não quero deixar de registar os nomes da Helena Ribeiro, Rui Pascoal e Maria João Leitão, amigos de longa data, e do laboratório de Neurogenética, Ana Cristina Pinheiro, Marta Ribeiro onde realizei o trabalho experimental e que me ajudaram, compensando as minhas dificuldades de tempo, na sua realização.

v

Uma palavra de agradecimento para o meu orientador do Departamento de Ciências da Vida, o Professor Doutor António Moreno, por quem, desde a minha frequência da licenciatura em Biologia, nutro muita consideração, estima e amizade.

O reconhecimento ao ex-Diretor do Serviço de Neurologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Professor Doutor Luís Cunha, pela abertura e permissão para o desenvolvimento do trabalho no seu serviço e à atual Diretora, Professora Doutora Isabel Santana, que deu continuidade a essa permissão e que prestou toda a colaboração que foi sendo necessária na obtenção de dados que permitiram a prossecução deste trabalho de tese.

Para a Professora Doutora Catarina Resende de Oliveira, cujo apoio vem desde o tempo da realização do mestrado, vai a manifestação da imensa consideração e amizade.

Para a minha Amiga Teresa Proença, que foi a grande responsável da minha caminhada para além da licenciatura, fica a manifestação da minha recíproca amizade. Uma palavra de amizade para a Zé Morais com quem partilhei momentos da minha caminhada no trabalho nos HUC, mas também na ESTeSC.

Para a Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, pela qual decidi dar o passo de realização deste doutoramento, quero manifestar a minha gratidão pela permissão de utilização de tempo e algum apoio na sua concretização. Neste reconhecimento envolvo os meus colegas do departamento de Ciências Biomédicas Laboratoriais e os alunos da sua licenciatura, a razão primeira da minha decisão em me envolver na frequência deste doutoramento. Mas entre os meus colegas da Escola, não posso esquecer e agradecer o apoio do meu colega e amigo Armando Caseiro, pela prestabilidade e ajuda que sempre demonstrou. A Nádía que, quando senti necessidade, manifestou o seu apoio e respeito mútuo de uma relação da colega e amiga que vi crescer. A Ana Valado, pelo paralelismo do percurso profissional e académico e com quem partilhei alguns momentos de dificuldade, mas também de satisfação pelo dever cumprido. Mas, o principal apoio constante que senti, ao longo desta caminhada, veio do meu colega e amigo João Paulo Figueiredo na ajuda na realização da análise estatística, mas também, e sobretudo, no permanente incentivo e encorajamento, quando nem tudo corria da maneira mais favorável, obrigado JP.

vi Ao meu primeiro local de trabalho, o Serviço de Patologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra, onde desde 1971 até 2002, tive a oportunidade de, na nobre missão de prestador de cuidados de saúde, conhecer muitas pessoas que me ajudaram a crescer como ser humano realçando valores, a todos manifesto a minha gratidão.

Uma palavra para os meus amigos do Folclore, nomeadamente da Direção da Federação do Folclore Português, mas principalmente do Grupo Folclórico e Etnográfico de Arzila, de que orgulhosamente faço parte e com quem partilho, há quatro décadas, momentos de vivência ímpares e enriquecedoras.

Por último para a minha família, aos meus pais em primeiro por, numa época de muitas dificuldades, em que estudar era uma “miragem”, só atingível para muitos poucos, terem tido a coragem e o esforço de me terem colocado a estudar, enquanto a maioria dos meus colegas de então, com 11-12 anos, começaram a trabalhar e aprender os mais diversos ofícios.

Para as minhas filhas Tânia, Marta e genros Arménio e Ricardo e principalmente para a minha neta Maria, quero manifestar o meu agradecimento por todo o apoio e compreensão.

Mas principalmente para a minha companheira de vida, a Manéla, minha esposa que soube compreender a minha forma de estar na vida, que nunca me criou dificuldades, nem contrariedades, mesmo quando era seu direito poder fazê-lo, quero reconhecer que, sem essa companhia, não teria sido possível essa caminhada. Obrigado Manéla!

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	v
ÍNDICE TABELAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xvii
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxiii
PUBLICAÇÕES	xxv
1. Introdução	1
1.1 AS DEMÊNCIAS – DESAFIO SOCIETAL	1
1.2 PRINCIPAIS CAUSAS DE DEMÊNCIA	4
1.3 DOENÇA DE ALZHEIMER	6
1.3.1 Breve resenha histórica	6
1.3.2 Epidemiologia	7
1.3.3 Fatores de risco	8
1.3.3.1 Fatores de risco genético	9
1.3.4 Genética da DA	12
1.3.5 Fisiopatologia	14
1.3.5.1 Peptídeo β -amiloide	16
1.3.5.2 Proteína Tau	22
1.3.5.3 Hipótese da cascata amiloide	26
1.3.5.4 Outras hipóteses:	28
1.3.5.4.1 Mitocôndria/Stress oxidativo	28
1.3.5.4.2 Inflamação	29
1.3.5.4.3 Colinérgica	30
1.3.6 Caraterísticas e curso clínico	32
1.3.6.1 Defeito Cognitivo Ligeiro	32
1.3.6.2 Diagnóstico de DA	34
1.3.6.2.1 Biomarcadores na DA	34
1.3.6.2.2 Evolução dos critérios de diagnóstico de DA	40
1.3.7 Terapêutica	43
1.4. O SISTEMA COLINÉRGICO	50
1.4.1 Acetilcolina	51
1.4.2 Colinesterases	54
1.4.2.1 Acetilcolinesterase	54
1.4.2.2 Butirilcolinesterase	55
1.4.3 Disfunção colinérgica na DA	56
1.5 OBJETIVOS	59
1.5.1 Objetivos gerais	59

1.5.2	Objetivos específicos.....	59
2.	Material e Métodos.....	61
2.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	61
2.2	COLHEITA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	63
2.2.1	Determinação do perfil de biomarcadores no LCR	64
2.2.2	Determinação da atividade das colinesterases no LCR	68
2.2.2.1	Determinação da atividade da AChE.....	69
2.2.2.2	Determinação da atividade da BuChE.....	69
2.2.3	Análise molecular.....	70
2.2.3.1	Genotipagem da ApoE	70
2.2.3.2	Determinação da variante K da BuChE (rs 1803274)	71
2.2.3.2.1	Purificação dos produtos de PCR.....	72
2.2.3.2.2	Reação de sequenciação	72
2.2.3.2.3	Purificação dos produtos de sequenciação	73
2.2.3.2.4	Eletroforese capilar.....	73
2.2.3.2.5	Análise de eletroferogramas	74
2.2.3.3	Determinação do polimorfismo rs 2571598 da AChE	74
2.3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	75
3.	Resultados	78
3.1	ANÁLISE DA BUTIRILCOLINESTERASE.....	78
3.1.1	Caraterização da amostra.....	78
3.1.2	Determinação da variante K da butirilcolinesterase	81
3.1.3.	Associação entre o alelo ApoE-ε4 e a BuChE K.....	83
3.1.4	Atividade da BuChE.....	84
3.1.5	Associação entre a atividade da BuChE, biomarcadores, variante K e genótipo ApoE.....	86
3.1.6	Efeitos da BuChE no funcionamento cognitivo global	91
3.2	EFEITO DA BUTIRILCOLINESTERASE NA CONVERSÃO DE DCL PARA DA.....	92
3.2.1	Caraterização da amostra estudada.....	92
3.2.2	Determinação da variante K da butirilcolinesterase nos indivíduos com DCL..	93
3.2.3	Associação dos alelos ApoE-ε4 e BuChE-K com a deterioração cognitiva e a progressão para DA	95
3.2.4	Atividade da BuChE e biomarcadores do LCR nos indivíduos com DCL.....	98
3.2.5	Análise da influência do alelo ε4 da ApoE e da variante K na atividade da BuChE e nos níveis de biomarcadores do LCR	99
3.3	ANÁLISE DA ACETILCOLINESTERASE	101
3.3.1	Caraterização da amostra.....	101
3.3.2	Avaliação da AChE na DA e DFT	103
3.3.2.1	Determinação da atividade da AChE no LCR.....	103
3.3.2.2	Distribuição do polimorfismo rs 2571598 da AChE em doentes de DA ..	106
3.3.2.2.1	Polimorfismo rs 2571598 da AChE em portadores do alelo ApoE ε4	107
3.3.2.2.2	Efeito do polimorfismo rs 2571598 no funcionamento cognitivo global	108
3.3.2.3	Atividade da AChE e biomarcadores em função do polimorfismo rs 2571598 da AChE	108
3.3.3	Efeito da atividade da AChE na conversão de DCL para DA.....	109
4.	Discussão.....	112

4.1 BUTIRILCOLINESTERASE NA DA	113
4.2 BUTIRILCOLINESTERASE NA CONVERSÃO DE DCL PARA DA.....	122
4.3 ACETILCOLINESTERASE.....	128
4.3.1 Acetilcolinesterase na DA.....	128
4.3.2 Acetilcolinesterase na conversão de DCL para DA	131
5. Conclusões	133
5.1 CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	133
6. Referências.....	135

ÍNDICE TABELAS

Tabela 1.1 – Inibidores das colinesterases em uso para o tratamento da DA, estrutura química, posologia e alvo terapêutico.....	44
Tabela 2.1 – Especificidades de cada um dos ensaios dos biomarcadores (A β 42; Tau e p-Tau), incluindo volume de amostra e de padrões, suas concentrações, tempos e temperaturas de incubações e condições de validação do ensaio.....	67
Tabela 2.2 – Reagentes utilizados na reação de sequenciação.....	72
Tabela 3.1 – Características da população estudada.....	78
Tabela 3.2 – Distribuição dos vários genótipos da ApoE, em doentes de DA, DFT e controlos	79
Tabela 3.3 – Distribuição da frequência alélica da ApoE.....	80
Tabela 3.4 – Distribuição do genótipo da butirilcolinesterase, em função do diagnóstico.....	81
Tabela 3.5 – Distribuição do genótipo da BuChE dentro de cada grupo de estudo em função do género.....	82
Tabela 3.6 – Distribuição do genótipo da BuChE dos doentes de DA em função da idade de início da doença.....	82
Tabela 3.7 – Distribuição do genótipo da variante K da BuChE, em doentes de DA, de DFT e controlos em função de serem ou não portadores do alelo ϵ 4 da ApoE.....	83
Tabela 3.8 – Atividade da BuChE por grupos de diagnóstico de demências.....	84
Tabela 3.9 – Determinação dos níveis de A β 42, Tau e p-Tau em DA e DFT.....	86
Tabela 3.10 – Atividade da BuChE e níveis de A β 42, t-Tau e p-Tau, no LCR, em função da presença do alelo da variante K da BuChE, em doentes de DA e de DFT.....	87
Tabela 3.11 – Atividade da BuChE e níveis de A β 42, Tau e p-Tau em doentes de DA portadores e não portadores do alelo ϵ 4 da ApoE.....	88
Tabela 3.12 – Níveis de A β 42, Tau e p-Tau, em doentes de DA, em função da atividade da BuChE.....	89
Tabela 3.13 – Níveis de A β 42, Tau e p-Tau em doentes de DA portadores e não portadores do alelo ϵ 4 da ApoE, em função da atividade da BuChE.....	89
Tabela 3.14 – Níveis de A β 42, Tau e p-Tau, em doentes de DFT, em função da atividade da BuChE.....	90
Tabela 3.15 – <i>Mini Mental State Examination</i> (MMSE) em doentes de DA, em função da variante K da BuChE.....	91
Tabela 3.16 – Características da população de DCL.....	92
Tabela 3.17 – Distribuição do genótipo da BuChE na população de DCL.....	94

Tabela 3.18 – Distribuição do Genótipo da Butirilcolinesterase de acordo com a presença do alelo $\epsilon 4$ da ApoE em doentes com DCL.....	94
Tabela 3.19 – MMSE em doentes com DCL	95
Tabela 3.20 – Modelo de regressão logística binária de preditores de conversão para DA	96
Tabela 3.21 – Níveis de A β 42, Tau e p-Tau e atividade da Butirilcolinesterase (BuChE) em doentes com DCL.....	98
Tabela 3.22 – Atividade da BuChE e biomarcadores (A β 42, Tau e p-Tau) no LCR nos doentes com DCL em função de serem portadores do alelo ApoE $\epsilon 4$	99
Tabela 3.23 – Atividade da BuChE e biomarcadores (A β 42, Tau e p-Tau) no LCR nos doentes com DCL em função de serem portadores ou não da variante K da BuChE.	100
Tabela 3.24 – Caracterização da amostra de doentes incluídos na avaliação da acetilcolinesterase.	102
Tabela 3.25 – Determinação da atividade da AChE no LCR, de doentes com DA e com DFT.	103
Tabela 3.26 – Atividade da AChE dos doentes de DA e de DFT de acordo com o género	104
Tabela 3.27 – Atividade da AChE entre doentes de EOAD e LOAD.....	104
Tabela 3.28 – Atividade da AChE em doentes de DA, portadores e não portadores do alelo ApoE $\epsilon 4$	105
Tabela 3.29 – Distribuição do polimorfismo rs 2571598 da AChE em doentes de DA.....	106
Tabela 3.30 – Distribuição do polimorfismo rs 2571598 da AChE em função da idade de início da DA.	107
Tabela 3.31 – Distribuição do polimorfismo rs 2571598 da AChE, em doentes de DA, em função de serem ou não portadores do alelo $\epsilon 4$ da ApoE.....	107
Tabela 3.32 – Efeito do polimorfismo rs 2571598 da AChE nos níveis de MMSE em doentes de DA.....	108
Tabela 3.33 – Atividade da AChE no LCR em função do polimorfismo <i>rs 2571598</i>	108
Tabela 3.34 – Níveis de A β 42, Tau e p-Tau no LCR em doentes de DA em função da presença do polimorfismo rs 2571598 da AChE.....	109
Tabela 3.35 – Atividade da AChE em doentes de DCL em função da conversão para DA.....	109
Tabela 3.36 – Atividade da AChE (U/L) de acordo com o género e conversão para DA.....	110
Tabela 3.37 – Atividade da AChE em doentes de DCL em função da presença do alelo ApoE $\epsilon 4$	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Prevalência (cima) e incidência (baixo) da DA na Europa nos anos 2004 a 2012. ...	8
Figura 1.2 – Diagrama esquemático das vias de processamento da APP.	18
Figura 1.3 – Esquema de formação de agregados amiloides a partir dos oligómeros.	20
Figura 1.4 – Representação esquemática de isoformas da Tau humana.	22
Figura 1.5 – Sequência de aminoácidos da proteína Tau, com potenciais locais de fosforilação, 80 Serina/Treonina (S/T) e 5 Tirosinas (Y). (Wang et al. 2013).....	24
Figura 1.6 – Ativação das Cinases, com o subsequente aumento da hiperfosforilação da Tau, com a sua agregação e desestabilização dos microtúbulos, favorecendo a formação de tranças neurofibrilares e conseqüente morte neuronal. Adaptado de Formichi et al. 2006. ...	25
Figura 1.7 – Hipótese adaptada da Cascata amiloide englobando as formas esporádicas e familiares da DA. (Blennow et al. 2015).	27
Figura 1.8 – Modelo hipotético de dinâmica dos biomarcadores entre envelhecimento normal, DCL e Demência. (Jack et al. 2010).	38
Figura 1.9 – Ensaios clínicos em curso em 2017 com utilização de agentes modificadores de DA.	49
Figura 1.10 – Representação esquemática da inervação colinérgica central humana.	50
Figura 1.11 – Esquema de síntese da acetilcolina, libertação para a fenda sinática e recaptação para a célula pré-sinática.	53
Figura 2.1 – Esquema da reação de deteção do peptídeo A β 42.	64
Figura 2.2 – Esquema da reação de deteção de t-Tau.	65
Figura 2.3 – Esquema da reação de deteção da p-Tau.	66
Figura 2.4 – Esquema da reação de Ellman catalisada pela Butirilcolinesterase (BuChE) e Acetilcolinesterase (AChE).....	68
Figura 3.1 – Atividade da BuChE (U/L), nos doentes de Doença de Alzheimer (DA) e Demência Fronto Temporal (DFT).	84
Figura 3.2 – Percentagem de doentes de DCL que progrediram para DA durante o período de seguimento clínico de acordo com os genótipos da ApoE e BuChE.	96
Figura 3.3 – Curvas de sobrevivência de Kaplan – Meier para a probabilidade de progressão para DA em doentes com DCL.	97

ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ACh – Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
ADAS-Cog – *Alzheimer's Disease Assessment Scale – Cognitive Subscale*
AIBL - *Australian Imaging, Biomarker and Lifestyle Study of Age*
APNF - Afasia Progressiva não Fluente
ApoE-ε4 - Apolipoproteína E alelo ε4
APP - *Amyloid Precursor Protein*
Aβ - Peptídeo β Amiloide
Aβ40 - Peptídeo β Amiloide de 40 aminoácidos
Aβ42 - Peptídeo β Amiloide de 42 aminoácidos
BuChE – Butirilcolinesterase
BuChE-K - Butirilcolinesterase variante K
CDR – *Clinical Dementia Rating*
ChAT - Colina Acetil Transferase
ChE – Colinesterases
ChEIs – *Cholinesterase Inhibitors*
CJD - *Creutzfeldt-Jakob Disease*
DA - Doença de Alzheimer
DCL - Defeito Cognitivo Ligeiro
DCL-A - Defeito Cognitivo Ligeiro Amnésico
DCL-DA - Defeito Cognitivo Ligeiro que progrediram para Doença de Alzheimer
DCL-Est - Defeito Cognitivo Ligeiro que não progrediram para DA, durante o período de acompanhamento
DCLewy - Demência de Corpos de Lewy
DCL-NA - Defeito Cognitivo Ligeiro Não Amnésico
DFT - Demência Fronto Temporal
DIAN - *Dominantly Inherited Alzheimer Network*

DLFT - Degenerescência Lobar Frontotemporal
DLFTvc - Degenerescência Lobar Frontotemporal variante comportamental
DLFTvt - Degenerescência lobar Frontotemporal variante afásica/temporal
DMSO – Dimetilssulfóxido
DNA - *Deoxyribonucleic Acid*
DS – Demência Semântica
DTNB - *5,5'-dithio bis (2-nitrobenzoic)*
DV – Demência Vascular
EOAD - *Early Onset Alzheimer Disease*
EUA - Estados Unidos da América
FDG-PET – *Fluorodeoxyglucose-Positron Emission Tomography*
GABA - *Gamma Aminobutyric Acid*
GWAS - *Genome-Wide Association Study*
HUC-CHUC - Hospitais da Universidade de Coimbra – Centro Hospitalar e
Universitário de Coimbra
ICD-10 - *International Classification of Diseases*
IGAP - *International Genomics of Alzheimer's Project*
IWG - *International Work Group*
K₃EDTA - Etileno Diamino Tetra Acético tri Potássico
LCR - Líquido Cefalorraquídeo
LOAD - *Late Onset Alzheimer Disease*
LTP - *Long Term Potentiation*
MAPs - *Microtubules Associated Proteins*
MAPT – *Microtubule Associated Protein Tau*
MMSE - *Minimental State Evaluation*
MoCA – *Montreal Cognitive Assessment*
MRI - *Magnetic Resonance Imaging*
NCGG - *Japanese National Center for Geriatrics and Geron*
NIA/AA - *National Institute on Aging/Alzheimer's Association*
NINCDS-ADRDA - *National Institute of Neurological and Comunicative Disorders
and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*
NMDA - N-metil D-Aspartato
PCR - *Polimerase Chain Reaction*
PET - *Positron Emission Tomography*

PIB - *Pittsburgh Compound B*

PSEN1 - Presenilina 1

PSEN2 - Presenilina 2

PSP - Paralisia Supranuclear Progressiva

p-Tau - Proteína Tau fosforilada

RNA - *Ribonucleic Acid*

ROS – *Reactive Oxygen Species*

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

TBE - Tampão Tris-Borato EDTA

TNFs - Tranças Neurofibrilares

TREM2 - *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2*

t-Tau - Proteína Tau total

VACHT - *Vesicular Acetylcholine Transporter*

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença multifatorial, progressiva caracterizada histologicamente pela presença de agregados de peptído A β e proteína tau hiperfosforilada. Várias hipóteses têm sido avançadas como explicativas para o desenvolvimento da DA, sendo a da cascata amiloide a mais defendida. Mas foi a hipótese colinérgica a primeira a ser apresentada, defendendo que a depleção de acetilcolina a nível cerebral, observável em doentes de DA é a causa primária do declínio cognitivo nestes doentes, levando a que a terapêutica usada tem sido a de utilização de inibidores das colinesterases, como aumento da biodisponibilidade da acetilcolina.

Dada a constatação do défice do sistema colinérgico na DA, foi objetivo deste trabalho estudar o papel das colinesterases nesta doença. Para tal, estudámos uma amostra constituída por 217 doentes de DA, 70 com Demência Fronto Temporal (DFT) e 200 controlos. Para avaliar um estadio mais precoce de DA, estudámos também 96 com Defeito Cognitivo Ligeiro (DCL), subdivididos entre doentes que progrediram para DA (DCL-DA), e os que se mantiveram cognitivamente estáveis durante o período de seguimento (DCL-Est). Nesta população fomos avaliar a atividade das duas colinesterases, Acetilcolinesterase (AChE) e Butirilcolinesterase (BuChE), bem como estudar dois polimorfismos específicos localizados nos genes que codificam estas enzimas, BuChE (rs1803274, conhecida como variante K) e AChE (rs2571598). Além disso, avaliámos também o genótipo da ApoE e os níveis de A β 42, Tau e p-Tau, no LCR, biomarcadores bem estabelecidos na DA.

Dos resultados obtidos verificou-se a inexistência de diferenças da distribuição da variante K da BuChE entre DA, DFT e controlo, o que sugere que esta variante por si só, não confere risco para a DA na população estudada. Quanto à presença do alelo ϵ 4 da ApoE apresentou-se como expectável, significativamente mais elevado nos doentes com DA, relativamente aos de DFT e aos controlos. Os resultados parecem evidenciar uma tendência para um efeito de sinergia entre os portadores da variante K da BuChE e do

alelo $\epsilon 4$ da ApoE, nos doentes de DA. No LCR, não encontramos diferenças na atividade da BuChE entre DA e DFT, já os níveis de A β 42 se encontravam diminuídos e os de Tau e p-Tau aumentados na DA, de acordo com o perfil esperado. Também observámos que a presença da variante K não influenciou a atividade da enzima na DA, ao contrário do observado para o grupo de DFT, em que a presença da variante leva a uma redução da atividade enzimática. Nos doentes de DA observámos uma correlação entre a atividade da BuChE no LCR e os níveis do peptídeo A β 42.

Relativamente ao estudo da BuChE no DCL, não foram encontradas diferenças na distribuição da variante K da BuChE entre DCL-DA e DCL-Est. Contudo, como já verificado na DA, observou-se um efeito de sinergia entre a variante K da BuChE e a presença do alelo $\epsilon 4$ da ApoE, que contribuiu para um aumento da incidência e redução do tempo de progressão de DCL para DA. A atividade da BuChE também não apresentou diferenças entre os dois subgrupos de DCL. No entanto, enquanto no grupo DCL-DA, a atividade da enzima não é modulada pela presença da variante K, no grupo DCL-Est, esta apresenta uma redução nos portadores da variante K. Através da análise de variância a três fatores observou-se um efeito de interação entre a variante K da BuChE e o alelo $\epsilon 4$ da ApoE nos doentes de DCL que converteram para DA, resultando numa redução dos níveis de A β 42.

xxii

O estudo da atividade da AChE não revelou diferenças entre os doentes de DA e DCL que converteram para DA, relativamente ao grupo com DFT e DCL-Est. Para todos os grupos em estudo foi observada uma correlação entre a atividade das duas colinesterases. Nos doentes de DA, tanto a presença do polimorfismo rs 2571598 da AChE, como do alelo $\epsilon 4$ da ApoE, levaram a uma tendência para o aumento da atividade da AChE.

Os nossos resultados sugerem que a determinação da variante K da BuChE, em associação com a genotipagem da ApoE, deverá ser incluída na avaliação de risco de progressão para DA em doentes com DCL.

Palavras chave: Doença de Alzheimer; Acetilcolinesterase; Butirilcolinesterase; Apolipoproteína E; β -amiloide; Líquido Cefalorraquídeo; progressão da doença; defeito cognitivo ligeiro

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is a progressive, multifactorial disease characterized histologically by the presence of A β peptide aggregates and hyperphosphorylated tau protein. Several hypotheses have been put forward to explain AD development, with amyloid cascade hypothesis being the most accepted. However, it was the cholinergic hypothesis the first one to be presented, arguing that cerebral depletion of acetylcholine observed in AD patients was the primary cause of their cognitive decline, leading to therapeutic use of cholinesterases inhibitors to increase the bioavailability of acetylcholine.

Given the cholinergic system deficit in AD, the main aim of this thesis was to study the role of two cholinesterases in the disease. To achieve this purpose, we studied a sample set of 217 AD patients, 70 Frontotemporal dementia (FTD) and 200 controls. In order to evaluate earlier stages of AD, we also studied 96 patients with Mild Cognitive Impairment (MCI), subdivided into patients who progressed to AD (MCI-AD), and those who remained cognitively stable during follow-up (MCI-St). In this population we evaluated the activity of two cholinesterases, Acetylcholinesterase (AChE) and Butyrylcholinesterase (BuChE), as well as studied two specific polymorphisms located in their encoding genes, BuChE (rs1803274, so-called K variant) and AChE (rs2571598). In addition, we also evaluated the ApoE genotype and CSF levels of A β 42, Tau and p-Tau, well-established CSF AD biomarkers.

Our results showed no difference in the distribution of BuChE K variant between AD, FTD and controls, suggesting that this variant alone does not confer risk for AD in the studied population. Regarding the presence of ApoE ϵ 4 allele, as expected, it was significantly higher in AD patients than in FTD and control groups. In addition, the results showed a tendency for a synergistic effect between carriers of BuChE variant and ApoE ϵ 4 allele in AD patients. In CSF, we found no differences in BuChE activity between AD and FTD, while the levels of A β 42 were decrease and Tau and p-Tau increased in AD

patients, in line with the typical AD CSF biomarker profile. We also observed that the presence of K variant did not influence the BuChE activity in AD, in contrast to the observed in FTD group, where the presence of this variant lead to a reduction in enzyme activity. In AD patients a correlation between CSF BuChE activity and A β 42 peptide levels was also observed.

Concerning the study of BuChE in MCI patients, no differences were found in the distribution of BuChE K variant between MCI-AD and MCI-St. However, as already seen in AD, a synergistic effect was observed between BuChE K variant and the presence of ApoE ϵ 4 allele, which contribusubgroupsted to an increased AD incidence and to a significant reduction in time to AD conversion in MCI patients. Alzo, no differences on BuChE activity between the two DCL were observed. However, while in the MCI-AD group, the activity of the enzyme was not modulated by the presence of the BuChE K variant, in the MCI-St group, a reduction of the activity was seen in the BuChE K variant carriers. Results of the analysis of variance (three-way ANOVA) showed an interaction between BuChE K variant and ApoE- ϵ 4 allele in MCI patients that progressed to AD, leading to a reduction in A β levels.

xxiv

The study of AChE activity revealed no differences between AD and MCI patients who converted to AD compared to the FTD and MCI-St groups. For all groups a correlation was observed between the activity of the two cholinesterases. In AD patients, both the presence of AChE rs 2571598 polymorphism and ApoE ϵ 4 allele showed a tendency to increase AChE activity.

Our results suggest that the assessment of the BuChE K variant in combination with ApoE genotyping should be included in the in the evaluation of the risk of progression from MCI to AD.

Keywords: Alzheimer's disease; Acetylcholinesterase; Butyrylcholinesterase; Apolipoproteina E; Amyloid β ; Cerebrospinal fluid; disease progression; mild cognitive impairment

s

PUBLICAÇÕES

Parte do trabalho apresentado na tese já foi publicado em revistas de circulação internacional com arbitragem científica ou em encontros científicos de grupos de estudos de demências.

Artigos científicos

xxv

Gabriel, A. J., M. R. Almeida, et al. (2017). "Association between butyrylcholinesterase and cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease patients." Neuroscience Letters **641**: 101-106.

Gabriel, A. J., M. R. Almeida, et al. (2018). "Influence of Butyrylcholinesterase in Progression of Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's Disease." Journal of Alzheimers Disease **61**(3): 1097-1105.

Comunicações orais

António Gabriel; Ana Cristina Pinheiro; Helena Ribeiro; Isabel Santana; Maria Rosário Almeida; Inês Baldeiras “*Variante K da Butirilcolinesterase na doença de Alzheimer*”, sob a forma de comunicação oral, apresentada na 27ª Reunião do Grupo de Estudos de Envelhecimento Cerebral e Demência, em Coimbra, nos dias 28 e 29 de junho de 2013.

António José Gabriel, Maria Rosário Almeida, Maria Helena Ribeiro, Diogo Carneiro, Daniela Valério, Ana Cristina Pinheiro, Rui Pascoal, Isabel Santana, Inês Baldeiras “*Progressão do Défice Cognitivo Ligeiro para a Doença de Alzheimer: Efeito da Butirilcolinesterase*”, sob a forma de Comunicação oral, 31^a Reunião do Grupo de Estudos de Envelhecimento Cerebral e Demências, em Lisboa, nos dias 30 de junho e 1 de julho de 2017.

1. – Introdução

1.1 AS DEMÊNCIAS – DESAFIO SOCIETAL

A melhoria dos cuidados de saúde teve um forte impacto no aumento da esperança média de vida, o que conjugado com a diminuição da taxa de natalidade, tem levado a um acentuado envelhecimento sócio demográfico da população. Na população portuguesa este aspeto é acentuado por fatores de emigração, seja pela saída do escalão etário intermédio, mas também, pela redução do seu contributo para a natalidade (Bandeira et al. 2014). Esta alteração de distribuição etária da população tem um grande impacto socioeconómico, quer pelas implicações de carácter assistencial, como pelos problemas de saúde associados ao envelhecimento (Nicol 2017).

Apesar das melhorias das condições assistenciais a que vimos assistindo, tem-se verificado uma desorganização da estrutura familiar e de diminuição das tarefas atribuídas aos mais idosos, com os consequentes efeitos de desintegração social, com reflexos negativos na sua integração e saúde (Ertel et al. 2008).

As patologias mais prevalentes nos idosos são sobretudo de cronicidade, implicando a recorrente utilização dos cuidados de saúde, seja em hospitais ou noutros serviços, com consequentes elevados custos económicos (Fage et al. 2015; Tanajewski et al. 2015). A proximidade do cuidador ao doente (Delfino et al. 2017), que são em geral familiares próximos (Kang et al. 2017), ou profissionais de saúde de instituições assistenciais, pode constituir também um importante problema social (Rodriguez-Perez et al. 2017), pela irreversibilidade e cronicidade das patologias dos seus assistidos (Kamenov et al. 2016; Vallee et al. 2017).

De notar que, estes indivíduos manifestam ansiedade, agitação, agressividade e irritabilidade, com implicações em todo o contexto familiar, mas sobretudo nos seus cuidadores (Sadak et al. 2014).

Muitas patologias afetam a população idosa seja por condicionantes genéticas, mas principalmente, decorrentes do estilo de vida. Entre as patologias mais prevalentes no idoso, constam os estados depressivos (Cherbuin et al. 2015), fruto de isolamento, a que são sujeitos e a demência (Rafnsson et al. 2017), a qual assume papel relevante, dado que a sua ocorrência se relaciona de forma direta com a idade, prevendo-se um significativo aumento da sua incidência nas próximas décadas (Li et al. 2015).

A demência é uma síndrome em que se encontram comprometidas várias funções cognitivas (intelectuais) ou executivas. De acordo com o *Diagnostic and Statistical Manual* 4ª edição (DSM IV), existe demência quando ocorre um défice de memória e, pelo menos, uma das seguintes perturbações cognitivas: afasia, apraxia, agnosia ou perturbação das funções executivas (American Psychiatric Association. et al. 1994). Este défice tem de ser suficientemente grave para que comprometa o desempenho satisfatório das tarefas sociais e/ou profissionais. É também importante que o doente apresente um declínio em relação a um nível prévio de funcionamento (WHO 1994). A demência é comum a um grupo heterogéneo de patologias que afetam sobretudo os mais idosos. O carácter progressivo destas patologias associadas a um declínio cognitivo têm também um forte impacto social (Davis et al. 2015) e consequentes elevados custos económicos (Turro-Garriga et al. 2015).

2

Dado o carácter heterogéneo da demência, o seu correto diagnóstico exige uma equipa clínica especializada. Tal como noutras patologias, a precocidade no seu diagnóstico constitui uma vantagem na prestação de cuidados clínicos ao doente, com reflexos na diminuição dos custos económicos, eficácia no seu tratamento e também, no apoio e preparação atempada dos seus cuidadores (Fage et al. 2015).

A diversidade de formas que compõem os quadros demenciais tem sido uma preocupação de clínicos e equipas de saúde, levando ao desenvolvimento de trabalhos de investigação, nestas patologias, mas também à clarificação de instrumentos e meios de diagnóstico e tratamento das mesmas (Bennett et al. 2018). Têm sido também elaboradas normas e manuais procurando a melhoria da identificação destas patologias, pelos prestadores de cuidados de saúde, nomeadamente médicos, numa fase precoce destas doenças,

potenciando um tratamento ajustado ou um adequado encaminhamento em termos de serviços de saúde (Santana et al. 2005), dado o importante papel que os profissionais de saúde têm na prestação de cuidados a estes doentes (de Witt et al. 2016).

Também em Portugal, têm sido diversos os estudos efetuados no sentido de clarificar os aspetos mais relevantes da diversidade de patologias que constituem o conjunto das demências que afetam a população portuguesa (Castro-Caldas et al. 2005).

Apesar dos elevados índices de envelhecimento no nosso País, onde se estima existirem 160 mil pessoas com demência (Santana et al. 2015), não existe em Portugal um Plano Nacional para as Demências, ao contrário do que se verifica em vários países da Europa, resultando numa inexistência de respostas especializadas (DGS 2013). A elaboração de um projeto deste tipo reveste-se da maior importância no sentido de melhorar e valorizar o ato de cuidar, contribuindo para uma melhoria da qualidade de vida dos doentes e para uma promoção dos seus direitos contribuindo para a formação de uma sociedade mais inclusiva, que integre e respeite as pessoas com demência.

1.2 PRINCIPAIS CAUSAS DE DEMÊNCIA

A demência pode ter múltiplas causas, algumas tratáveis ou reversíveis (como infecções, hemorragia subaracnoídea, tumor cerebral, exposição a tóxicos, deficiências vitamínicas, alcoolismo crônico, entre outras), ou degenerativas e portanto irreversíveis.

As principais causas de demência degenerativa são a doença de Alzheimer (DA), a Demência Vascular, a Degenerescência Lobar Frontotemporal (DLFT) e a Demência com Corpos de Lewy (DCLewy). Existem outras doenças neurodegenerativas como é o caso da Doença de Huntington, Doença de Creutzfeldt-Jakob e Doença de Parkinson em que os doentes também podem desenvolver demência durante o curso da doença. Também um número significativo de doentes com Síndrome de Down, desenvolve demência entre os 40-50 anos de idade (Ballard et al. 2016).

A doença de Alzheimer é responsável por mais de 60% de todos os quadros demenciais conhecidos (Assoc 2015) estando descrita, pormenorizadamente, na secção 1.3.

4

Enquanto o quadro clínico clássico da DA é dominado pela alteração da memória recente ou episódica, sendo a progressão da doença gradual e, às vezes subtil, na Demência Vascular o curso pode ser mais abrupto, sendo frequentemente caracterizado por episódios súbitos de deterioração vascular com manifestações micro isquémicas, ou hemorrágicas que conduzem a demência (Vinters et al. 2018). Na Demência com Corpos de Lewy, o curso da doença pode ser pautado por episódios confusionais, alucinações ou delusões visuais, flutuações cognitivas, psicose e estabelecimento de manifestações parkinsónicas (Haider et al. 2018).

A Degenerescência Lobar Frontotemporal é uma das principais causas de demência precoce, sendo considerada por alguns autores como a segunda causa mais prevalente de demência. Esta entidade clínica engloba o que foi durante muito tempo designado como doença de Pick (Irwin et al. 2016). Atualmente, o diagnóstico de DLFT é efetuado segundo os critérios definidos pelo *Lund and Manchester Groups* e revistos pelo *Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease* (McKhann et al. 2001).

A DLFT tem início habitualmente durante a 3ª e 4ª décadas de vida (Le Ber et al. 2007), e é caracterizada por alterações de personalidade, de comportamento e/ou linguagem, e também, em estádios mais avançados, por uma deterioração progressiva da cognição (Doval et al. 2000; Caminiti et al. 2015).

Embora as alterações de comportamento sejam uma característica comum a vários tipos de demências, na DLFT os sintomas de depressão, ansiedade, irritabilidade, instabilidade de humor, desinibição, apatia, bem como o isolamento social são mais comuns.

A DLFT é caracterizada pela degenerescência seletiva dos lobos frontais e temporais, podendo as manifestações sistematizar-se em duas variantes clínicas major: a variante frontal do comportamento (DLFTvc), caracterizada por alterações da personalidade/comportamento e disfunção executiva, com perda de consciência da integração social e pouco controlo de impulsos; a variante afásica/temporal (DLFTvt), subdividida em Afasia Progressiva não Fluente (APNF), na qual os doentes perdem progressivamente a fluência verbal, evidenciam alterações fonéticas e fonológicas, com resultante agramatismo e incompreensão das palavras (Mesulam 1982; Mesulam 2001; Gorno-Tempini et al. 2004) e Demência Semântica (DS) com a perda do conhecimento das palavras, de objetos e de reconhecimento de números, resultando na incompreensão das palavras utilizadas, em alternância com outros momentos de discurso fluente e com utilização gramatical preservada (Hodges et al. 2007).

Em estados mais avançados da patologia, doentes com DLFT, podem evidenciar desenvolvimento de sintomas de doenças do neurónio motor e síndrome cortico basal (Kertesz et al. 2000; Lomen-Hoerth et al. 2002; Kertesz et al. 2005; Boeve 2007).

1.3 DOENÇA DE ALZHEIMER

1.3.1 Breve resenha histórica

A história desta doença teve início, a 3 de novembro de 1906, através de uma comunicação efetuada, por Alois Alzheimer, onde descreveu as alterações histológicas observadas no cérebro de Auguste D., uma mulher que, aos 49 anos de idade, evidenciava um quadro progressivo de deterioração mental, incomum. Evidenciava desorientação, mesmo dentro da sua habitação, associada a perda rápida de memória, ciúmes do marido, entre outras perturbações comportamentais (Alzheimer et al. 1995).

A partir da autópsia, foi então evidenciada uma forte atrofia cerebral e descritas as alterações histológicas atualmente consideradas como típicas da DA: as tranças neurofibrilares e as placas senis (Alzheimer et al. 1995).

Os principais componentes destes agregados histológicos viriam a ser identificados, mais tarde, como a proteína Tau e peptídeos β -amilóide, constituintes das tranças neurofibrilares e placas senis, respetivamente (Weingarten et al. 1975).

Em homenagem a este médico alemão, pelo seu pioneirismo na descrição desta forma de demência, foi atribuído o seu epónimo a esta patologia. De notar que, anteriormente à descrição do caso de Auguste D., este tipo de demência já aparecia referenciada, embora sobre outras designações, desde a antiguidade clássica (Santana 1999), mas sem clarificação das suas bases histológicas. A descrição de Alois Alzheimer constituiu assim, um marco importante na caracterização desta doença (Santana 1999).

Curiosamente, um artigo de revisão, do início deste século, reportou os cem anos que se seguiram à descrição de Alois Alzheimer, referindo que a abordagem à DA mudou de uma “curiosidade neuropatológica” para uma “prioridade de investigação” (Hardy 2006), quer pela sua elevada prevalência quer pelos seus avultados custos sociais (Wimo et al. 1997; Assoc 2015) e económicos (Meek et al. 1998; Assoc 2015).

De notar que, ao longo dos anos, mesmo a investigação da DA sofreu alterações, começando por se centrar numa perspetiva neuroquímica da patologia, seguindo-se a procura da compreensão das suas lesões patognomónicas e numa fase posterior a

identificação dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes bem como de biomarcadores de diagnóstico precoce e prognóstico da doença.

1.3.2 Epidemiologia

A doença de Alzheimer é hoje a causa mais prevalente de demência, afetando mais de 24 milhões de pessoas em todo mundo (Wimo et al. 2013), sendo a sua prevalência maior no género feminino (Barnes et al. 2005; Cornutiu 2015). Com cerca de 5,3 milhões de casos, só nos Estados Unidos da América (EUA) (Ballard et al. 2011; Assoc 2015), prevê-se o seu crescente aumento, nos próximos cinquenta anos, para cerca de quatro vezes o número de casos (Brookmeyer et al. 2011), assumindo assim proporções alarmantes e constituindo um preocupante problema de saúde pública (Ballard et al. 2011).

É estimado que em países desenvolvidos, com o incremento da esperança média de vida, em meados do século XXI, tripliquem o número de casos de DA (Bolognesi et al. 2009), prevendo-se que no ano de 2050, a incidência da DA, atinja nos EUA, o impressionante número de um milhão de novos casos em cada ano (Assoc 2015).

Este ritmo elevado de crescimento do número de casos de DA, em todo mundo, tem também, naturalmente, uma elevada incidência nos países europeus com valores de 11,08 casos por cada 1000 habitantes, por ano. A prevalência estimada para o continente europeu é de 5,05%, sendo maior no sexo feminino com valores de cerca de 7,13% (Niu et al. 2017).

Em Portugal, estima-se que a prevalência da DA entre a população com idade igual ou superior a 60 anos de idade seja de 5,91%, com um número previsível de afetados superior a 160000 portugueses. É possível contudo que exista uma situação de subdiagnóstico da doença (Santana et al. 2015).

De referir que, no nosso centro, na consulta de Demência, do serviço de Neurologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, são realizadas anualmente cerca de 1600 consultas de seguimento de doentes com DA, sendo 200 das quais novas consultas.

1.3.3 Fatores de risco

A idade é claramente o principal fator de risco para o desenvolvimento da DA (Rossor et al. 1996; Gatz et al. 2006; Chai 2007), com um aumento quer da incidência, quer da prevalência acima dos 65 anos, duplicando aproximadamente a cada 5 anos (Jorm 1990).

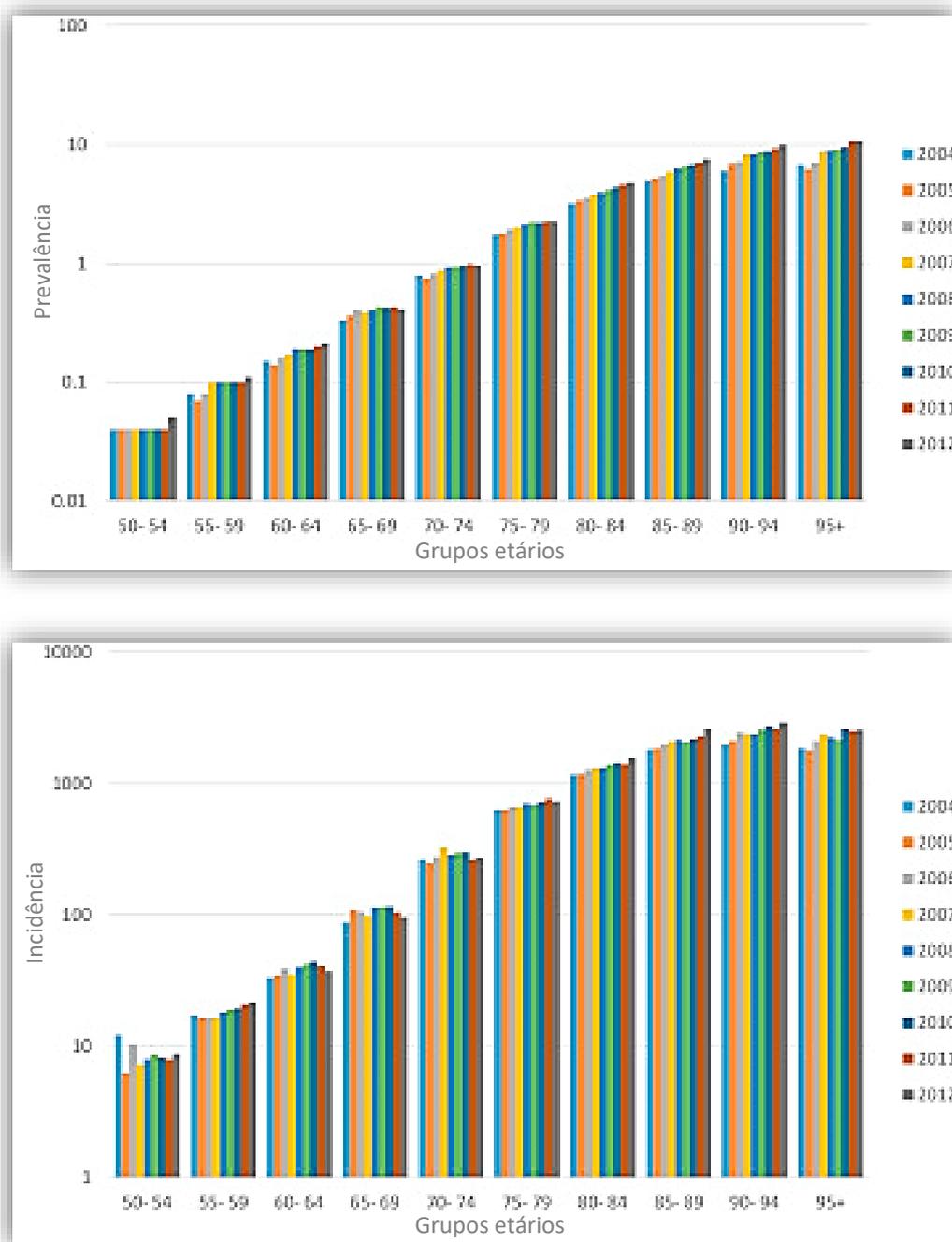


Figura 1.1 – Prevalência (cima) e incidência (baixo) da DA na Europa nos anos 2004 a 2012. Adaptado de Perera et al. 2018.

Outros fatores de risco com associação com a doença são: o género feminino, história familiar de DA, baixo nível de educação/estimulação cognitiva (e de outras variáveis culturais associadas a uma baixa reserva cognitiva), traumatismo crânio-encefálico, fatores de risco vascular e síndrome metabólica (*Diabetes Mellitus*, dislipidémia, obesidade e sedentarismo) (Ampuero et al. 2008). Poluentes ambientais (Moulton et al. 2012), tabagismo (Cataldo et al. 2010), intoxicação com alumínio, ferro, cobre ou outros metais de transição (Shcherbatykh et al. 2007), indutores da formação de espécies reativas de oxigénio e potenciadoras de *stress* oxidativo, têm sido igualmente associados ao desenvolvimento de DA. Também, estados prévios de quadros de depressões parecem favorecer o desenvolvimento posterior de demências (Barnes et al. 2012).

Alguns destes fatores de risco poderão ser modificáveis, pelo que a estimulação cognitiva, o exercício físico, a alteração de estilos de vida e hábitos alimentares (favorecendo a chamada dieta mediterrânea), têm sido apontados com potencial preventivo. De facto, foi demonstrado que a prevenção e tratamento de condições que conferem risco para DA, como seja por exemplo uma redução nos fatores de risco vascular, estará na base da recente diminuição na incidência de demência na Europa e EUA, estimando-se que uma redução relativa na prevalência destes fatores de 10% por década, possa reduzir em 8,3% a prevalência mundial da DA em 2050 (Larson et al. 2013; Norton et al. 2014).

1.3.3.1 Fatores de risco genético

O estudo realizado por Corder e colaboradores em 1993, foi o primeiro a demonstrar que a presença do alelo $\epsilon 4$ da apolipoproteína E (ApoE) aumenta o risco para a DA (Corder et al. 1993).

O gene da *ApoE* está localizado no braço longo do cromossoma 19 (19q13.2), e codifica uma glicoproteína de 317 aminoácidos, que constitui uma das classes de apolipoproteínas que transportam lípidos no plasma, tendo um papel determinante no transporte de triglicerídeos e de colesterol para os diferentes tecidos (Corder et al. 1993). A ApoE é também a principal apolipoproteína encontrada no cérebro, produzida principalmente por astrócitos (Boyles et al. 1985; Pitas et al. 1987), pela micróglia (Nakai et al. 1996) e oligodendrócitos, onde mobiliza e transporta colesterol e fosfolípidos para os locais de regeneração da mielina e das membranas neuronais (Leduc et al. 2010). Exerce ainda um

papel na reparação dos neurónios nomeadamente da sua estrutura, ligações sináptico-dendríticas e na função colinérgica (Mahley et al. 2000; Munoz et al. 2000).

Nos humanos existem três alelos principais neste gene, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$, resultantes apenas de dois polimorfismos, rs7412 e rs429358, localizados nos codões 112 e 158, respetivamente. As isoformas proteicas produzidas por estes alelos diferem na composição de aminoácidos nas posições 112 e/ou 158. O alelo $\epsilon 2$ possui o aminoácido cisteína em ambas as posições da proteína, o alelo $\epsilon 3$ codifica uma cisteína na posição 112 e uma arginina na 158, enquanto o alelo $\epsilon 4$ possui duas argininas em ambas as posições. Esta substituição cisteína-arginina afeta a estrutura tridimensional e por conseguinte as propriedades das diferentes isoformas (Bekris et al. 2010). As combinações dos três alelos dão origem a seis génotipos diferentes ApoE $\epsilon 2/\epsilon 2$, ApoE $\epsilon 3/\epsilon 3$, ApoE $\epsilon 4/\epsilon 4$, ApoE $\epsilon 2/\epsilon 3$, ApoE $\epsilon 3/\epsilon 4$, ApoE $\epsilon 2/\epsilon 4$. A frequência desses três alelos na população caucasiana em geral é de aproximadamente 8%, 78% e 14% para o ApoE $\epsilon 2$, ApoE $\epsilon 3$ e ApoE $\epsilon 4$, respetivamente (Utermann et al. 1980; Martins et al. 1995). Corbo e Scacchi (1999) analisaram a distribuição das frequências alélicas de ApoE em diferentes populações e encontraram também que o alelo $\epsilon 3$ é o mais frequente em todas as populações estudadas (variando de 48% a 89%) (Corbo et al. 1999).

10

Desde que o alelo $\epsilon 4$ do gene *ApoE* foi identificado pela primeira vez como um fator de risco genético para a DA, vários estudos envolvendo populações de diferentes regiões geográficas foram realizados, replicando de forma robusta esta associação entre a presença do alelo $\epsilon 4$ e o desenvolvimento de DA. Assim, hoje em dia, o alelo $\epsilon 4$ da *ApoE* é consensualmente aceite, tendo sido independentemente comprovado em várias populações, como o fator de risco mais comum para a DA (Fernandes et al. 1999; Baum et al. 2000). Também vários estudos demonstraram que o alelo $\epsilon 4$ da *ApoE* contribui para antecipar a idade de início da doença, exercendo um efeito dose-dependente. Num estudo que envolveu 42 famílias com doença de Alzheimer de início tardio, observou-se com o aumento do número de alelos $\epsilon 4$ que o risco para DA aumentou de 20% para 90% e a idade média de início foi reduzida de 84 para 68 anos, respetivamente (Corder et al. 1993; Strittmatter et al. 1993; Farrer et al. 1997). Um estudo realizado na região centro de Portugal identificou também uma forte associação entre ApoE $\epsilon 4$ e DA, tendo sido o alelo $\epsilon 4$ encontrado com uma frequência de 22,96% em portadores de DA, cerca de 6 vezes maior que a encontrada nos indivíduos controlo sem défice cognitivo (Fernandes et al. 1999).

Contudo, a simples presença do alelo *ApoE* $\epsilon 4$ não é condição necessária nem suficiente para causar DA uma vez que este alelo apenas aumenta o risco de o indivíduo vir a desenvolver a doença.

Além da importância que a ApoE tem na homeostase do colesterol, via presentemente reconhecida na patogênese da DA, sabe-se que também interfere diretamente na formação de placas amiloides e tranças neurofibrilares (Corder et al. 1993; Strittmatter et al. 1993; Kanekiyo et al. 2014). O alelo $\epsilon 4$ promove a formação de agregados *in vivo* e *in vitro* do peptídeo β -amiloide, ao contrário do alelo $\epsilon 3$ que se liga à proteína Tau, diminuindo a sua taxa inicial de fosforilação e a formação de filamentos, tendo por isso um efeito protetor para o desenvolvimento de DA (Corder et al. 1998; Czyzewski et al. 1998; Baum et al. 2000). O alelo ApoE $\epsilon 4$ também mostrou ser promotor da hiperfosforilação da Tau, independentemente da influência da A β , conforme observado em modelo animal transgênico (Shi et al. 2017).

Os últimos anos têm sido pródigos na identificação de outros fatores de risco genéticos na patogenia da DA de início tardio através de estudo de associação genómica (GWAS).

Assim, e embora o alelo *ApoE* $\epsilon 4$ continue a ser o fator de risco mais robusto, mais recentemente, foi possível identificar outros polimorfismos em diferentes genes associados com um risco acrescido para DA. Estes estudos foram realizados maioritariamente em populações branca não-hispânica de ascendência Europeia. O primeiro conjunto de estudos GWAS, identificou CLU, PICALM, CR1 e BIN1 como *loci* que conferem suscetibilidade (Harold et al. 2009; Lambert et al. 2009; Seshadri et al. 2010), seguido de um segundo conjunto de estudos, em que foram identificados genes adicionais, nomeadamente, CD33, MS4A4A/MS4A4E/MS4A6E, ABCA7, CD2AP e EPHA1 (Hollingworth et al. 2011; Naj et al. 2011).

Finalmente, o maior estudo de GWAS foi realizado pelo “International Genomics of Alzheimer’s Project (IGAP)” e envolveu dados de quatro consórcios. Neste estudo e através de uma meta-análise que incluiu 74046 participantes, foram identificados, além de genes já anteriormente descritos, 11 *loci* adicionais (Lambert et al. 2013). HLA-DRB5/HLA-DRB1, PTK2B, SORL1, SLC24A4/RIN3, INPP5D, MEF2C, NME8, ZCWPW1, CELF1, FERMT2, CASS4. De notar que estes genes codificam proteínas cujas funções estão implicadas em diferentes vias tais como: resposta imune e inflamatória; o processamento da proteína precursora amiloide (APP) e endocitose; o

metabolismo lipídico, metabolismo da Tau, migração celular, função sináptica, função do citoesqueleto e transporte axonal, reforçando a importância destas vias na etiologia da DA (Reitz et al. 2014; Karch et al. 2015).

Através de estudos de sequenciação completa do genoma e exoma, foram identificadas ainda variantes na região codificante do gene *TREM2* em coortes de DA (Guerreiro et al. 2013; Jonsson et al. 2013). Estas variantes são raras e conferem um risco para a DA moderado e elevado, ao contrário das variantes encontradas em estudos de GWAS que são comuns e conferem um risco pequeno para DA. O *TREM2* é expresso na microglia, estimula a fagocitose e está envolvido na resposta imune e inflamatória (Rohn 2013). Um dado recente interessante, foi o reconhecimento da ApoE como um ligando do *TREM2*, o que demonstrou uma interação funcional entre estas duas proteínas, cujos genes são fatores de risco para a DA (Atagi et al. 2015).

Neste sentido, a DA pode ser considerada uma doença multifatorial, resultante de interações dos múltiplos fatores de risco mencionados anteriormente.

1.3.4 Genética da DA

Estudos realizados com famílias nucleares e em gêmeos mostraram que, em alguns casos de DA, são os fatores genéticos os determinantes no desenvolvimento da doença (Gatz et al. 2006; Dosunmu et al. 2007; Wingo et al. 2012).

Com base na idade de início, a DA é hoje em dia classificada em DA de início precoce (EOAD, início <65 anos) e DA de início tardio (LOAD, início \geq 65 anos). Estima-se que a proporção de EOAD em todos os casos de DA seja inferior a 10%. A forma EOAD ocorre normalmente em indivíduos com história familiar de DA e com um padrão de hereditariedade autossômico dominante (Wingo et al. 2012). A EOAD está geralmente associada a uma progressão mais rápida da doença, daí a importância de conhecer os mecanismos genéticos subjacentes à sua patogênese, no sentido do desenvolvimento de estratégias eficazes de diagnóstico e tratamento.

Até à data, foram identificados três genes causadores da EOAD, gene *APP* (Kang et al. 1987), gene da presenilina 1 (*PSEN1*) (Sherrington et al. 1995), e gene da presenilina 2 (*PSEN2*) (Levy-Lahad et al. 1995). As mutações descritas nestes genes associadas à DA,

apresentam uma elevada penetrância o que significa que os portadores de mutações irão desenvolver a doença precocemente, sendo a identificação de mutações considerada, hoje em dia, um marcador de diagnóstico (Reitz et al. 2014). No entanto, mutações nesses três genes explicam apenas uma pequena parte dos casos de EOAD (Brouwers et al. 2008; Wingo et al. 2012), permanecendo ainda um número significativo de casos sem causa genética conhecida (Janssen et al. 2003; Wallon et al. 2012; Wingo et al. 2012; Jarmolowicz et al. 2015). De notar que estes genes codificam proteínas envolvidas na produção do peptídeo A β , que se encontra descrita na secção 1.3.5.1.

Até ao momento, no gene APP foram descritas cerca de 51 mutações patogénicas (www.molgen.ua.ac.be), que afetam a proteólise desta proteína. A maioria ocorre perto do local de clivagem de enzimas responsáveis pela hidrólise da APP, a β -secretase e γ -secretase (aminoácidos 670-682aa e 713-724aa, respetivamente) ou na sequência do peptídeo A β (aminoácidos 692-705aa) (Ringman et al. 2014), interferindo deste modo com os níveis totais de peptídeos A β (Kwok et al. 2000; De Jonghe et al. 2001; Cruts et al. 2012).

Foi ainda identificada uma duplicação do gene APP numa família EOAD com padrão de transmissão autossómica dominante (Sleegers et al. 2006). No entanto, esta alteração é rara e os seus portadores apresentam uma maior variabilidade na idade de início da doença em relação à observada nos portadores de mutações *missense*, embora aos 65 anos a demência, nestes indivíduos, tenha uma penetrância completa (Rovelet-Lecrux et al. 2006; Sleegers et al. 2006).

O gene *PSENI*, localizado no cromossoma 14q24.2.1, foi o segundo gene a ser identificado como causador da DA, sendo hoje em dia responsável pela maioria dos casos de EOAD (70-80%) (Theuns et al. 2000; Cruts et al. 2012). Até à data, já foram descritas 219 mutações neste gene em 480 famílias (www.molgen.ua.ac.be). A presenilina 1 faz parte do complexo da γ -secretase, que como descrito na secção 1.3.5.1, tem um papel importante na produção dos peptídeos A β (Schroeter et al. 2003). Vários estudos mostraram que mutações no gene *PSENI* provocam uma alteração da proporção de peptídeos A β com diferentes tamanhos formados (Borchelt et al. 1996; Sun et al. 2017), no sentido de uma maior tendência para a formação de peptídeos com propriedades amiloidogénicas (Jan et al. 2008). Portadores de mutações no gene *PSENI*, apresentam geralmente sintomas numa idade de início mais precoce, do que os portadores de

mutações nos genes *APP* e *PSEN2* (Cruts et al. 2012), existindo casos descritos em que a doença teve início antes dos 35 anos (Campion et al. 1996; Holmes 2002).

O gene da *PSEN2*, localizado no cromossoma 1q42.13, foi o terceiro gene identificado associado com a DA. Este gene codifica uma das principais proteínas do complexo γ -secretase e fornece a atividade catalítica do complexo. Ao contrário do gene da *PSEN1*, mutações no gene *PSEN2* são extremamente raras e apenas 16 mutações foram identificadas em 34 famílias (www.molgen.ua.ac.be). Mutações no gene *PSEN2* parecem aumentar a atividade da γ -secretase, contribuindo também para uma maior formação de peptídeos $A\beta$ com propriedades amiloidogénicas. A DA familiar com mutações *PSEN2* tem uma idade mais tardia de início, maior duração da doença em comparação com famílias com mutações *PSEN1* (Jayadev et al. 2010).

As famílias EOAD cuja causa genética continua por conhecer, sugerem a existência de genes associados a DA ainda não identificados. Nos últimos anos, com os avanços das tecnologias de sequenciação de nova geração que permitiram a sequenciação completa do exoma e genoma, foi possível identificar novos genes candidatos ao desenvolvimento de EOAD, tais como *TYROBP*, *NOTCH3* e *SORLI* (Guerreiro et al. 2012; Nicolas et al. 2016; Pottier et al. 2016). No entanto, é necessário o estudo destes três genes em grupos maiores de doentes e controlos, de forma a definir a contribuição das variantes genéticas raras neles encontradas para a etiologia da EOAD.

1.3.5 Fisiopatologia

A DA é caracterizada por uma progressiva acumulação de agregados proteicos específicos em zonas cerebrais características, que se inicia no córtex transentorinal e prossegue através do hipocampo, para outras zonas do cérebro (Lee et al. 2011). Esses agregados proteicos são, como já referido anteriormente, as placas senis extracelulares e as tranças neurofibrilares intraneuronais (Selkoe 2004; Hardy 2006).

As placas senis, ou placas amiloide, são depósitos extracelulares de fibrilas amiloide, com cerca de 8-10 nm de diâmetro, compostas essencialmente por peptídeos β -amiloide com 37-43 aminoácidos. Dependendo da sua morfologia, estas podem ser divididas em placas

difusas e densas. Enquanto nas primeiras os peptídeos β -amiloide (essencialmente o peptídeo com 42 aminoácidos) se encontram num estado amorfo não fibrilar, nas placas densas e fibrilares encontra-se um centro compacto composto por peptídeos β -amiloide com 40 a 42 aminoácidos, rodeado por neurites distróficas, microglia ativada e astrócitos reativos (Dickson et al. 2001). As placas amiloide encontram-se principalmente no córtex cerebral, aparecendo primeiro no neocórtex basal temporal, progredindo depois para as regiões entorrinais e hipocampo. No entanto o seu padrão de progressão de deposição não é facilmente previsível, ao contrário do que acontece com as tranças neurofibrilares (Braak et al. 2011). A identificação dos dois tipos de placas amiloide em áreas sobrepostas deu origem à hipótese que as placas difusas representam lesões precursoras das placas compactas, que sofrem um processo de maturação por co-deposição do peptídeo β -amiloide 40 (Selkoe 2001). O facto de em regiões do cérebro que não estão claramente implicadas nos sintomas típicos da DA (cerebelo, estriado e tálamo) ser apenas possível detetar placas difusas apoia esta hipótese (Selkoe 2001).

As tranças neurofibrilares (TNFs) são outro achado histológico que é observado no citoplasma dos neurónios dos doentes com DA (Braak et al. 1990) e que são maioritariamente constituídos pela proteína Tau hiperfosforilada (Delacourte et al. 1986; Grundke-Iqbal et al. 1986; Goedert et al. 1988; Grundke-Iqbal et al. 1988). Estudos de microscopia eletrónica mostraram que as TNFs são formadas principalmente por filamentos helicoidais emparelhados, e também por uma pequena porção de filamentos lisos (Fitzpatrick et al. 2017). As TNFs podem apresentar três estados morfológicos distintos: pré-TNFs ou TNFs difusas, que se apresentam como zonas puntiformes, não fibrilares, no citoplasma dos neurónios com morfologia celular normal, com núcleo detetável e dendrites preservadas; TNFs fibrilares intraneuronais ou maduras, que surgem como estruturas fibrilares no citoplasma dos neurónios com núcleo deslocado para periferia e dendrites danificadas; TNFs extracelulares, constituídas por agregados filamentosos da proteína Tau extracelular, neurónios atroficos, sem núcleo visível e dendrites colapsadas (Serrano-Pozo et al. 2011).

Estas alterações patológicas são primeiramente observáveis em poucas áreas do circuito cortical límbico progredindo através do córtex e tronco cerebral (Braak et al. 1994), como comprovado por análise de coloração e deteção imunocitoquímica de deteção das formas hiperfosforiladas da proteína Tau (Braak et al. 2006). Esta progressão das alterações citoesqueléticas, devidas à diminuição da capacidade de associação da proteína Tau aos

microtúbulos (Braak et al. 1994), é um processo lento e variável de meses a anos de evolução (Bamburg et al. 2009). O padrão de progressão de formação das tranças neurofibrilares segue um padrão que se inicia pelo córtex transentorrinal, progride para o sistema límbico (hipocampo e amígdala), prosseguindo até ao lobo temporal basal (Braak et al. 1996).

São também observadas outras lesões microscópicas como a degeneração granulovacuolar e os corpos de Hirano encontrados, principalmente, no citoplasma de células do hipocampo (Perl 2010), além de alguma deposição de agregados amiloides nas paredes vasculares cerebrais que conduzem a angiopatia amiloide cerebral e que também acompanham a patogénese da DA (Perl 2010; Holtzman et al. 2011).

Estruturalmente, é possível observar uma atrofia cortical generalizada, geralmente mais acentuada a nível dos hipocampos e lobo temporal, com marcada perda de sinapses e neurónios colinérgicos (Lehericy et al. 1991), com especial expressão na região do proencéfalo basal (Wenk et al. 1998) e nos núcleos basais de Meynert (Whitehouse et al. 1981).

1.3.5.1 Peptídeo β -amiloide

O peptídeo β -amiloide origina-se a partir da APP, que é uma proteína transmembranar de tipo I, constituída por um extenso domínio N-terminal extracelular glicosilado, um domínio transmembranar e um pequeno domínio C-terminal intracelular, contendo 47 resíduos de aminoácidos. O peptídeo β -amilóide compreende a região justamembranar N-terminal com 28 resíduos de aminoácidos e cerca de metade da sequência transmembranar. A APP é expressa ubiquamente no organismo, sendo codificada por um gene localizado no cromossoma 21q21.3, que gera por *splicing* alternativo, oito isoformas diferentes, com 365 a 770 aminoácidos, das quais as isoformas longas de 695, 751 e 770 aminoácidos são as mais comuns (O'Brien et al. 2011).

A maturação da APP ocorre através da via secretora constitutiva, do retículo endoplasmático para a membrana plasmática, sendo principalmente encontrada no

complexo de Golgi, e apenas transitoriamente à superfície celular. A sua rápida internalização é devida ao motivo YENPTY, localizado na região citoplasmática, dirigindo a proteína para os endossomas. Parte da APP internalizada é então reciclada, enquanto o resto é dirigido para os lisossomas para degradação (Capell et al. 2000).

A APP sofre processamento proteolítico por diferentes proteases, originando peptídeos que apresentam diferentes potenciais de agregação e consequentemente de neurotoxicidade, dando assim origem a uma via amiloidogénica e outra não-amiloidogénica (LaFerla et al. 2007), conforme figura 1.2 (Zheng et al. 2011).

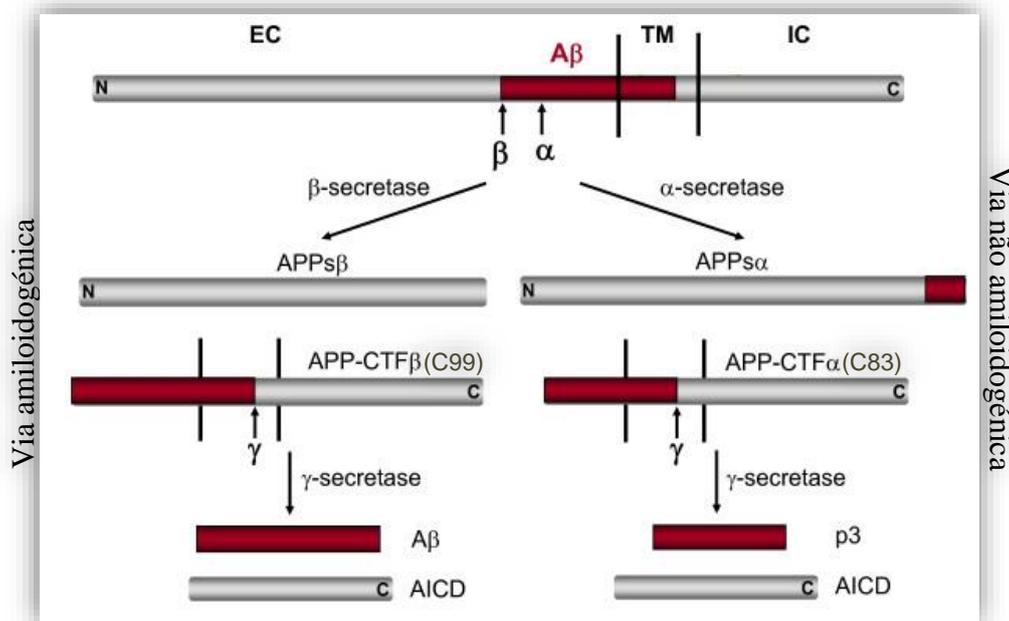


Figura 1.2 – Diagrama esquemático das vias de processamento da APP.

A β : peptídeo β Amiloide (representado a vermelho). β , α e γ : locais de corte das secretases respetivas. EC: domínio extracelular; TM: domínio transmembranar; IC: domínio intracelular. APPs β : ectodomínio APP solúvel da clivagem amiloidogénica; APPs α : ectodomínio APP α solúvel; APP-CTF β (C99): fragmento transmembranar com 99 aminoácidos resultante da clivagem amiloidogénica da APP; APP-CTF α (C83): fragmento transmembranar com 83 aminoácidos resultante da clivagem não amiloidogénica da APP; AICD: domínio intracelular; p3: produto de 3 KDa, do processamento da γ secretase. Adaptado de Zheng et al. 2011.

Na via não-amiloidogénica, a APP é clivada inicialmente pela α secretase entre os resíduos de Lisina nas posições 16 e 17 do peptídeo β -amiloide, levando assim à formação de um fragmento solúvel de APP (sAPP α) e do fragmento transmembranar C83. Este fragmento é então clivado pela γ secretase, dando origem a um fragmento extracelular p3 e ao domínio intracelular da APP (AICD), que é rapidamente degradado (Hellstrom-Lindahl 2000). Na via amiloidogénica, a APP é sequencialmente clivada pela β secretase, também denominada de BACE1, seguida da γ secretase (Dominguez et al. 2004). Formam-se então, inicialmente, os fragmentos sAPP β e C99, dando então, este último, origem ao peptídeo β -amiloide (A β) de 37 a 43 aminoácidos e ao AICD (Zhang et al. 2012).

Estas duas vias competem uma com a outra para o processamento da APP. Em condições fisiológicas, a via não-amiloidogénica é responsável por mais de 90% do processamento da APP, sendo considerada a via secretora mais importante na maior parte das células. No entanto, no cérebro de doentes com DA, pensa-se que poderá existir um desequilíbrio

entre estas duas vias, favorecendo a produção dos peptídeos $A\beta$. Dependendo da localização celular quer da APP, quer da α e β secretase, da sua concentração e atividade, uma via pode assim prevalecer sobre a outra. É portanto possível que as duas vias ocorram em paralelo em diferentes localizações subcelulares. Enquanto a via não-amiloidogénica ocorrerá preferencialmente na superfície celular, onde a α secretase se localiza, a via amiloidogénica ocorrerá provavelmente em compartimentos intracelulares, como a rede trans-Golgi e o endossoma, onde se encontra a β secretase. A posterior clivagem pela γ secretase requer que o fragmento transmembranar seja transportado para zonas onde este complexo enzimático esteja presente, como a superfície celular (Zhang et al. 2012).

De entre todos os peptídeos $A\beta$ gerados pelo processamento proteolítico da APP pelas β e γ secretases, o peptídeo $A\beta$ com 40 aminoácidos ($A\beta_{40}$) é o mais abundante, constituindo cerca de 90% da quantidade total de $A\beta$ existente no cérebro. Este peptídeo é menos hidrofóbico, tem menos tendência a auto-agregar e é portanto considerado menos tóxico que o peptídeo $A\beta$ com 42 aminoácidos ($A\beta_{42}$). Este último, que constitui menos de 10% do conteúdo cerebral de $A\beta$, em virtude da sua maior hidrofobicidade e maior potencial de agregação, é considerado mais neurotóxico e é o fragmento que está associado ao desenvolvimento da DA (Younkin 1998). Mutações nos genes da *PSEN1* e *PSEN2*, referidas na secção 1.3.4, estão associadas a um aumento na razão $A\beta_{42}/A\beta_{40}$. Os restantes peptídeos $A\beta$, igualmente pouco abundantes, têm sido menos estudados, sendo em geral considerado que os peptídeos $A\beta$ com 37 e 38 aminoácidos ($A\beta_{37}$ e $A\beta_{38}$) têm menor tendência para agregar que o $A\beta_{42}$, enquanto o peptídeo com 43 aminoácidos ($A\beta_{43}$) terá uma elevada propensão para a agregação (Saito et al. 2011). Para além das formas completas do peptídeo $A\beta$, têm também sido identificadas no cérebro de doentes de DA, formas clivadas a nível do terminal amínico ($A\beta_{x-40/42}$), com elevada propensão amiloidogénica e toxicidade (Guzman et al. 2014).

Nos primeiros anos da investigação dos mecanismos fisiopatológicos da DA, pensava-se que os peptídeos $A\beta$ eram apenas um produto tóxico resultante do metabolismo da APP. Atualmente reconhece-se que os peptídeos $A\beta$ são gerados como parte do processamento normal da APP e secretados normalmente por células saudáveis durante a vida, estando presentes quer no líquido cefalorraquídeo (LCR), quer no fluído intersticial, quer no sangue de indivíduos saudáveis. Em concentrações fisiológicas, os peptídeos $A\beta$ têm um papel importante na formação de sinapses, na plasticidade sináptica a nível do hipocampo, sendo a sua presença essencial para a formação e consolidação da memória (Puzzo et al.

2011). Assim, os peptídeos A β podem exercer efeitos quer neurotóxicos quer neurotróficos dependendo da sua concentração. Estudos realizados por Puzzo e colaboradores, em modelos animais, demonstraram que, em concentrações na ordem das picomoles têm efeito indutor de plasticidade sináptica e potenciação da memória (Puzzo et al. 2008; Puzzo et al. 2011), através da ativação de recetores colinérgicos nicotínicos pré sinápticos (Dougherty et al. 2003), enquanto em concentrações na ordem dos 200 nanomolares tem um efeito oposto, com perda de memória e de potenciação de longo prazo (LTP) (Puzzo et al. 2008; Puzzo et al. 2017).

A formação das placas amiloides deve-se à natureza anfipática, dos monómeros A β , que quando se começam a acumular tendem a agregar espontaneamente em estruturas com peso molecular cada vez mais elevado, que vão dos dímeros, trímeros a oligómeros de tamanho variável. Estes tendem a organizar-se em estruturas de peso molecular elevado, incluindo oligómeros globulares, anulares e amiloesferoides. Esta associação contínua resulta na formação de fibras insolúveis que eventualmente depositam no cérebro (figura 1.3) (Roychaudhuri et al. 2009; Burke et al. 2013).

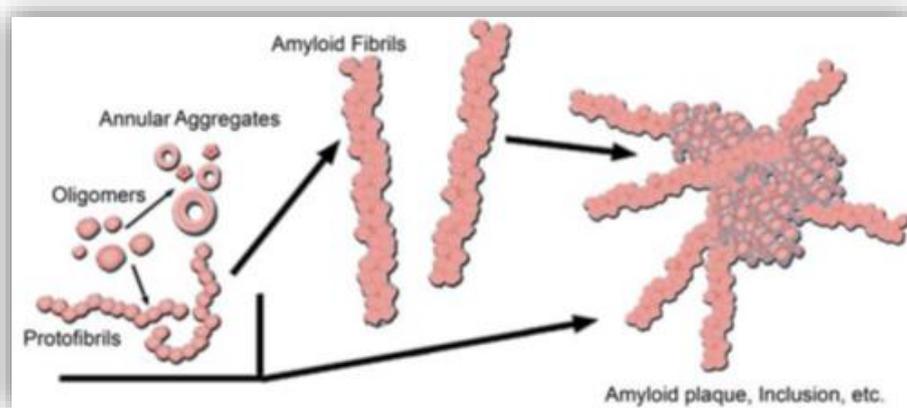


Figura 1.3 – Esquema de formação de agregados amiloides a partir dos oligómeros. Os oligómeros potenciam a formação de protofibrilas que favorecem a formação de placas amiloides. Adaptado de Burke et al. 2013.

A maior parte da evidência existente sugere que, mais do que as fibras e placas, serão os oligómeros de A β as estruturas mais deletérias e responsáveis pela neurotoxicidade observada no cérebro dos doentes com DA. A nível das sinapses, foi demonstrado que os oligómeros A β inibem a LTP, promovem a remoção dos recetores sinápticos de glutamato e a eliminação das sinapses glutamatérgicas (Sakono et al. 2010). Por outro lado, as fibras e placas A β estão associados a uma ativação astrocitária e da microglia, indução da resposta inflamatória e promoção da formação das tranças neurofibrilares através da

alteração da atividade de cinases e fosfatases. É possível que estas placas compactas possam servir como um depósito de pequenos oligómeros que pode difundir para a periferia e causar dano sináptico e neuronal. Uma outra teoria, defende que a formação das placas pode ser na realidade um mecanismo protetor, que inativa a toxicidade das espécies oligoméricas intermédias, através da sua sequestração no interior das placas (Cohen et al. 2006).

Para além dos efeitos extracelulares das diferentes espécies de A β , também intracelularmente podem exceder um papel neurotóxico. Além de serem produzidos intracelularmente, os peptídeos A β da *pool* extracelular também podem ser internalizados através de diversos recetores e transportadores, como sejam o recetor de acetilcolina de tipo nicotínico, recetor de lipoproteínas de baixa densidade, recetores NMDA, entre outros (LaFerla et al. 2007). Intracelularmente, os mecanismos pelos quais os oligómeros de A β exercem a sua toxicidade poderão ser diferentes dos extracelulares. Diversas evidências sugerem que a A β intracelular facilita a hiperfosforilação da proteína Tau, interfere com o funcionamento do proteossoma e da mitocôndria, induzindo disfunção dos mecanismos dependentes de Ca²⁺ e disfunção sináptica (Cavallucci et al. 2012).

Recentemente, algumas evidências sugerem que os oligómeros A β terão a capacidade de se auto propagar pelo cérebro num processo semelhante ao demonstrado para a proteína priónica patogénica, embora a sua infectividade seja ainda controversa (Nath et al. 2012).

À medida que os peptídeos A β são gerados no cérebro, estes são também eliminados continuamente para a periferia, de forma a manter um equilíbrio dinâmico entre os diferentes compartimentos celulares. A eliminação da A β cerebral depende de vários processos que ocorrem em paralelo: a sua degradação proteolítica por diversas proteases como por exemplo a neprililina (Iwata et al. 2000), as enzimas conversoras da endotelina do tipo 1 e 2 (Turner et al. 1997), a enzima que degrada a insulina (Kurochkin et al. 1994), a enzima conversora da angiotensina (Hu et al. 2001), as metaloproteínases da matriz do tipo 2 e 9 e a catepsina B (Nalivaeva et al. 2012); a sua clearance passiva mediada por células; o seu transporte ativo através da barreira hemato-encefálica (Deane et al. 2007).

1.3.5.2 Proteína Tau

A proteína Tau é uma proteína neuronal que pertence a um grupo de proteínas designadas de proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs).

A proteína Tau humana é codificada pelo gene *MAPT*, localizado no braço longo do cromossoma 17q21 (Neve et al. 1986), com grande expressão a nível neuronal (Binder et al. 1985). O gene *MAPT* humano é constituído por doze exões, que por *splicing* alternativo dos exões 2, 3 e 10 pode dar origem a 6 isoformas da proteína (Avila et al. 2004). Estas isoformas têm entre 352 e 441 aminoácidos e diferem na presença de um ou dois *inserts* de 29 aminoácidos no N-terminal (1N ou 2N) e no número de repetições dos domínios de ligação aos microtúbulos presentes no C-terminal (3R ou 4R) – (figura 1.4) (Alonso et al. 2001).

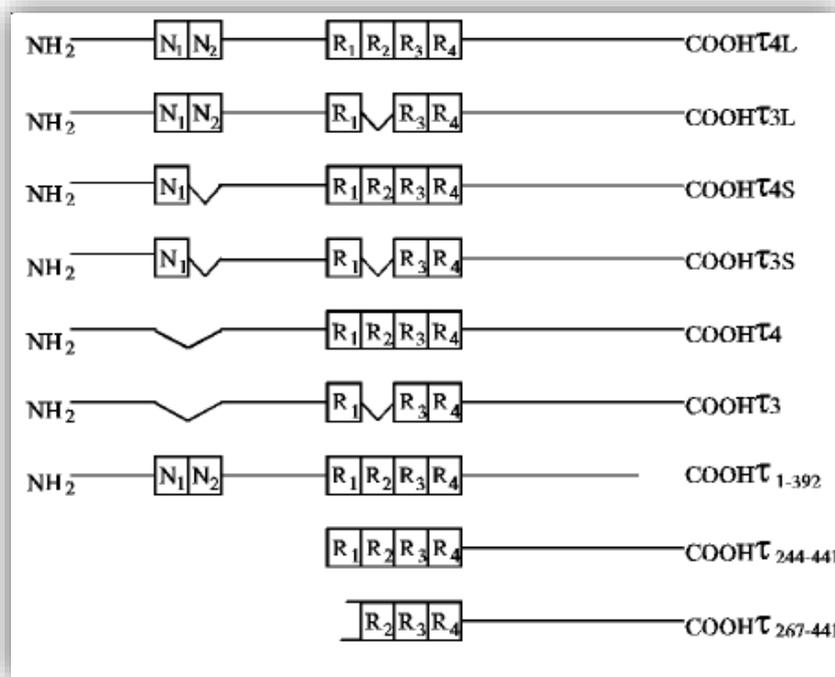


Figura 1.4 – Representação esquemática de isoformas da Tau humana. Adaptado de Alonso et al. 2001.

O domínio de ligação aos microtúbulos está envolvido na polimerização e estabilização dos microtúbulos, enquanto o terminal amínico pode interagir com outros elementos do citoesqueleto e da membrana plasmática neuronal. O número de domínios de ligação aos microtúbulos determina a afinidade da Tau para os microtúbulos, tendo as isoformas 4R maior afinidade que as 3R, resultando numa maior estabilização dos microtúbulos e

menor tendência para a agregação. No cérebro adulto, o equilíbrio entre as isoformas 3R e 4R parece ser essencial para manter a dinâmica dos microtúbulos (Panda et al. 2003).

Em condições fisiológicas, a proteína Tau desempenha um papel importante na estabilização da forma polimerizada da tubulina (Weingarten et al. 1975) e consequentemente na estabilidade do citoesqueleto neuronal (Bamburg et al. 2009). Para além desta função, a proteína Tau também está envolvida no estabelecimento da polaridade neuronal e na regulação do transporte axonal de diversos organelos, como a mitocôndria (Caceres et al. 1990; Dixit et al. 2008). Embora em quantidades muito menores, a Tau também parece estar presente nas dendrites, onde poderá ter um papel na plasticidade sináptica (Ittner et al. 2010), e também no núcleo, onde poderá ter uma função protetora do DNA (Sultan et al. 2011).

Os mecanismos pelos quais a proteína Tau se torna disfuncional ainda não se encontram completamente estabelecidos. Na DA, as modificações pós-translacionais da Tau têm sido propostas como a causa para a sua perda de função e aparecimento da patologia Tau. Estas modificações incluem essencialmente a fosforilação anómala da proteína – hiperfosforilação, mas também a sua acetilação, glicosilação, clivagem proteolítica e alteração conformacional. A fosforilação proteica é uma das principais modificações pós-translacionais responsável pela regulação de vias de sinalização. Esta alteração envolve a adição de um grupo fosfato por uma cinase proteica, a três tipos de aminoácidos: serina, treonina ou tirosina. A proteína Tau contém 85 possíveis locais de fosforilação (figura 1.5) e pode ser alvo quer de cinases de serina/treonina que fosforilam resíduos fora do domínio de ligação aos microtúbulos, como a GSK3 β , a MAPK, a Cdk5/p21 e a JNK; quer de cinases que fosforilam dentro do domínio de ligação aos microtúbulos, como a MAPK, a P70S6K, a BRSK, a cinase dependente de Adenosina monofosfato cíclico (cAMP) (PKA) e a cinase dependente de Ca²⁺/Calmodulina do tipo II (CaMK-II). Por seu lado, um efeito oposto é produzido pelas fosfatases PP1, PP2A, PP2B e PP2C, que podem defosforilar a proteína Tau e possuem um leque de substratos bastante mais abrangente (Arendt et al. 2016). No cérebro dos doentes de DA, pensa-se haver um desequilíbrio entre a atividade das cinases e fosfatases, levando a uma anómala hiperfosforilação da Tau. Calcula-se que a proteína Tau esteja três a quatro vezes mais hiperfosforilada no cérebro dos doentes com DA, quando comparado com o cérebro de indivíduos idosos não demenciados (Kolarova et al. 2012).

1 maepqrqefev medhagTYgl gdrkdqggYT mhqdqegdId aglkeSplqTpTedgSeepg
 61 SeTSdakSTp TaedvTaplv degapgkqaa aqphTeipeg TTaceagigd TpSledeaag
 121 hvTqarmvSk SkdgTgSddk kakgadgkIk iaTprgaapp gqkgqanaTr ipakTppapk
 181 TppSSgeppk SgdrSgYSSp gSpgTpgSrs rTpSlpTppT repkkvavvr TppkSpSSak
 241 SrlqTavpvm pdlknvkSki gSTenkhqp gggkvqiink kldlSnvqSk cgSkdnikhv
 301 pgggSvqivY kpvdlskvTS kcgSlgnihh kpgggqvevk Sekldfkdrv qSkigSldni
 361 Thvpgggnkk ieThklTfre nakakTdhga eivYkSpvvs gdTSprhlSn vSSTgSidmv
 421 dSpqlaTlad evSaSlakqg l

Figura 1.5 – Sequência de aminoácidos da proteína Tau, com potenciais locais de fosforilação, 80 Serina/Treonina (S/T) e 5 Tirosinas (Y). (Wang et al. 2013).

A fosforilação de vários resíduos da Tau tem sido diretamente associada a uma perda de afinidade para os microtúbulos e/ou a uma maior tendência para a agregação (Guo et al. 2017), enquanto que a sua desfosforilação promove a polimerização microtubular.

24 Assim, a estabilidade citoesquelética e a morfologia axonal será dependente do equilíbrio entre o estado fosforilado e desfosforilado da Tau (Mandelkow et al. 1995).

Durante o curso da DA, a Tau hiperfosforilada desliga-se dos microtúbulos, havendo também alteração da sua conformação, com exposição dos domínios de repetição do C-terminal, que se sabe aumentam a tendência para a agregação patogénica da Tau (Xu et al. 2016). Estas formas livres de Tau hiperfosforilada tendem então a ligar-se entre si, produzindo oligómeros, que podem sofrer fosforilação e alteração conformacional, adotando uma estrutura em folha beta que é considerada insolúvel. A fusão destas espécies oligoméricas contribui para a formação dos filamentos helicoidais emparelhados, que dão posteriormente origem às TNFs – figura 1.6 (Formichi et al. 2006).

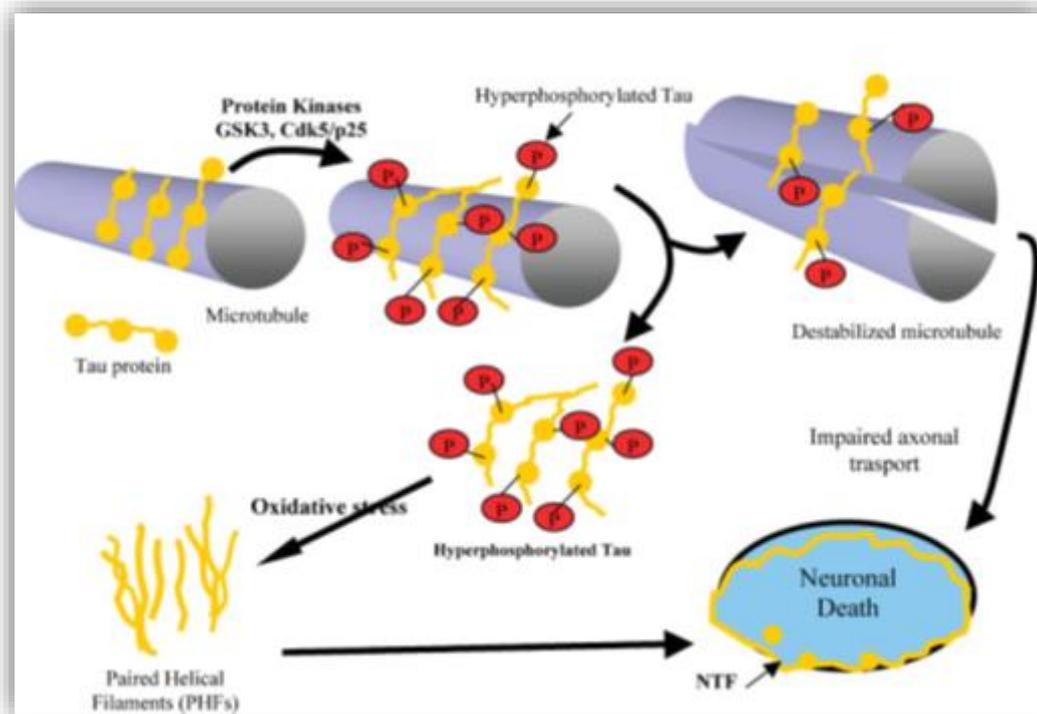


Figura 1.6 – Ativação das Cinases, com o subsequente aumento da hiperfosforilação da Tau, com a sua agregação e desestabilização dos microtúbulos, favorecendo a formação de tranças neurofibrilares e conseqüente morte neuronal. Adaptado de Formichi et al. 2006.

Muito provavelmente não serão as TNFs as espécies tóxicas na patologia da DA, mas sim as formas menos complexas, como os oligómeros e pequenos agregados. De facto, as TNFs poderão até ter um papel protetor, sequestrando as espécies tóxicas e permitindo a sua eliminação pelo proteossoma ou por mecanismos de autofagia. No entanto, em estadios mais avançados a presença das TNFs deverá comprometer a viabilidade celular e levar à morte neuronal (Kopeikina et al. 2012).

1.3.5.3 Hipótese da cascata amiloide

Ao longo dos anos várias hipóteses têm surgido para explicar como é que o desenvolvimento das tranças neurofibrilares e das placas senis levam à perda sináptica e às alterações cognitivas típicas da DA.

A “Hipótese da Cascata da Amiloide” (Hardy & Higgins, 1992) tem sido a hipótese dominante nos últimos 20 anos, e propõe que a acumulação e a deposição do peptídeo A β sejam o evento-chave na fisiopatologia da DA, iniciando uma cascata de eventos tóxicos que envolvem a hiperfosforilação da Tau e que conduzem à neurodegenerescência. Esta hipótese foi baseada em diversos estudos que demonstraram que: i) o peptídeo A β é o principal constituinte das placas senis; ii) as mutações causadoras das formas genéticas da DA, localizadas nos genes *APP*, *PSEN 1* e *2* estão associadas a alterações na produção do peptídeo A β , promovendo a via amiloidogénica do processamento da APP (Hardy et al. 1992); iii) indivíduos com síndrome de Down, que possuem uma cópia extra do gene *APP*, desenvolvem placas amiloide semelhantes às encontradas no cérebro de indivíduos com DA e apresentam uma maior incidência da DA (Glennner et al. 1984); iv) diversos trabalhos com modelos animais transgênicos que sobre expressam o gene humano da *APP* mostraram um aumento nos depósitos de A β e o desenvolvimento de características neuropatológicas e comportamentais semelhantes à DA (Hsiao 1998); v) o fator de risco genético mais importante para a LOAD, a ApoE- ϵ 4, também influencia o processamento e/ou a *clearance* do peptídeo A β .

Tendo como evento inicial o desequilíbrio no binómio produção/*clearance* dos peptídeos A β , a hipótese da cascata amiloide pretende explicar quer as formas genéticas da DA, quer as formas esporádicas. Segundo esta hipótese, nas formas genéticas, as mutações causadoras da doença provocariam um desequilíbrio no sentido do aumento da produção destes peptídeos, enquanto que nas formas esporádicas, a influência do envelhecimento celular, alterações ambientais, fatores de risco genético e outros, resultariam num distúrbio nos mecanismos de *clearance*. Em qualquer dos casos, o resultado seria uma sobreprodução de peptídeos A β com tendência a agregar, levando à acumulação de fibrilas insolúveis e à sua deposição no cérebro sob a forma de placas. Este evento desencadearia então uma cascata a jusante, envolvendo alterações inflamatórias, gliose,

excitotoxicidade, stress oxidativo, hiperfosforilação da proteína Tau e formação de TNFs, levando a uma disfunção neuronal generalizada, perda sináptica e em última instância a demência – figura 1.7.

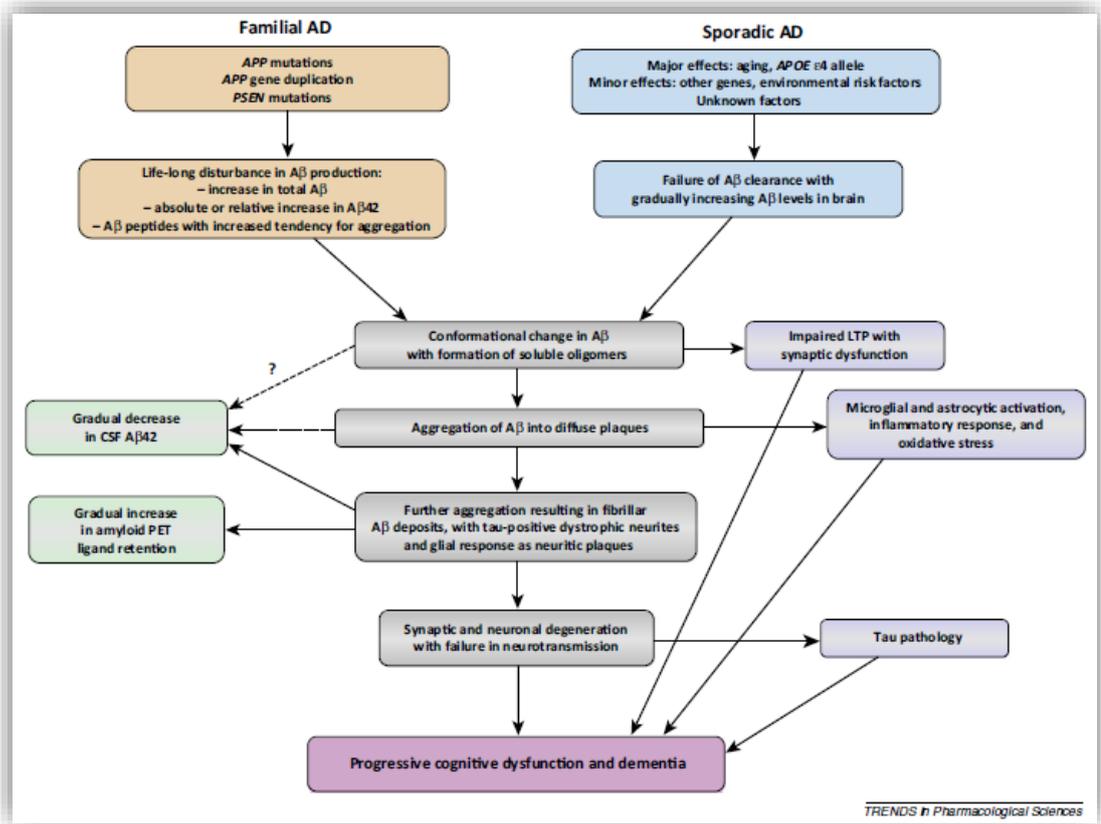


Figura 1.7 – Hipótese adaptada da Cascata amiloide englobando as formas esporádicas e familiares da DA. (Blennow et al. 2015).

Nos últimos anos, contudo, várias evidências têm posto em causa a hipótese da cascata amiloide e tem-se tornado evidente que a correlação entre as alterações cognitivas e a acumulação de Aβ no cérebro não é linear, nem em humanos, nem em ratinhos (Terry et al. 1991; Terry 1996; Giannakopoulos et al. 2003).

Também a constatação de placas amiloides em idosos que se apresentaram até ao final da vida cognitivamente normais (Dani et al. 1997), retira suporte à formulação inicial da teoria da cascata amiloide como explicação para o desenvolvimento da DA. A ausência de patologia Tau e de perda neuronal significativa em animais transgênicos que sobre expressam a forma humana da APP é outro fator que põe em causa esta teoria (Annaert

et al. 2002). Mais recentemente, a ausência de resultados clínicos positivos em ensaios com estratégias modificadoras da doença dirigidas à A β , têm também contribuído grandemente para o ceticismo relacionado com esta hipótese, que permanece sem prova clínica definitiva.

De forma a acomodar descobertas mais recentes, a hipótese da cascata amiloide tem sofrido algumas modificações (Karran et al. 2011), e atualmente os defensores desta teoria sugerem que a toxicidade sináptica e neuronal seja mediada não pelas placas senis, mas sim por pequenas espécies de A β difusíveis ou por oligómeros. Estas formas intermediárias entre os monómeros solúveis e as fibrilas insolúveis seriam capazes de afetar diretamente a função sináptica (Lacor et al. 2007; Klyubin et al. 2008), perturbar a sinalização dependente de cálcio (Nimmrich et al. 2008) e promover a desagregação dos microtúbulos dependente da hiperfosforilação da Tau (King et al. 2006).

1.3.5.4 Outras hipóteses:

1.3.5.4.1 - Mitocôndria/Stress oxidativo

A função mitocondrial e o balanço oxidativo celular são fortemente condicionados pelo envelhecimento e o seu envolvimento na DA tem sido sugerido diretamente quer por observações em tecido cerebral e células de doentes com DA, quer por estudos em modelos experimentais da doença. A hipótese da “cascata mitocondrial” foi formulada por Swerdlow em 2004 (Swerdlow et al. 2004), e assenta em três pressupostos essenciais: i) a atividade mitocondrial de base de cada indivíduo depende da sua herança genética, e uma vez que o DNA mitocondrial é de herança materna, o risco de desenvolver DA é mais influenciado pela mãe do que pelo pai; ii) fatores ambientais e genéticos contribuem para a velocidade a que alterações mitocondriais associadas à idade se desenvolvem e manifestam; iii) a atividade basal mitocondrial de cada indivíduo, assim como a taxa a que a sua atividade se altera, influenciam a cronologia de desenvolvimento da DA. Esta hipótese é apontada como um modelo mecanicista para a LOAD e é apoiada por evidências que mostram que: a função mitocondrial afeta a expressão e processamento da APP, bem como a acumulação de peptídeos A β (Gabuzda et al. 1994); é uma fonte importante de espécies reativas de oxigénio (ROS) e de stress oxidativo (Markesbery 1999), pode afetar a fosforilação da proteína Tau (Szabados et al. 2004) e induzir inflamação (Ichimura et al. 2003).

A hipótese da cascata mitocondrial vê assim os peptídeos A β como um marcador do envelhecimento cerebral e não como a causa primordial da DA, sendo a sua homeostase uma função da atividade mitocondrial. Inicialmente, as alterações da função mitocondrial levariam a um aumento da produção dos peptídeos A β e à sua acumulação. Mais tarde, à medida que a disfunção mitocondrial ultrapassa um determinado limiar, a produção e acumulação de A β declinaria. Esta hipótese tende a associar, e não separar, as alterações cognitivas associadas ao envelhecimento e associadas à DA. Pelo contrário, segundo esta hipótese a etiologia da LOAD aparece dissociada das formas familiares da doença (Swerdlow et al. 2014).

1.3.5.4.2- Inflamação

Tal como foi já referido na secção 1.3.3.1, a propósito dos estudos GWAS, a identificação de novas variantes genéticas de risco, como é o caso do gene *TREM2*, vieram reforçar a importância de alguns mecanismos patogénicos conhecidos na etiologia da DA. A hipótese inflamatória da DA tinha já sido sugerida por estudos epidemiológicos (como por exemplo o estudo de Roterdão) que revelaram uma associação entre o consumo prolongado de anti-inflamatórios e um menor risco de desenvolver a patologia (McGeer et al. 1990; Rogers et al. 1993; McGeer et al. 1996; in t' Veld et al. 2001), e também pela observação direta em tecido cerebral de uma intensa proliferação e ativação da microglia em redor das placas senis e das tranças neurofibrilares associada a um aumento da expressão de mediadores inflamatórios (Akiyama et al. 2000; McGeer et al. 2000). Estes mecanismos foram confirmados em modelos animais transgénicos de DA, sendo também possível a sua avaliação *in vivo* através de técnicas de imagem cerebral usando ligandos específicos (11C-PK11195) (Okello et al. 2009). Esta hipótese defende que a exposição local prolongada aos fragmentos solúveis ou aos depósitos parenquimatosos dos peptídeos A β é um evento iniciador potente na ativação da microglia, salientando-se o papel-chave de alguns fenótipos microgliais controlados por genes implicados na fagocitose, como o *TREM2* (Orre et al. 2013). Os mecanismos imunitários centrais poderão ser potenciados por um ambiente sistémico favorável, nomeadamente na presença de comorbilidades que partilham os mesmos mecanismos e que são frequentes no envelhecimento, como a diabetes, a hipertensão e traumatismo craniano (Meyer-Luehmann et al. 2006). Esta interação dinâmica entre o sistema imunitário central e sistémico, envolvendo elementos celulares e moléculas sinalizadoras solúveis que

migram do sistema periférico e vão potenciar o ambiente de inflamação cerebral, poderá ser especialmente relevante nas formas LOAD (Heneka et al. 2015).

1.3.5.4.3- Colinérgica

A primeira hipótese para a etiologia da DA, apresentada há mais de 35 anos por Bartus e colaboradores, foi a hipótese colinérgica (Bartus et al. 1982). Esta hipótese defendia que a depleção de acetilcolina cerebral era a causa primária do declínio cognitivo associado ao envelhecimento e à DA.

A linha de evidências mais forte em apoio desta hipótese vem de estudos que mostram que a perda de atividade colinérgica é uma observação comum no cérebro dos doentes com DA (Davies et al. 1976; Perry et al. 1978), verificando-se uma redução marcada de neurónios nos núcleos basais de Meynert (Whitehouse et al. 1981) e da atividade da enzima Colina Acetil Transferase (ChAT), envolvida na síntese da acetilcolina (Bowen et al. 1976; Davies et al. 1976; Perry et al. 1978). Estas alterações foram igualmente observadas em modelos animais de envelhecimento, correlacionando-se com o defeito de memória (Strong et al. 1980; Gilad et al. 1987). A ideia de que o sistema colinérgico teria um papel crucial nas alterações cognitivas associadas ao envelhecimento foi também suportada por estudos em que a administração de baixas doses do antagonista muscarínico scopolamina induzia, em indivíduos jovens, défices cognitivos semelhantes aos observados em idosos (Drachman et al. 1974). Estas observações foram também reproduzidas em animais, desde macacos a roedores (Meyers et al. 1964; Bartus 1979).

Como uma consequência lógica desta teoria, vários compostos estimuladores do sistema colinérgico foram usados em estudos pré-clínicos e clínicos pelo seu potencial efeito no defeito de memória associado ao envelhecimento normal e patológico. Os melhores resultados, apesar de limitados, foram apresentados por inibidores de colinesterases, usados atualmente como terapêutica sintomática da DA (ver secção 1.3.7).

O falhanço da abordagem colinomimética na modificação do curso da doença, tornou claro que, o défice colinérgico não será a única causa para a DA, como proposto inicialmente pela hipótese colinérgica. No entanto, na ausência de uma explicação cabal para a etiologia da doença, a hipótese colinérgica tem, nos últimos anos, ressurgido, alicerçada no conceito de que a DA será uma doença multifactorial em que o defeito colinérgico deverá representar uma vertente da sua patogénese, contribuindo para a sua

progressão. De facto, foi recentemente demonstrado que a atrofia colinérgica no proencéfalo basal surge em fases mais precoces da doença do que inicialmente se pensava, progredindo em paralelo com a redução do volume cortical (Kilimann et al. 2017), estando a atrofia precoce dos núcleos basais de Meynert e das estruturas corticais do lobo temporal associadas a um défice da evocação diferida em fases iniciais da patologia (Grothe et al. 2010). Estudos recentes mostraram também que o sistema colinérgico poderá ter uma ação neuroprotetora contra vários dos eventos neuropatológicos da DA, como seja a acumulação de A β e a hiperfosforilação da Tau (Echeverria et al. 2016; Ovsepian et al. 2016). Enquanto a ativação dos recetores muscarínicos do tipo M1 parece promover a clivagem não-amiloidogénica da APP através da modulação das suas secretases (Davis et al. 2010), a fosforilação da Tau poderá ser induzida ou inibida pela ativação dos recetores muscarínicos ou nicotínicos, respetivamente (Caccamo et al. 2006; Buckingham et al. 2009). As terminações colinérgicas do proencéfalo basal que expressam o recetor neurotrófico p75 também parecem ter um papel na clearance dos peptídeos A β , através da sua degradação pela via endocítica (Ovsepian et al. 2016).

Não é pois de estranhar que, apesar dos modestos benefícios sintomáticos apresentados pelos inibidores das colinesterases e da variedade de hipóteses alternativas que têm surgido para a etiologia da DA, a terapêutica colinérgica ainda seja relevante e alvo de investigação ativa, com numerosas moléculas com ação a nível do sistema colinérgico a serem testadas.

1.3.6 Caraterísticas e curso clínico

A DA é uma doença crónica que apresenta uma evolução progressiva, normalmente lenta, ao longo de 2 a 20 anos (Santana 1999).

Na sua forma típica, a manifestação dominante caracteriza-se por défice de memória, com um progressivo quadro de deterioração cognitiva, associado a alterações comportamentais, que conduzem a perda de autonomia funcional (Santana 1999). No entanto, nem todos os doentes apresentam este tipo de manifestação de declínio típico, podendo evidenciar outras formas de apresentação da doença, como défice do controle da linguagem e comunicação, com manifestações afásicas (Mesulam 2003) e défice de desempenho de funções (Alladi et al. 2007). Também tem sido referida alguma diminuição da capacidade visual (Benson et al. 1988; Kaeser et al. 2015).

No decurso da evolução de doentes de DA também tem sido demonstrado o surgimento de outras manifestações de carácter não cognitivo, mas sim do foro comportamental, como apatia, depressão, agitação, alucinações, agressão, desinibição, perturbação da qualidade de sono e psicose (Masters et al. 2015; Suarez-Gonzalez et al. 2016). Estes fatores parecem estar associados a uma mais rápida deterioração das funções cognitivas e de progressão da doença e declínio funcional (Eustace et al. 2002; Mok et al. 2004; Raudino 2013; Li et al. 2014), com efeitos perturbadores nos doentes e seus cuidadores (Geda et al. 2013).

1.3.6.1 Defeito Cognitivo Ligeiro

O aumento do interesse em estabelecer um diagnóstico precoce permitindo uma atempada intervenção levou ao conceito de um estado de transição entre envelhecimento normal e demência (AD prodrómica). Esta fase é amplamente conhecida como Defeito Cognitivo Ligeiro (DCL) e compreende indivíduos que têm um comprometimento cognitivo maior do que o esperado para a idade e nível de educação, mas não estão suficientemente incapacitados para serem classificados como dementes (Petersen et al. 1999; Petersen 2004; Petersen et al. 2005).

O DCL como entidade pré-demencial foi proposto inicialmente por Tierney e Bowen na década de 90 (Tierney et al. 1996; Bowen et al. 1997), evoluindo posteriormente para o conceito de uma entidade clínica que apresenta: (1) queixas de memória, especialmente se confirmadas por informador; (2) um compromisso em testes de memória, considerando os dados normativos para a idade e escolaridade; (3) outras capacidades cognitivas maioritariamente intactas; (4) atividades da vida quotidiana preservadas; (5) ausência de demência (Petersen et al. 1995; Petersen et al. 1999). Os mesmos autores reconheceram alguma subjetividade e heterogeneidade na apresentação clínica deste défice, propondo posteriormente várias subcategorias classificativas associadas a diferentes formas de demências: DCL-Amnésico (DCL-A) domínio único ou multidomínios, como forma pré-demencial de DA; DCL-não Amnésico (DCL-NA), domínio único ou multidomínios, como manifestação inicial de Degenerescência Lobar fronto-Temporal (defeito executivo ou afasia progressiva), de Demência com Corpos de Lewy (defeito executivo ou visuo-contrutivo) ou de Demência Vasculare (defeito multidomínios) (Petersen et al. 2001).

A distribuição por género baseada em estudos de meta-análise entre os dois sexos, encontrou maior prevalência de DCL entre as mulheres (Au et al. 2016), dados que vêm de encontro ao maior predomínio de mulheres com DA.

Diversos estudos, realizados em clínicas de memória de referência, têm demonstrado uma taxa de conversão, de doentes de DCL para DA, de 10% a 15% em cada ano (Petersen et al. 1999; Tierney et al. 2000; Dubois et al. 2010) com cerca de 80% dos doentes a converterem para DA num período de seguimento de seis anos (Petersen et al. 1999). Esta assunção de risco, quando comparada com 1 a 2% ao ano apresentada por controlos saudáveis sem alterações cognitivas, é um dos aspetos determinantes desta entidade prodrómica e está na base da atenção que lhe é dedicada pela investigação científica (Barrios et al. 2012).

Com base nesta informação, considera-se que o estadio DCL seja a janela temporal ideal para a implementação de estratégias de intervenção potencialmente curativas ou estabilizadoras (Petersen et al. 2005). Assim, a identificação de marcadores de progressão é um objetivo da investigação, procurando-se indicadores dessa evolução, sejam através da aplicação de testes neuropsicológicos (Gallagher et al. 2010), ou através de biomarcadores de imagem ou de produtos biológicos como o LCR (Dean et al. 2010) ou a conjugação destes vários meios complementares (Ewers et al. 2010).

1.3.6.2 Diagnóstico de DA

Um diagnóstico precoce da doença é um objetivo muito importante, sendo um contributo decisivo para o seu possível tratamento e para o planeamento dos recursos assistenciais e económicos. Neste sentido, tem-se vindo a assistir a uma mudança conceptual a nível dos critérios de diagnóstico da DA, que está intimamente ligada ao desenvolvimento e implementação na prática assistencial de biomarcadores da doença.

1.3.6.2.1 Biomarcadores na DA

Um biomarcador foi definido pelo *National Institutes of Health Biomarkers – Definition Working Group*, como “uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de um processo fisiológico, patogénico ou resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica” (Group 2001). Assim, a identificação de biomarcadores com valor clínico é útil não só para aumentar a certeza do diagnóstico, como também para avaliar o risco de desenvolvimento de doença, o prognóstico e o efeito de uma intervenção terapêutica no curso da doença. Segundo o *Working Group on Molecular and Biological Markers of AD*, um marcador ideal deverá: estar associado a uma característica fundamental da fisiopatologia da doença e ser validado em casos com confirmação neuropatológica; apresentar uma sensibilidade para detetar a DA superior a 80% e uma especificidade também superior a 80% para a distinguir de outras formas de demência; ser fiável, reproduzível e avaliado de forma não-invasiva, simples e pouco dispendiosa (Davies et al. 1998). Durante as últimas duas décadas, um grande esforço tem sido empregue na identificação de biomarcadores para a DA, e vários têm sido efetivamente incorporados em critérios de diagnóstico para a DA (McKhann et al. 1984; McKhann et al. 2011; Dubois et al. 2014), introduzidos na prática clínica diária, sendo também cada vez mais usados em ensaios clínicos, quer para a monitorização dos efeitos farmacocinéticos de estratégias modificadoras da doença, quer como critério de inclusão como marcadores de substituição *in vivo* para a confirmação da neuropatologia típica da DA.

Tipicamente, os biomarcadores da DA são divididos em duas categorias: os marcadores de deposição amiloide e os marcadores de neurodegeneração (Jack et al. 2010), sendo

que, mais recentemente esta classificação foi redefinida de modo a incluir três categorias: marcadores de agregação β -amiloide (A), de agregação da proteína Tau (T) e de neurodegeneração (N), a chamada classificação A/T/N (Jack et al. 2016). Dentro de cada categoria, existem vários marcadores possíveis, sendo que, quer a patologia amiloide quer a patologia tau podem ser avaliadas através de técnicas de neuroimagem ou pela análise do LCR.

Apesar da sua colheita ser obviamente um pouco invasiva, o LCR tem sido o fluido biológico mais usado na identificação de biomarcadores na DA, pois pelo facto de proximidade ao sistema nervoso central, reflete melhor as alterações que aí ocorrem, relativamente ao sangue, apesar da maior facilidade na obtenção deste. Os três biomarcadores clássicos para a DA avaliados no LCR são: o peptídeo A β com 42 aminoácidos, a proteína Tau total e a sua forma fosforilada no resíduo de treonina 181 (p-Tau) (Blennow et al. 2015). Na DA, os níveis do peptídeo A β 42 no LCR apresentam uma diminuição de cerca de 50%, enquanto a Tau total e a p-Tau apresentam aumentos de cerca de 300%, quando comparados com indivíduos sem deterioração cognitiva (Olsson et al. 2016). No entanto, de uma forma geral, os valores de especificidade relativamente a outras formas de demência, tendem a não ultrapassar os 80%, registando-se alguma sobreposição dos valores destes biomarcadores entre grupos. Por exemplo, uma diminuição dos níveis de A β 42 no LCR, apesar de não tão pronunciada como na DA, tem sido observada numa percentagem significativa de doentes com Demência Vascular (Bjerke et al. 2011), DCLewy (Slaets et al. 2013; Leitão et al. 2015) e DLFT (Baldeiras et al. 2015), podendo estar relacionada com uma concomitante patologia DA (no caso da DCLewy), ou com outras características patofisiológicas não associadas à formação de placas senis (no caso da DLFT e DV). Também a proteína Tau, pode aparecer aumentada no LCR de doentes com outras formas de demência, como por exemplo a DLFT (Baldeiras et al. 2015), que também se pode caracterizar por patologia Tau, ou particularmente na doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD) (Baldeiras et al. 2009), onde a rapidez do processo degenerativo dá origem a um aumento massivo desta proteína no LCR. Neste último caso, contudo, é particularmente relevante a quantificação da razão entre a p-Tau e a Tau total, uma vez que a primeira aumenta muito ligeiramente, levando a que esta razão se apresente muito diminuída nos doentes com CJD (Leitão et al. 2016).

Para além do diagnóstico diferencial de demência, os biomarcadores do LCR também têm demonstrado, quer em estudos longitudinais de coortes isoladas (Hansson et al. 2006;

Hertze et al. 2010; Santana et al. 2018), quer em estudos multicêntricos (Mattsson et al. 2009; Shaw et al. 2009; Visser et al. 2009), a capacidade de distinguir doentes de DCL que progridem para DA daqueles que permanecem estáveis ou progridem para outras formas de demência. De uma forma geral, a combinação dos três biomarcadores de LCR, apresenta uma acuidade para esta diferenciação superior a 80%, estando a assinatura característica destes biomarcadores de LCR na DA (redução do peptídeo A β 42 e aumento da Tau e p-Tau) já presente no estadio de DCL dos doentes que progridem (Olsson et al. 2016).

Ao contrário da análise do LCR, os métodos de neuroimagem, como a ressonância magnética (MRI) e a tomografia por emissão de positrões (PET), são técnicas minimamente invasivas e que permitem obter informação sobre a localização anatómica das alterações patológicas ao longo do tempo. A MRI é uma técnica de imagem estrutural que permite detetar anomalias na estrutura cerebral com alta resolução. A atrofia do hipocampo e do córtex entorinal são duas das alterações cerebrais mais precoces que ocorrem na DA e que podem ser avaliadas pela MRI. No entanto, estes achados são pouco específicos para o diagnóstico de DA, e podem ser encontrados noutros tipos de demência (Frisoni et al. 2010).

36

A PET é a técnica de neuroimagem mais promissora, permitindo medir alterações no metabolismo cerebral. Através da marcação com Fluorodeoxiglicose (FDG-PET), que mede a absorção de glicose a nível cerebral, é possível observar o hipometabolismo no cérebro de doentes de DA. Este é mais acentuado no córtex parietal, temporal e cingulado posterior, apresentando valores de especificidade e sensibilidade na ordem dos 80-90%, em relação a controlos saudáveis (Herholz et al. 2002). A introdução do PET amiloide, com recurso a traçadores como composto de Pittsburgh (PIB), que marca as placas senis, F-florbetapir, flutemetamol ou florbetaben, que se ligam à β -amiloide fibrilar, constituiu um marco importante na investigação de biomarcadores da DA, permitindo a observação *in vivo* da patologia amiloide e apresentando uma forte associação à carga da patologia amiloide evidenciada *post-mortem* (Sabri et al. 2015). Estes radioligandos apresentam uma elevada sensibilidade e especificidade para diferenciar entre doentes com DA e controlos normais e também outras formas de demência, tendo-se verificado uma elevada correlação entre um aumento na captação de amiloide por estes compostos e uma diminuição dos níveis de A β 42 no LCR (Fagan et al. 2006). Por outro lado, o uso do PET amiloide tornou também claro que 20 a 30% dos idosos aparentemente saudáveis

apresentam uma marcação positiva nestes exames (Jack et al. 2014). Mais recentemente, tem-se vindo a desenvolver traçadores para a patologia Tau, como é o caso do AV1451 (Villemagne et al. 2017), no entanto a PET-Tau não é ainda usada para o diagnóstico de DA, mas apenas, para já, em estudos de investigação.

A utilização sistemática e controlada de biomarcadores em estudos prospetivos de grandes coortes de DCL e idosos saudáveis, de que é exemplo paradigmático o Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI - www.loni.ucla.edu/ADNI), permitiu elucidar o padrão de progressão temporal dos biomarcadores. Esses estudos indicam que a deposição de amiloide será um evento mais precoce e, nesse sentido, os biomarcadores da A β (acumulação/retenção de amiloide na PET e a redução dos níveis da A β 42 no LCR) foram classificados como marcadores precoces e, dada a sua elevada especificidade, são atualmente marcadores de patologia; os restantes biomarcadores associados com a patologia Tau e neurodegeneração (atrofia na MRI estrutural, hipometabolismo evidenciado no FDG-PET e aumento dos níveis de Tau e/ou p-Tau no LCR) revelaram-se menos específicos, pelo que foram propostos como indicadores de progressão (Jack et al. 2009; Misra et al. 2009; Buchhave et al. 2012; Yau et al. 2015). Utilizando esta proposta hierárquica de biomarcadores, Jack e colaboradores (Jack et al. 2010; Jack et al. 2014; Jack et al. 2016) propuseram um modelo cronológico dinâmico, que considera que os marcadores da patologia amiloide antecedem em 10 a 20 anos os primeiros sinais clínicos de doença (o estadio DCL) e atingem uma fase de estado assintomático antes desta fase sintomática; pelo contrário, os biomarcadores de patologia Tau/neurodegenerescência tornam-se dinâmicos depois dos marcadores de patologia amiloide e apresentam uma progressão contínua ao longo da doença (ver figura 1.8)

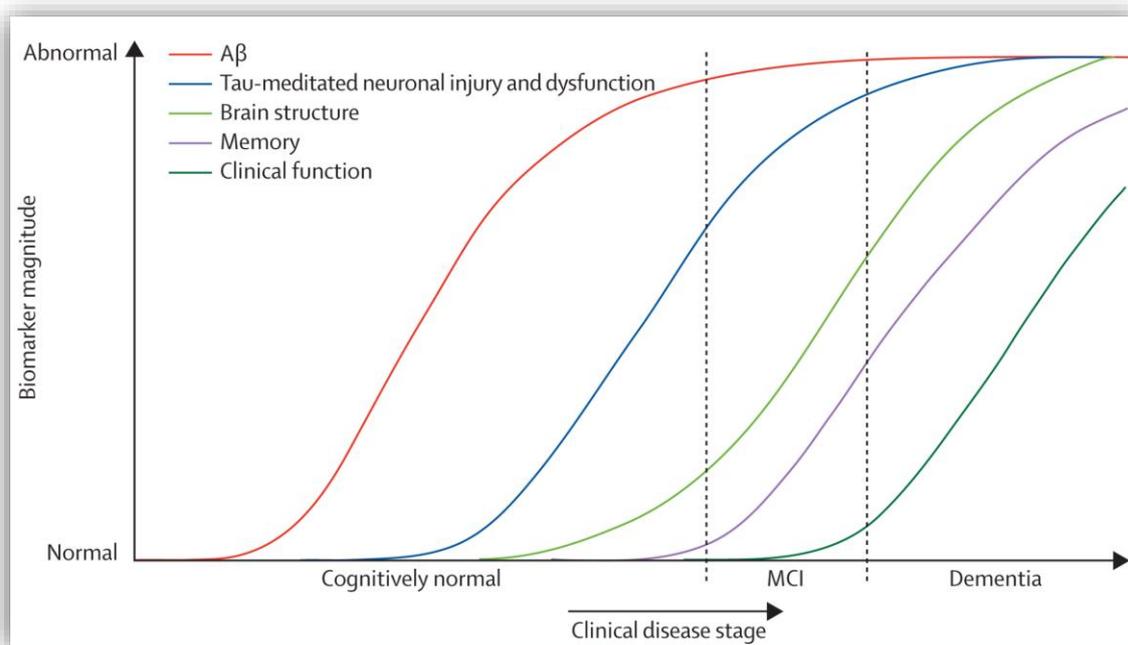


Figura 1.8 – Modelo hipotético de dinâmica dos biomarcadores entre envelhecimento normal, DCL e Demência. (Jack et al. 2010).

Esta alteração temporalmente faseada dos diferentes biomarcadores foi também comprovada no estudo da *Dominantly Inherited Alzheimer Network* (DIAN), um estudo internacional realizado em famílias com DA autossômica dominante (Bateman et al. 2012). Neste trabalho foram comparadas medidas clínicas e de biomarcadores em portadores assintomáticos de mutações associadas a esta forma da doença, e as alterações registadas foram relacionadas com a idade expectável de início da doença para cada mutação. Este estudo, mostrou uma alteração dos marcadores de patologia amiloide 15-25 anos antes da idade expectável de início da doença, enquanto os marcadores de morte neuronal apenas apresentaram alterações 10-15 anos antes da idade expectável de início da doença.

Este modelo hipotético do padrão temporal de alteração dos diferentes biomarcadores para a DA tem sofrido algumas modificações, reconhecendo atualmente que, nalguns casos, as alterações na Tau podem aparecer primeiro do que as da Aβ, podendo, no entanto, situar-se abaixo do limite de deteção dos biomarcadores *in vivo* (Jack et al. 2013). A taupatia poderá, numa fase inicial, ser independente das alterações patofisiológicas da Aβ, mas uma vez que estas se desenvolvam, promovem a aceleração da patologia tau. Segundo esta hipótese, as alterações amiloide não são suficientes, mas são essenciais para o desenvolvimento dos sintomas clínicos. Contudo, outros autores sugerem outras vias

para o desenvolvimento da DA esporádica, e esta visão de que o diagnóstico da DA implica um marcador positivo de patologia amiloide, hoje em dia, não é consensual (Jack et al. 2016; Santana et al. 2018).

Como vimos anteriormente, os únicos métodos validados para a identificação de biomarcadores de DA, são métodos de neuroimagem ou determinações no LCR, daí que a identificação de um marcador periférico, suficientemente sensível e fiável para ser usado no diagnóstico precoce da DA seja desejável, pois trata-se de um método menos invasivo, envolvendo custos menores. No entanto, a identificação de biomarcadores periféricos apresenta sérias barreiras metodológicas. O sangue representa uma matriz complexa, separada do cérebro pela barreira hemato-encefálica, que permite que apenas uma pequena fração das proteínas cerebrais passem para a corrente sanguínea. Uma vez no sangue, esta pequena quantidade de proteínas de origem cerebral será diluída num compartimento com elevada concentração de outras proteínas como a albumina e imunoglobulinas, que representam uma fonte de interferência para os métodos analíticos. Além disso, estas proteínas cerebrais poderão ainda ser degradadas por proteases, metabolizadas no fígado ou eliminadas pelos rins.

Apesar de todas estas dificuldades, recentemente têm sido obtidos resultados promissores na identificação de biomarcadores periféricos para a DA.

Neste sentido, um estudo que envolveu um total de 121 indivíduos do *Japanese National Center for Geriatrics and Gerontology* (NCGG) (incluindo indivíduos com DCL, cognitivamente normais e doentes), foi possível medir o peptídeo β -amiloide plasmático, cujos resultados foram posteriormente validados num cohort de 252 indivíduos do *Australian Imaging, Biomarker and Lifestyle Study of Ageing* (AIBL) diagnosticados previamente através de PIB-PET ou outros ligandos. Além disso, os resultados foram correlacionados com a carga de amiloide no PET e com os níveis de A β 42 no LCR, mostrando uma potencial utilidade clínica dos biomarcadores plasmáticos na previsão da carga amiloide cerebral a nível individual (Nakamura et al. 2018).

Avanços recentes, com recurso a métodos imunoenzimáticos ultrasensíveis, têm também permitido a quantificação de marcadores de neurodegeneração como a Tau total, a Tau hiperfosforilada ou outras proteínas derivadas do citoesqueleto axonal, como as cadeias de neurofilamentos, em fluidos periféricos (Mattsson et al. 2017; Tatebe et al. 2017).

Apesar destes resultados ainda necessitarem de validação, apresentam, sem dúvida, uma perspectiva promissora para o desenvolvimento de biomarcadores periféricos para a DA.

1.3.6.2.2 Evolução dos critérios de diagnóstico de DA

A doença de Alzheimer (DA) foi inicialmente definida como um tipo de demência, cujos critérios de diagnóstico foram estabelecidos pelo *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA)* (Mckhann et al. 1984), pela quarta edição da *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)* (American Psychiatric Association. et al. 1994), e pela décima revisão da *International Classification of Diseases (ICD-10)* (WHO 1992). Segundo estes critérios são previstas 3 categorias de diagnóstico i) Possível, quando a clínica é considerada atípica ou se evidenciarem patologias passíveis de contribuir para o defeito cognitivo, ii) Definitivo, quando para além de uma clínica típica a confirmação do diagnóstico é feita através do exame histológico post-mortem, iii) Provável, quando os indivíduos ainda vivos, apresentam uma clínica sugestiva e foram excluídas outras causas possíveis para o défice cognitivo. Quando aplicados por clínicos especialistas, estes critérios apresentavam um valor preditivo de diagnóstico clínico de DA positivo de 80% e negativo de 60% quando comparada com os resultados de exame post-mortem (Beach et al. 2012).

No entanto, como mencionado anteriormente na secção 1.3.6.2.1, com os estudos dos biomarcadores, a definição temporal do início da DA foi reconsiderado. Assim, a presença do processo patológico característico da DA pode ser identificado anos antes do início da doença e a demência representa uma fase tardia de todo o processo biológico da DA. Deste modo, com base na informação dos biomarcadores, a DA pode ser reconhecida como uma doença progressiva que evolui a partir de alterações biológicas no cérebro não acompanhadas de qualquer comprometimento cognitivo para um estadio de défice de memória já acompanhado por alterações de biomarcadores indicativos de DA, que pode compreender estadios leves, moderados, severos e profundos de demência.

Neste sentido, Dubois e colaboradores em 2007, no âmbito do *International Work Group (IWG)*, desenvolveu novos critérios para o diagnóstico de DA como uma entidade clínico-biológica (Dubois et al. 2007) e produziu mais tarde em 2010, um léxico de terminologia para ajudar na interpretação destes novos critérios (Dubois et al. 2010). Segundo esta

proposta, o diagnóstico da DA pode ser realizado em indivíduos vivos e não depende da confirmação da autópsia. Houve assim uma mudança do paradigma clínico-patológico para um paradigma clínico-biológico. Foram ainda reconhecidas três fases da DA; uma fase pré-clínica assintomática da DA acompanhada por alterações nos biomarcadores, uma fase que envolve déficit cognitivo também com alterações nos biomarcadores e, uma fase de demência.

Posteriormente em 2011, o *National Institute on Aging/Alzheimer's Association (NIA/AA)* estabeleceu três grupos de trabalho para desenvolver definições e critérios para estas três fases da DA: fase pré-clínica, fase sintomática pré-demencial da DA conhecida por “DCL devido a DA” e demência devido a DA (Albert et al. 2011; McKhann et al. 2011; Sperling et al. 2011). Estes critérios partilham muitas das características dos critérios estabelecidos no âmbito do IWG, incluindo o reconhecimento de uma fase pré-clínica longa, que pode constituir uma oportunidade crucial para uma intervenção terapêutica atempada e eficaz, a identificação de uma fase pré-demencial sintomática de DA, a retenção de critérios para a fase de demência da DA, a integração de biomarcadores no processo de diagnóstico e a categorização de dois tipos de biomarcadores: os que permitem identificar a deposição amiloide e os que permitem identificar a neurodegeneração. Com a aplicação destes novos critérios registou-se um acréscimo no número de pessoas diagnosticadas com DA, bem como também aumentou o tempo que essas pessoas sabem que têm a doença (Cummings 2012).

Posteriormente, Dubois e colaboradores em 2014 (Dubois et al. 2014) procuraram colmatar algumas das limitações sentidas com o uso destes critérios e propuseram alguns avanços para melhorar o diagnóstico da DA no âmbito de investigação denominados, Critérios IWG-2. Segundo estes autores, o diagnóstico da DA poderia ser simplificado, requerendo a presença de um fenótipo clínico DA (típico ou atípico) e um quadro fisiopatológico consistente com a presença da patologia de DA. Foram estabelecidos critérios de diagnóstico específicos para formas típicas e atípicas de DA, para DA mista, e para os estadios pré-clínicos da DA. Ainda no âmbito deste trabalho, procedeu-se à diferenciação entre biomarcadores de diagnóstico e de progressão da DA. Neste sentido, o diagnóstico de investigação para DA típica pode ser realizado na presença de um síndrome amnésico do tipo hipocampo que pode estar associado a várias alterações cognitivas ou comportamentais e pelo menos uma das seguintes alterações sugestivas de uma patologia de Alzheimer *in vivo*: um perfil do LCR compatível com DA (diminuição

dos níveis de A β 42 e um aumento da t-Tau ou p-Tau), ou um aumento específico de agregados amiloide no PET. Os marcadores topográficos mostraram não ser específicos da patologia de DA e foram removidos do algoritmo de diagnóstico do IWG, podendo ser usados apenas para medir a progressão da doença.

Vemos assim, que com o desenvolvimento de biomarcadores patológicos da DA, o conceito da fase pré-clínica da DA evoluiu e é agora reconhecida quando estes biomarcadores estão presentes em indivíduos cognitivamente normais. No entanto, os desafios para produzir uma definição única para uma cognição normal, para declínio cognitivo, e para a melhor assinatura da patologia DA *in vivo*, continuam a ser grandes.

Recentemente, em 2018 a NIA-AA, estabeleceu uma definição biológica da DA no âmbito de investigação. Como vimos anteriormente, a DA é definida pelos processos patológicos subjacentes ao seu desenvolvimento que podem ser comprovados por exames pós-mortem ou pela análise de biomarcadores *in vivo*. Os biomarcadores são geralmente agrupados em: marcadores de deposição amiloide (A), de patologia tau (T) e de neurodegeneração ou danos neuronais (N) [AT(N)]. Estes autores definiram oito perfis de biomarcadores dicotomizando em “+” e “-“ cada um destes três biomarcadores. Com base nestes perfis, cada indivíduo pode ser colocado em cada uma de três categorias gerais de biomarcadores: biomarcadores normais de DA, biomarcadores não associados a DA e Alzheimer *continuum*. Embora seja possível que as placas β -amiloide e as tranças neurofibrilares constituídas pela proteína Tau, não sejam causadoras da DA, são esses depósitos proteicos anómalos que definem a DA como uma única doença neurodegenerativa entre outras doenças que podem culminar em demência. Assim, estes autores definiram a DA como uma entidade biológica com determinadas características permitindo uma melhor caracterização e compreensão da sequência de eventos que leva ao comprometimento cognitivo associado com DA, assim como a uma etiologia multifactorial da demência. Esta abordagem também permitirá uma intervenção terapêutica mais precisa, direcionada a vias específicas envolvidas no processo da doença e em pessoas previamente selecionadas (Jack et al. 2018).

1.3.7 Terapêutica

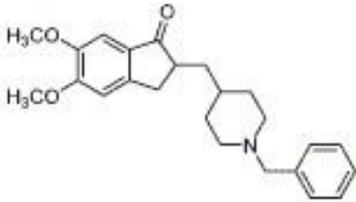
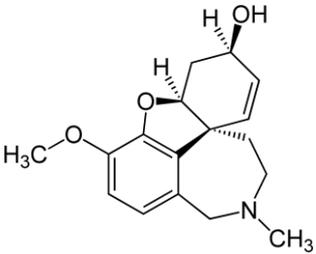
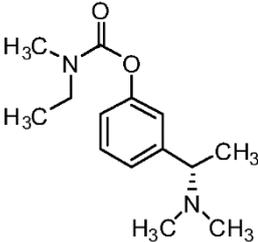
A procura de soluções terapêuticas constitui um desafio difícil, para qualquer patologia, mas sobretudo para a DA, dada a complexidade desta doença (Bolognesi et al. 2009).

Na tentativa de encontrar estratégias terapêuticas que permitissem uma melhoria dos sintomas manifestados por doentes com DA, e tendo conhecimento do défice colinérgico, descrito na secção 1.4, associado à doença, procuraram-se mecanismos compensatórios da sua ação. Isso levou a que fosse colocada a hipótese de que a administração de precursores de acetilcolina, ou a mimetização dos seus efeitos, com recurso a agonistas dos seus recetores, fosse compensadora do declínio cognitivo em doentes de DA (Amenta et al. 2001).

A procura de meios que levassem à diminuição da atividade das enzimas hidrolíticas do neurotransmissor, foi a abordagem seguida. Pelo que, o desenvolvimento e uso de inibidores das colinesterases (ChEIs), constituiu uma estratégia potenciadora do aumento da ação da acetilcolina, na fenda sináptica, pela diminuição da sua hidrólise.

A tacrina foi a primeira substância, com efeitos inibidores das colinesterases, a ser usada para melhoria dos efeitos sintomáticos da DA. Contudo os seus efeitos colaterais adversos, nomeadamente de hepatotoxicidade (Birks et al. 2015), levaram à procura de alternativas farmacológicas. Hoje são de uso terapêutico, mais comum, como ChEIs, o donepezil, a galantamina e a rivastigmina (Allain et al. 2003; Hogan 2014). Enquanto os dois primeiros têm um efeito inibitório exclusivo sobre a acetilcolinesterase (AChE), a rivastigmina tem um efeito inibitório tanto sobre a AChE como sobre a butirilcolinesterase (BuChE) (Darreh-Shori et al. 2010; Parnetti et al. 2011).

Tabela 1.1 – Inibidores das colinesterases em uso para o tratamento da DA, estrutura química, posologia e alvo terapêutico.

Fármaco	Estrutura química	Posologia	Alvo terapêutico
Donepezil		10 mg/dia	Inibidor da AChE
Galantamina		16 mg/dia	Inibidor da AChE
Rivastigmina		6-12 mg/dia	Inibidor da AChE e da BuChE

Adaptado de Allain et al. 2003.

Diversos ensaios clínicos e estudos de meta-análise sobre o uso de inibidores de colinesterases em doentes com DA demonstraram uma melhoria modesta, mas estatisticamente significativa, em diversas medidas cognitivas e de funcionamento global.

Um ensaio clínico com galantamina evidenciou melhorias nos sintomas cognitivos, funcionais e comportamentais em comparação com placebo (Tariot et al. 2000). Também um ensaio clínico com donepezil que incluiu 290 doentes com formas moderadas a severas de DA, mostrou efeitos benéficos em aspetos cognitivos e comportamentais, relativamente ao placebo (Feldman et al. 2001). A análise da eficácia comparativa do donepezil e rivastigmina, que incluiu cerca de um milhar de participantes com DA

moderada a severa, mostrou efeitos cognitivos e comportamentais semelhantes entre os fármacos (Bullock et al. 2005)

De facto, vários estudos de revisão sistemática e meta-análises, que incluíram várias dezenas de ensaios clínicos randomizados, demonstraram que a terapêutica com ChEIs têm um efeito benéfico, embora modesto, sobre comportamentos neuropsiquiátricos e funcionais em doentes com DA (Trinh et al. 2003).

A qualidade de vida bem como a manifestação de efeitos colaterais decorrentes do uso de ChEIs também foram alvo de revisão sistemática, tendo sido observado menor declínio cognitivo em doentes sob terapêutica dos inibidores, durante um período temporal de 6 meses, face a doentes com placebo, embora outros indicadores de qualidade de vida, não tenham sido elucidativos, por falta de indicadores claros dos estudos objeto desta revisão (Takeda et al. 2006).

Contudo, nem sempre foi reportado o mesmo nível de eficácia entre os fármacos, tendo um estudo de revisão sistemática e meta-análise, que incluiu 11 ensaios diferentes, reportado efeitos comportamentais benéficos na utilização de donepezil e galantamina, mas não com rivastigmina (Tan et al. 2014).

Alguma divergência de resposta a este tipo de terapêutica, por parte de alguns doentes, tem levado a encarar uma perspetiva farmacogenómica, dado que a capacidade e velocidade de metabolização destes fármacos e os seus consequentes efeitos podem ser afetados por mecanismos enzimáticos condicionados pela genómica (Takeda et al. 2011).

No entanto, dados os efeitos modestos, não existe consenso generalizado relativamente a diversas questões, tais como: quando iniciar a terapêutica, qual a sua duração ótima ou quando esta deve ser descontinuada, ao longo das diferentes fases da DA (Deardorff et al. 2015; Kobayashi et al. 2016). De facto, os resultados obtidos são meramente de tratamento sintomático e não tem sido evidenciado qualquer efeito modificador da doença (Suh et al. 2011). Enquanto alguns estudos apoiam a necessidade de um uso continuado destes fármacos (Amuah et al. 2010), outros defendem uma utilização temporalmente limitada (Chalmers et al. 2009). Assim, o desenvolvimento de outras estratégias terapêuticas tem constituído um desafio importante, particularmente de abordagens com propriedades modificadoras da doença, que permitam atrasar ou até mesmo parar a progressão da patologia em fases muito precoces, ou mesmo assintomáticas. Tendo em conta que uma boa parte das alterações patológicas presentes no cérebro de doentes com

DA são agregados proteicos de β -amiloide e de Tau, grande parte das estratégias modificadoras da doença têm-se concentrado nestes dois alvos terapêuticos. Assente na teoria da cascata amiloide, várias abordagens que intervêm em diversos níveis da cascata têm sido propostas (Hampel et al. 2014).

As terapêuticas dirigidas à β -amiloide têm como objetivo: reduzir a produção de $A\beta$ através da modulação da γ - e β -secretases; facilitar a eliminação de $A\beta$, através de imunoterapia; ou prevenir a sua agregação, através de agentes que induzem quebras nas cadeias beta ou de inibidores de *chaperones* (Anand et al. 2014). As estratégias de modulação do metabolismo da APP foram as primeiras a ser exploradas, mas sem resultados muito convincentes. Os inibidores da γ -secretase revelaram-se tóxicos e com efeitos secundários graves, enquanto as duas primeiras gerações de inibidores de β -secretase não demonstraram grande efeito, apresentando alguma hepatotoxicidade. Mais recentemente, uma terceira geração deste tipo de inibidores apresentou dados encorajantes de farmacocinética e encontra-se a ser testada em ensaios clínicos que englobam desde indivíduos assintomáticos, indivíduos em fase pré-clínica da doença a doentes com DA ligeira a moderada (Kumar et al. 2018).

46

A imunoterapia tem sido, provavelmente, a estratégia mais promissora das terapêuticas dirigidas à β -amiloide. Inicialmente desenvolveram-se mecanismos de imunização ativa com recurso a peptídeos $A\beta$ ou seus análogos, que apesar dos efeitos promissores em ensaios clínicos, revelaram sérios problemas de segurança e efeitos secundários graves, como meningoencefalite severa (Holmes et al. 2008). Atualmente, três estratégias de vacinação ativa, desenhadas de modo a diminuir a possibilidade de autoimunidade, encontram-se a ser testadas em ensaios clínicos: CAD106 (Novartis) que contem o peptídeo $A\beta_{1-6}$ (Farlow et al. 2015); ACI-24 (AC Immune), constituída pelo peptídeo $A\beta_{1-15}$ tetra-palmitoilado (Muhs et al. 2007) e UB-311 (United Neuroscience Ltd), que consiste em dois peptídeos $A\beta_{1-14}$ sintéticos (Wang et al. 2017). Em alternativa a este tipo de imunoterapia, considerou-se também a imunização passiva com recurso a anticorpos monoclonais purificados (mAb) contra o peptídeo $A\beta$ (Hampel et al. 2014).

Estes anticorpos, uma vez atravessando a barreira hemato-encefálica, podem atuar de diversas formas: diminuem a formação de agregados tóxicos através do estabelecimento de complexos $A\beta$ -mAb; podem ativar a via citotóxica dependente do complemento que irá induzir lise celular. À periferia, podem induzir o chamado “efeito de pia”, pois os mAbs ao ligarem-se aos peptídeos $A\beta$ em circulação no sangue periférico, podem levar

ao estabelecimento de um gradiente de concentração que leva ao efluxo dos peptídeos A β do cérebro. No entanto, esta abordagem também apresenta alguns problemas, como a capacidade de assegurar a passagem do mAb pela barreira hemato-encefálica, a dificuldade em selecionar o alvo antigénico apropriado, custos elevados, necessidade de administrações repetidas, risco de hemorragias e a possibilidade de ativação de uma reação autoimune contra o mAb (Wisniewski et al. 2015). A primeira terapia de imunização passiva para a DA foi o desenvolvimento de *Bapineuzumab* (Janssen/Pfizer), um anticorpo monoclonal humanizado contra o N-terminal (resíduos 1-5) do peptídeo A β , que não mostrou evidências de benefícios clínicos em ensaios clínicos de fase III, para além de ter evidenciado *Amyloid-related Imaging Abnormality* (ARIA-E) em alguns doentes, o que levou à sua descontinuação (Cummings et al. 2017). Seguiram-se então ensaios de fase II e III com *Solanezumab* (Eli Lilly), que apesar de ter demonstrado induzir um aumento dependente da dose dos níveis de A β 42 no LCR e plasma, não evidenciou melhorias clínicas nos indivíduos tratados (Imbimbo et al. 2012). Ensaios mais recentes de fase III com outros mAb, como o *Gantenerumab* (Hoffman – LaRoche), o *Crenezumab* (Genentech), ou o *Aducanumab* (Biogen), foram desenvolvidos, tendo como população alvo quer doentes com DA moderada quer formas prodrómicas de DA (Cummings et al. 2017). Nalguns casos, estes ensaios envolveram indivíduos com formas genéticas de DA, como é o caso do ensaio da *Alzheimer's Prevention Initiative* (API), que avalia o efeito do *Crenezumab* em indivíduos portadores de mutações no gene da *PSEN1* (Corbyn 2013). Outra estratégia de imunização passiva que tem levantado algum interesse para o tratamento da DA é a administração intravenosa de imunoglobulinas (IVIG) provenientes de voluntários saudáveis e que contêm quantidades significativas de anticorpos anti-A β naturais. Um estudo piloto com cinco doentes de DA submetidos a IVIG demonstrou uma diminuição dos níveis de A β no LCR e um aumento no soro (Dodel et al. 2004), no entanto uma análise preliminar de um ensaio de fase III não revelou melhorias significativas nas medidas cognitivas (Anand et al. 2014).

Uma vez que a patologia tau parece estar mais diretamente relacionada com os sintomas, progressão e severidade da DA, também a hiperfosforilação e agregação da proteína Tau têm sido o foco de diversas estratégias terapêuticas. Esta abordagem tem envolvido o uso de: inibidores de cinases que catalisam a sua fosforilação, como é o caso do valproato ou cloreto de lítio para inibir a GSK-3 β ; agentes estabilizadores dos microtúbulos, como por exemplo o *Paclitaxel* ou *Epothilone D*; pequenas moléculas que impedem a agregação da Tau ou ainda agentes que estimulam a degradação da Tau (Li et al. 2017).

Também a imunoterapia anti-Tau tem emergido como uma estratégia terapêutica com potencial (Pedersen et al. 2015). Os primeiros ensaios com vacinas direcionadas à Tau encontram-se em curso: a AADvac-1 (Axon Neuroscience SE), um peptídeo sintético derivado dos resíduos 294-305 da Tau, que estão envolvidos na sua oligomerização (Pedersen et al. 2015); a ACI-35 (AC-Immune/Janssen), uma vacina com base em lipossomas que contêm um peptídeo sintético da Tau (393-408) fosforilado nos resíduos de serina 396 a 404 (Theunis et al. 2013). Estratégias de imunização passiva com anticorpos monoclonais contra formas fosforiladas da Tau têm começado também a emergir e têm mostrado efeitos benéficos em modelos animais transgênicos (Boutajangout et al. 2011; Chai et al. 2011; d'Abramo et al. 2013). Em humanos, alguns ensaios clínicos de fase I e II foram iniciados com doentes com DA e também com outras tauopatias, como a paralisia supranuclear progressiva (PSP). É o caso do anticorpo anti-Tau humanizado RG6100 (Genentech), dirigido ao epítipo fosforilado pS422 e do BMS-986168 (BMS/iPeirian), dirigido contra formas extracelulares da Tau truncadas a nível do N-terminal (Li et al. 2017).

Os efeitos secundários adversos e ausência de eficácia dos primeiros ensaios com estratégias modificadoras da doença dirigidas à β -amiloide por certo reafirmaram o entusiasmo inicial, acabando por levar ao abandono e falha de algumas destas tentativas modificadoras da DA (Amanatkar et al. 2017). No entanto, a melhoria na metodologia dos ensaios clínicos, o refinamento das abordagens de imunoterapia dirigidas à $A\beta$, bem como o desenvolvimento de estratégias com novos alvos terapêuticos, têm contribuído para a manutenção do investimento nesta área. De facto, em 2017 encontravam-se em fase de teste ativo 105 agentes, distribuídos por 29 ensaios de fase I, 68 de fase II e 42 de fase III envolvendo doentes em estado pré-clínico, prodrómico, médio a moderado e mesmo severo de DA (fig.1.9) (Cummings et al. 2017).

1.4. O SISTEMA COLINÉRGICO

O sistema colinérgico começou por ser identificado pela sua ação de neurotransmissão (Pohanka 2011) em tecidos nervosos, glandulares e musculares de várias espécies animais, incluindo o homem (Sattelle et al. 1990). Veio a verificar-se que este sistema tem ampla distribuição noutros tipos celulares (Wessler et al. 1999). Assim, para além da importância das vias colinérgicas nas células do sistema nervoso, a sua identificação nas células não neuronais (Jonsson et al. 2007), tem remetido para outras funções de sinalização e proliferação celular (Campoy et al. 2016). Também pela sua capacidade de inibição da secreção de citocinas inflamatórias (Martin et al. 2018) está associado com o sistema imune e inflamatório (Cerejeira et al. 2012).

O sistema colinérgico basal do cérebro compreende os septos mediais, horizontais e diagonal da banda de Broca e núcleos basais de Meynert, que constituem as projeções colinérgicas para o córtex cerebral e o hipocampo (Schliebs et al. 2010).

50

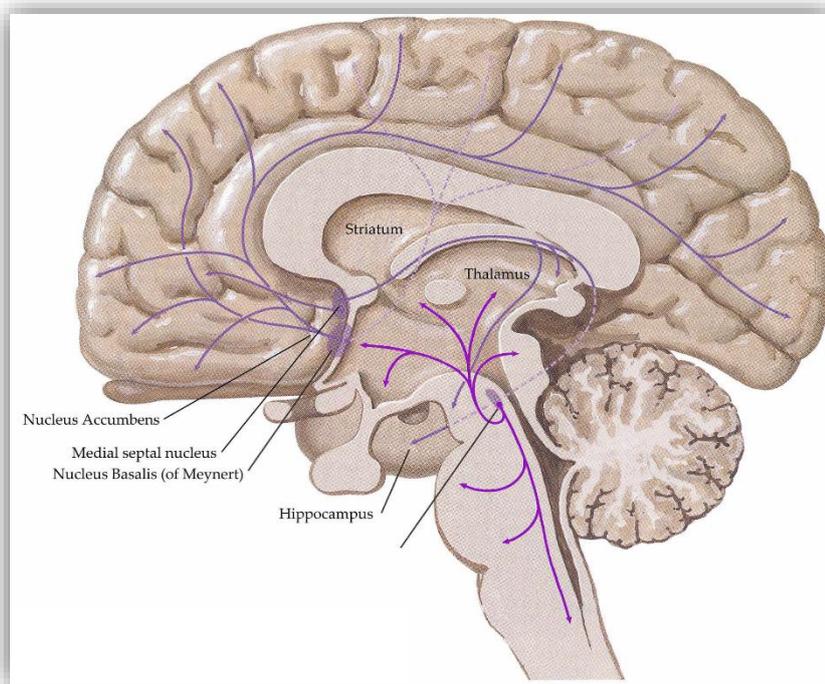


Figura 1.10 – Representação esquemática da inervação colinérgica central humana. Linhas coloridas – vias de projeções do sistema colinérgico central dos corpos celulares assinalados para as várias regiões cerebrais; Corpos celulares assinalados e zonas de que irradiam ou recebem inervação colinérgica: hipocampo; tálamo; núcleo basal de Meynert; núcleo septo-media; estriado. Adaptado de Felten et al. 2010.

Esta inervação colinérgica, a nível do sistema nervoso central, tem um papel essencial em diversos domínios cognitivos (Bartus 2000), sendo também de grande importância no desenvolvimento do sistema nervoso, quer periférico (SNP), quer central (SNC) (Maurer et al. 2017). Os núcleos colinérgicos do proencéfalo basal parecem ser extremamente relevantes para os processos de formação de memória e atenção (Niewiadomska et al. 2010), modulando a atenção seletiva e o processamento dos estímulos sensoriais, bem como o pensamento associativo e domínios verbais (Drever et al. 2010; Peter et al. 2016). Em modelos animais foi comprovado o envolvimento do sistema colinérgico na memória espacial (Deiana et al. 2010) e sugerido também o seu envolvimento na ritmicidade da alternância do sono e vigília (Yamakawa et al. 2016).

O sistema colinérgico compreende a acetilcolina (ACh), as enzimas da sua síntese e transporte, respetivos recetores nicotínicos e muscarínicos e enzimas colinesterases reguladoras da sua ação (Campoy et al. 2016).

1.4.1 Acetilcolina

A acetilcolina (ACh) foi o primeiro neurotransmissor a ser identificado, contribuindo para a clarificação da ação deste tipo de moléculas, tendo a sua identificação e caracterização ficado a dever-se a Henry Dale e Otto Lowei, que por esse facto viram ser-lhes atribuído, em 1936, o prémio Nobel de Fisiologia ou Medicina (Contestabile 2011). A ACh é um neurotransmissor amplamente distribuído pelos sistemas nervoso central, periférico, autónomo e entérico (Abreu-Villaca et al. 2010), embora também tenha sido relacionado a células não neuronais, atuando nestas, como molécula sinalizadora (Campoy et al. 2016), gerando um conceito de “sistema colinérgico não neuronal” (de Almeida et al. 2010). Contudo, a maioria dos estudos tem-se centrado no papel da ACh como neurotransmissor (Uberti et al. 2017) e nas suas implicações no desenvolvimento e atividade do córtex cerebral, no fluxo sanguíneo, na alternância do ciclo de vigília e sono, bem como nas modulações de aspetos cognitivos, de aprendizagem, concentração e memória (Schliebs et al. 2010). Tendo em conta a distribuição do sistema colinérgico a nível do SNC e SNP, a ACh é encontrada em muitas áreas do cérebro, sendo secretada especialmente nos terminais axónios das células piramidais do córtex e em vários tipos

diferentes de neurónios dos gânglios basais e muitas outras células pré-ganglionares e pós-ganglionares do sistema nervoso autónomo (Guyton et al. 2000).

A Ach é sintetizada por ação da ChAT (EC 2.3.1.6) através da acetilação da Colina com Acetilcoenzima A (Haugaard et al. 2000). Após a sua síntese, a acumulação do neurotransmissor é feita em vesículas (Abreu-Villaca et al. 2010), por ação do Transportador Vesicular da Acetilcolina (VACHT). A sua libertação para a fenda sinática, ocorre por um mecanismo induzido pela despolarização (Wevers 2011). A fusão das vesículas que contêm o neurotransmissor com a membrana citoplasmática é dependente da propagação de um potencial de ação ao longo do axónio, indutor da abertura de canais de Ca^{2+} sensíveis a alteração de voltagem (Lodish et al. 1999).

A acetilcolina tem um papel essencialmente excitatório no SNC. Esta ação do neurotransmissor é desencadeado através da ligação a recetores de dois tipos: nicotínicos e muscarínicos, dado serem a nicotina e a muscarina, seus agonistas (Guyton et al. 2000). Os recetores nicotínicos, do tipo ionotrópico, são canais iónicos que apresentam uma estrutura pentamérica constituída pela combinação das subunidades α , β , γ , δ e ϵ , numa multivariada possibilidade de combinações (Albuquerque et al. 2009), dada a diversidade de formas que as subunidades α e β possuem (Dani et al. 2007). Relativamente aos recetores muscarínicos, do tipo metabotrópico, acoplados a proteínas G (Lodish et al. 1999), foram identificados cinco tipos (M1, M2, M3, M4 e M5), que modulam diferentes proteínas G e consequentes vias de sinalização celular (Hosey 1992) e que são expressos em células do sistema nervoso central e periférico (Eglen 2005).

Vários subtipos de recetores nicotínicos e muscarínicos são expressos em diferentes neurónios do hipocampo, com grande influência na bidirecionalidade da informação e plasticidade dessa zona cerebral (Drever et al. 2010).

A ação sináptica da ACh é regulada sobretudo pela sua hidrólise em colina e acetato, catalisada pelas colinesterases (ver secção 1.4.2) (Zimmerman et al. 2006). A recaptção da colina, para ressíntese de nova molécula de ACh, é feita pelo transportador de grande afinidade e dependente do gradiente de Na^+ (Sattelle et al. 1990) expresso no terminal da célula pré-sináptica (Suszkiw et al. 1976).

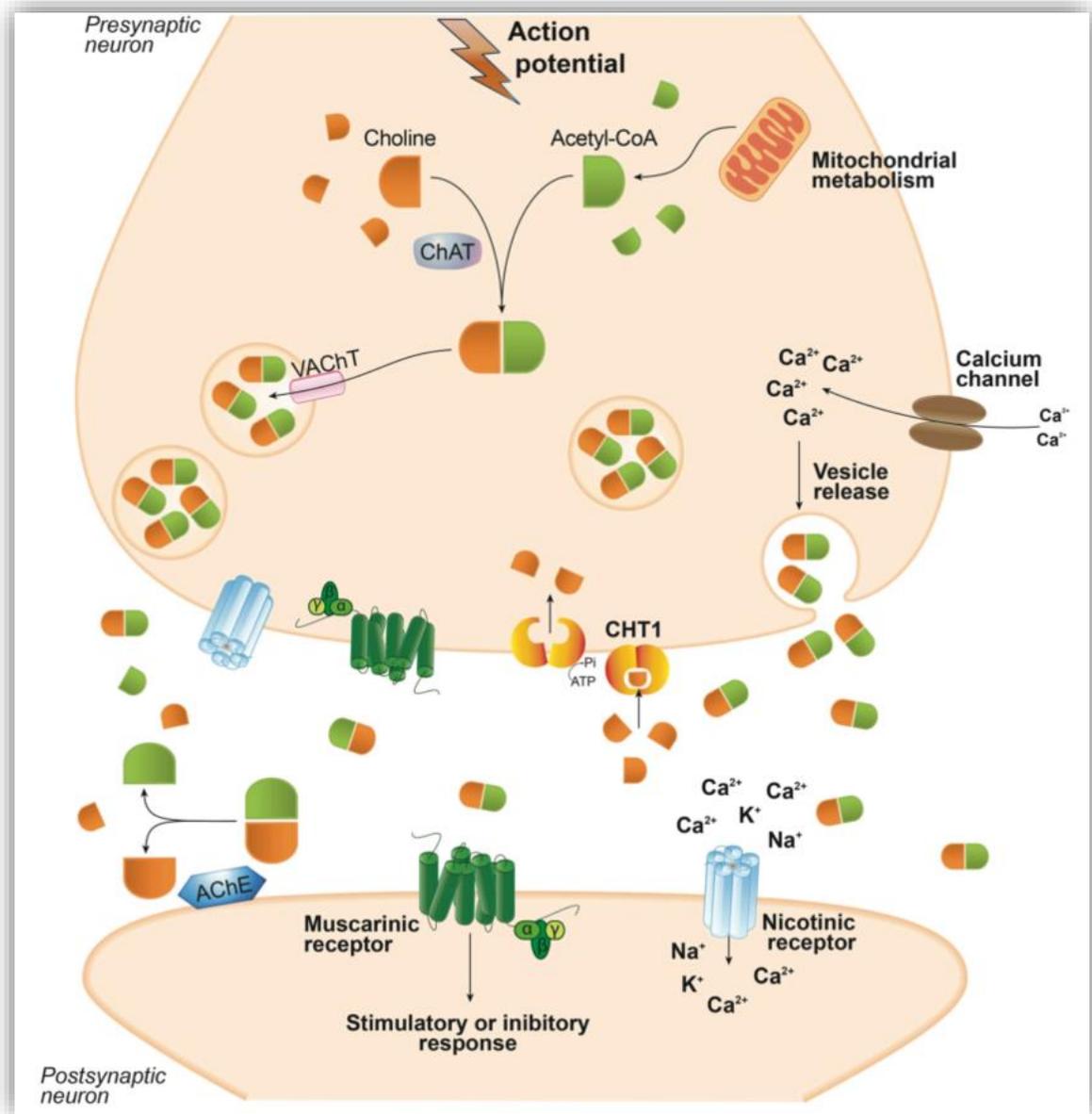


Figura 1.11 – Esquema de síntese da acetilcolina, liberação para a fenda sinática e recaptura para a célula pré-sináptica.

A partir de AcetilCoenzima A e Colina pela Colina Acetiltransferase (ChAT), sua acumulação em vesículas pela Vesicular Acetyl Transferase (VAcHT). A propagação do potencial de ação e abertura dos canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem com influxo de Ca^{2+} promove a fusão das vesículas e liberação de acetilcolina e sua ação sobre os receptores nicotínicos e muscarínicos, que é terminada pela ação hidrolítica da Acetilcolinesterase (AChE), sendo a Colina recaptada para a célula pré-sináptica, através dos transportadores de alta afinidade (CHT1) para ressíntese de novas moléculas de acetilcolina. (Ferreira-Vieira et al. 2016).

1.4.2 Colinesterases

As colinesterases (ChE) são enzimas hidrolíticas que pela hidrólise da ACh a colina e acetato modulam a atividade desenvolvida por este neurotransmissor (Pohanka 2011). As ChE que foram identificadas são a Acetilcolinesterase (AChE) (EC 3.1.1.7) (Datta et al. 1988) e a Butirilcolinesterase (BuChE) (EC 3.1.1.8) (Gnatt et al. 1991), sendo a especificidade pelo substrato e localização tecidual e celular diferenciadoras destas enzimas. Estas duas enzimas são serinas hidrólases (Chen et al. 2011) que têm um papel central na regulação da ação do sistema colinérgico, sendo codificadas por 2 genes distintos (Gnatt et al. 1991).

Desde há muito tempo que têm sido sugeridas outras atividades das ChE, que não somente as hidrolíticas (Balasubramanian et al. 1993), sendo a atividade destas enzimas associadas à modulação do sistema imune (Reale et al. 2018).

O recurso a inibidores destas enzimas exercem uma influência colinomimética, pois retardam a hidrólise da ACh e, conseqüentemente aumentam a sua biodisponibilidade – ver secção 1.3.7.

54

1.4.2.1 Acetilcolinesterase

A AChE é encontrada sobretudo nos músculos e cérebro, existindo em diferentes formas moleculares (Soreq et al. 1985) e localização celular, que condicionam a atividade desta enzima na hidrólise da ACh. Tem também sido sugerido um papel desta enzima no desenvolvimento e estabilidade dos neurónios (Layer 1995), o que leva a que a atividade da AChE, seja usada como um marcador da integridade do sistema colinérgico (Clos et al. 1989).

A AChE é codificada pelo gene *AChE*, composto por 6 exões (Hasin et al. 2004) e localizado no cromossoma 7q22, que por *splicing* alternativo origina 3 formas catalíticas (T, H e R) (Li et al. 1991) podendo a forma sinática (T), que é predominante, apresentar-se em formas monoméricas, designadas de formas globulares, ou em formas oligoméricas dimericas (G2) ou em tetrâmeros (G4) (Munoz-Delgado et al. 2010). A oligomerização da proteína ocorre no retículo endoplasmático em cerca de 20% das proteínas sintetizadas,

potenciando a eficiência da atividade catalítica da enzima (Ruiz et al. 2015), que é mais elevada nas formas G4, do que nas G2 e G1 (Jean et al. 2008).

Segundo a base de dados da *European Bioinformatics Institute* (www.ebi.ac.uk) existem vários polimorfismos no gene da *AChE* entre os quais rs12705094, rs3087504, rs3757869 e rs2571598. Sendo que portadores deste último polimorfismo apresentaram uma redução da atividade sérica da *AChE* (Reale et al. 2018).

1.4.2.2 Butirilcolinesterase

A BuChE, expressa na maioria dos tecidos humanos (Mesulam et al. 1987) é uma enzima que participa no metabolismo dos ésteres, tais como a butirilcolina, hidrolisando-os. Também pode atuar sobre a acetilcolina embora menos especificamente (Abbasi et al. 2012). A afinidade da BuChE varia em função do radical acil dos ésteres de colina, aumentando quando estes são de acetil, para propionil e atingindo a sua maior afinidade, quando estes são de butiril. No caso de ACh as afinidades relativas (atividade catalítica (ac)/Constante de Michaelis Menten (Km)) das duas enzimas são de $1,5 \times 10^9$ M/minuto e de $8,4 \times 10^7$ M/minutos, para a AChE e BuChE, respetivamente (Moralev et al. 2007).

55

A nível do sistema nervoso central a BuChE está relacionada com o desenvolvimento das células da glia, sendo sintetizada nestas e tendo, também, um papel de regulação da AChE (Layer 1995), dado que esta enzima pode ser inibida por diversas substâncias, inclusive por elevada concentração do seu substrato, a ACh, sendo, nesses casos compensada pela atividade hidrolítica da BuChE (Moralev et al. 2007).

A BuChE é uma proteína codificada pelo gene *BuChE* localizado no braço longo do cromossoma 3 (3q26.1-q26.2) formado por 4 exões e 3 intrões. Neste gene são conhecidas várias variantes, das quais a variante K (rs1803274), que resulta na substituição de uma alanina por treonina, no codão 539, tem despertado grande interesse. Este polimorfismo pode ser encontrado em cerca de um terço das populações Caucásicas e Orientais e tem sido associado a uma redução de 30% da atividade da enzima (Bartels et al. 1992).

1.4.3 Disfunção colinérgica na DA

A perda de neurónios colinérgicos é uma constatação em doentes de DA (Toledano-Gasca 1988), mas têm sido verificadas outras alterações e declínio no sistema colinérgico (Sabbagh et al. 2011). Este declínio do sistema colinérgico, embora seja também observado no processo de envelhecimento, é mais marcado em doentes de DA (Schliebs et al. 2010), sendo detetável, por imagem, a atrofia de regiões com neurónios colinérgicos (Teipel et al. 2010). O recurso a estratégias terapêuticas anticolinérgicas e pró-colinérgicas, suportam o papel do sistema colinérgico no declínio cognitivo (Paul et al. 2015).

O défice colinérgico conduz a deterioração da memória (Dingova et al. 2016), sendo que o défice de atenção, aprendizagem e memória, estão relacionados com a diminuição das projeções colinérgicas no córtex cerebral e no hipocampo (Drever et al. 2010).

A marcada perda de neurónios colinérgicos, sobretudo na base do proencéfalo, está associada com o défice da atividade colinérgica, que afeta não só os seus recetores (Nordberg et al. 1992), mas também as enzimas envolvidas na sua síntese e hidrólise (Mesulam 2004).

Tem sido encontrada uma perda acentuada da atividade da AChE em neurónios colinérgicos corticais (Geula et al. 1995). A constatação da diminuição da atividade da AChE tem sido correlacionada com o aumento da gravidade da DA e a perda cognitiva a ela associada (Davis et al. 1999). Essa constatação da diminuição da atividade da AChE tem sido observada no cérebro de doentes de Alzheimer (Mesulam et al. 1987), em estudos *in vivo* por técnicas de imagem (Herholz et al. 2004) e também em determinações em amostras de LCR (Appleyard et al. 1992) colhidas em vida (Atack 1988) e *pos mortem* nas cisternas ventricular e basal (Appleyard 1992), relativamente a controlos. No entanto, nem todos os estudos confirmaram esses resultados, não reportando diferenças estatisticamente significativas entre doentes de DA e outras formas de demência e controlos (Appleyard et al. 1987; Elble et al. 1987). De facto, como revisto por Sirvio et al. 1992, os estudos da atividade da AChE são bastante contraditórios (Sirvio et al. 1992). Mais recentemente, foi encontrada uma diminuição em cerca de 40% da atividade da enzima, no cérebro de doentes de DA, embora não haja redução na expressão da proteína, sugestiva de que parte delas sejam cataliticamente inativas (Campanari et al. 2014).

A discordância dos resultados tem sido justificada pelas diferenças metodológicas, diferenças nas colheitas das amostras de LCR e condições do seu armazenamento até à execução analítica, bem como na escolha da população controlo. Alguns estudos tentaram avaliar a atividade das Colinesterases plasmáticas, dada a maior facilidade de obtenção da amostra, contudo os resultados foram pouco esclarecedores (Atack et al. 1985; Yamamoto et al. 1990). Um aspeto interessante é que, apesar da diminuição generalizada da atividade da AChE no cérebro de doentes de DA, tem-se verificado que os níveis desta enzima aumentam na zona das placas senis e dos neurónios com tranças neurofibrilares (Ulrich et al. 1990; Moran et al. 1994), apresentando propriedades enzimáticas específicas (Geula et al. 1989; Wright et al. 1993), levantando a hipótese de que a A β possa influenciar a expressão da enzima, ou que, a AChE possa ter um papel na formação das placas senis.

Também algumas variantes encontradas no gene da AChE têm sido estudados na procura de uma possível associação à DA, embora os resultados obtidos não tenham sido sempre concordantes (Piccardi et al. 2007). Relativamente ao polimorfismo rs2571598, os seus portadores, parecem apresentar uma melhor resposta terapêutica a inibidores da AChE (Cook et al. 2005; Scacchi et al. 2009), como o Donepezil e a Rivastigmina, embora alguns autores não corroborem este facto (Yoon et al. 2015).

Relativamente à BuChE, alguns estudos mostraram que a sua atividade estava aumentada no cérebro de doentes com DA (Mesulam et al. 1987). Contudo, estudos da atividade da enzima, no LCR evidenciaram algumas contradições, com alguns estudos a observar uma diminuição da atividade da enzima em amostras colhidas a nível ventricular e *pos mortem*, face a controlos (Appleyard et al. 1992). Estudos *in vitro* mostraram que a BuChE interage com os peptídeos A β e com a proteína tau (Diamant et al. 2006). Assim, foi proposta a hipótese de que a quantidade de BuChE circulante no LCR de doentes com DA estaria inversamente associada à sua sequestração nos agregados A β (Darreh-Shori et al. 2006).

Relativamente à variante K da BuChE, esta tem sido identificado como um fator de risco para o desenvolvimento de DA (Lehmann et al. 1997), embora, nem sempre tenha sido comprovado (Kehoe et al. 1998; Kim et al. 2001), considerando mesmo, alguns autores, ser um fator protetor nas formas esporádicas da doença (Alvarez-Arcaya et al. 2000). Recentemente, num trabalho de meta análise envolvendo 3850 casos e 3947 controlos, foi encontrada uma associação significativa entre a variante K da BuChE e o risco de DA

em populações asiáticas, mas esse resultado não foi comprovado quando analisado em populações caucasianas (Wang et al. 2015). De notar que, a substituição Ala539Thr se localiza numa posição próxima do seu terminal carboxílico, que é essencial na tetramerização da proteína, e para a sua capacidade de atenuar a formação de fibrilas A β (Diamant et al. 2006; Podoly et al. 2009). Posteriormente, foi observada uma diminuição da actividade da BuChE no LCR de doentes com DA portadores da variante K e do alelo ApoE- ϵ 4 (Darreh-Shori et al. 2012).

Um estudo exploratório de farmacogenética em população de DCL, mostrou que a BuChE-K e ApoE- ϵ 4 interagem sinergisticamente, incrementando o declínio cognitivo, atrofia do hipocampo e progressão para DA (Lane et al. 2008). No entanto, mais recentemente, De Beaumont e colaboradores não encontraram, contudo, diferenças significativas na pontuação em testes de avaliação cognitiva ao longo do tempo, em doentes de DCL, tendo em atenção os genótipos da BuChE e ApoE, tendo encontrado apenas uma associação entre a presença da variante K da BuChE e do alelo ϵ 4 da ApoE com o aparecimento da doença em idades mais precoces (De Beaumont et al. 2016). Assim, como descrito anteriormente, nos poucos trabalhos existentes na literatura na DA, e particularmente em DCL, existem ainda incertezas relativamente ao papel das colinesterases no desenvolvimento da patologia.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivos gerais

O objetivo geral deste trabalho foi estudar o envolvimento das colinesterases na Doença de Alzheimer. Neste sentido, o estudo envolveu três grupos de doentes, DA, DFT e DCL e ainda um grupo de indivíduos saudáveis. Este trabalho focou a atividade de duas colinesterases, a Acetilcolinesterase e a Butirilcolinesterase, bem como a avaliação de polimorfismos específicos localizados nos genes que codificam estas enzimas. Pretendemos ainda estudar a relação entre a atividade destas enzimas com os marcadores clássicos de patologia DA, a morte neuronal, a hiperfosforilação da proteína tau e a deposição do peptídeo A β .

1.5.2 Objetivos específicos

Assim, os nossos objetivos específicos foram:

- Avaliar se a presença da variante K da Butirilcolinesterase *rs 1803274* confere um risco acrescido para o desenvolvimento de DA na nossa população.
- Determinar se a atividade da Butirilcolinesterase no LCR se encontra alterada em diferentes estadios da DA (demência e DCL).
- Determinar a influência da variante K da Butirilcolinesterase na atividade desta enzima.
- Correlacionar a presença da variante K e a atividade da Butirilcolinesterase, com a presença do alelo ApoE- ϵ 4, níveis dos biomarcadores A β 42, Tau e p-Tau e a deterioração cognitiva.
- Avaliar se a atividade da Acetilcolinesterase no LCR se encontra alterada em indivíduos com patologia de DA.

- Correlacionar a atividade da Acetilcolinesterase com a atividade da Butirilcolinesterase, o alelo $\epsilon 4$ da ApoE, os níveis dos biomarcadores A β 42, Tau, p-Tau e a deterioração cognitiva.
- Determinar a distribuição do polimorfismo *rs 2571598* do gene da acetilcolinesterase nos doentes de DA e a sua influência na atividade desta enzima.

2. – Material e Métodos

2.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

A nossa amostra foi constituída por 217 indivíduos diagnosticados com DA, sendo 100 do género masculino, com uma média de idades de 70,6 ($\pm 9,3$) anos.

Foram também estudados 96 indivíduos diagnosticados com DCL que apresentavam uma média de idades de 69,85 ($\pm 8,56$) anos, sendo 59 do género feminino.

Igualmente integraram a amostra estudada 70 indivíduos diagnosticados com DFT, sendo 40 do género feminino, com uma idade média de 66,1 ($\pm 9,7$) anos. Todos estes doentes foram recrutados na Consulta de Demências do serviço de Neurologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (HUC-CHUC).

Também foram estudados 200 indivíduos recrutados de um estudo populacional português de envelhecimento, (Oliveira CR et al. 2010) com idade superior a 55 anos, que não apresentavam defeito cognitivo, e que constituíram o grupo controlo, sendo 89 do género masculino, com uma idade média de 68,99 ($\pm 7,7$) anos de idade.

Os doentes encontravam-se estáveis, sem co-morbilidades agudas e foram submetidos a uma exaustiva avaliação bioquímica, neurológica e imagiológica. Foi administrada uma bateria diagnóstica que incluiu instrumentos breves de avaliação cognitiva como o *Minimental State Evaluation (MMSE)* (Folstein et al. 1975), na sua versão portuguesa (Guerreiro M et al. 2003), bem como uma avaliação neuropsicológica, avaliando domínios de memória e outros domínios cognitivos, conforme descrito anteriormente (Baldeiras I et al. 2012; Baldeiras et al. 2015). Toda a informação disponível (testes de memória, dados de laboratório e exames imagiológicos) foi utilizada para chegar a um diagnóstico de consenso. Todos os doentes foram acompanhados por um período mínimo de 2 anos, após o qual os diagnósticos clínicos foram revistos.

A demência foi diagnosticada de acordo com os critérios da *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – fourth edition* (DSM-IV-TR) e a DA de acordo com os critérios definidos pelo “*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association*” (NINCDS-ADRDA) (McKhann et al. 1984) e pelas mais recentes recomendações de McKhann e colaboradores, de 2011 (McKhann et al. 2011).

O diagnóstico da DFT foi feito segundo os critérios definidos pelo *Lund and Manchester Groups* e revistos pelo *Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick’s Disease* (McKhann et al. 2001).

Os doentes com DCL incluídos neste estudo foram diagnosticados de acordo com os critérios definidos por Peterson et al (Petersen et al. 2001) e mais recentemente pelo grupo de trabalho criado conjuntamente pelo *National Institute on Aging/Alzheimer’s (NIA/AA)* (Albert et al. 2011). A verificação do comprometimento objetivo da memória foi obtida quando os dados obtidos no teste *Wechsler Memory Scale* apresentaram valores $>1,5$ SD inferiores, ajustados para a idade e níveis de escolaridade, sem apresentarem outros défices cognitivos.

62

O conjunto de doentes com DCL foram seguidos por um período mínimo de 2 anos, com observação clínica bianual e avaliação neuropsicológica e de desempenho funcional, realizada pela equipa médica da Consulta de Demências, de forma a poder determinar se converteram para DA, ou se se mantiveram estáveis, durante aquele período. Os doentes de DCL que evoluíram para outro tipo de demência foram excluídos do estudo.

A conversão de DCL para DA foi avaliada segundo os critérios que se encontram descritos acima para o diagnóstico da demência (McKhann et al. 1984; McKhann et al. 2011). A confirmação do perfil de demência e perda de autonomia foi obtida através da aplicação dos testes MMSE, Avaliação Cognitiva de Montreal (MoCA) (Nasreddine et al. 2005) na sua versão portuguesa (Simões M.R. 2008) e ADAS-Cog (Mohs et al. 1983) adaptado para a população portuguesa (Guerreiro M et al. 2003), na alteração da CDR $\geq 0,5$ a 1. Para os doentes que progrediram considerou-se como período de progressão o tempo decorrido entre o diagnóstico inicial e a data de conversão. Para os doentes que não converteram considerou-se o tempo decorrido entre a data de diagnóstico e a data da última consulta.

2.2 COLHEITA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Para um subgrupo de 281 doentes, foi possível ter acesso a amostras de líquido cefalorraquídico (LCR). Todas as amostras de LCR de doentes de DA, DCL e DLFT utilizadas ao longo do trabalho faziam parte do arquivo de amostras biológicas do laboratório de Neuroquímica, do serviço de Neurologia do CHUC. Estas amostras foram colhidas durante a investigação diagnóstica de rotina de doentes com deterioração cognitiva, sendo posteriormente classificados nos três grupos de estudo. As amostras selecionadas para o presente estudo foram colhidas entre o ano de 2009 e de 2014.

As amostras de LCR foram colhidas por punção lombar, para um tubo estéril de propileno e enviadas de imediato ao laboratório de Neuroquímica para o devido processamento e acondicionamento, segundo protocolo previamente definido (del Campo et al. 2012; Leitao et al. 2015).

Resumidamente, as amostras de LCR foram submetidas a centrifugação de 1800 xg durante 10 minutos, a 4°C, sendo o sobrenadante aliquoteado para criotubos de propileno. Estas alíquotas foram então armazenadas a -80°C até serem analisadas para determinação do perfil de biomarcadores e da atividade das colinesterases de acordo com o descrito em 2.2.1 e 2.2.2 respetivamente.

Para todos os doentes em estudo, bem como para os indivíduos do grupo controlo, foi possível ter acesso a uma amostra de sangue periférico. Esta amostra (2-3 ml) foi colhida, por punção venosa, para tubo contendo etileno diamino tetra acético tri potássico (K₃EDTA) e enviada ao laboratório de Neurogenética para extração de DNA para genotipagem da ApoE, de acordo com o descrito em 2.2.3.1 e, ainda dos polimorfismos rs1803274 e rs2571598 da BuChE e AChE, respetivamente, de acordo com o descrito em 2.2.3.2 e 2.2.3.3.

As amostras de DNA utilizadas no estudo faziam parte da coleção de DNAs do Laboratório de Neurogenética, do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra.

2.2.1 Determinação do perfil de biomarcadores no LCR

Para a determinação do perfil de biomarcadores no LCR procedemos à quantificação do peptídeo β -amilóide de 42 aminoácidos ($A\beta_{42}$), proteína Tau total (t-Tau) e Tau fosforilada (p-Tau). Estas determinações foram feitas recorrendo a imunoenaios enzimáticos comerciais (*INNOTEST, Innogenetics, Gent, Belgium*) seguindo as instruções do fabricante.

Resumidamente, a quantificação do $A\beta_{42}$ foi feita através do teste *Innotest β -Amyloid(1-42)* INX93594 da *Innogenetics^R Biotechnology for Healthcare, Gent, Belgium*, que é um imunoenasão enzimático no qual o antigénio presente na amostra é capturado por um primeiro anticorpo monoclonal (21F12) que se encontra ligado à fase sólida da microplaca (com 96 poços) e por um anticorpo secundário (3D6) marcado com biotina, os quais apresentam especificidade para as sequências de aminoácidos Gly, Gly, Val, Val, Ile, Ala, do terminal carboxílico e Asp, Ala, Glu, Phe, Arg e His do terminal amina, do peptídeo $A\beta_{42}$, respetivamente, conforme figura 2.1.

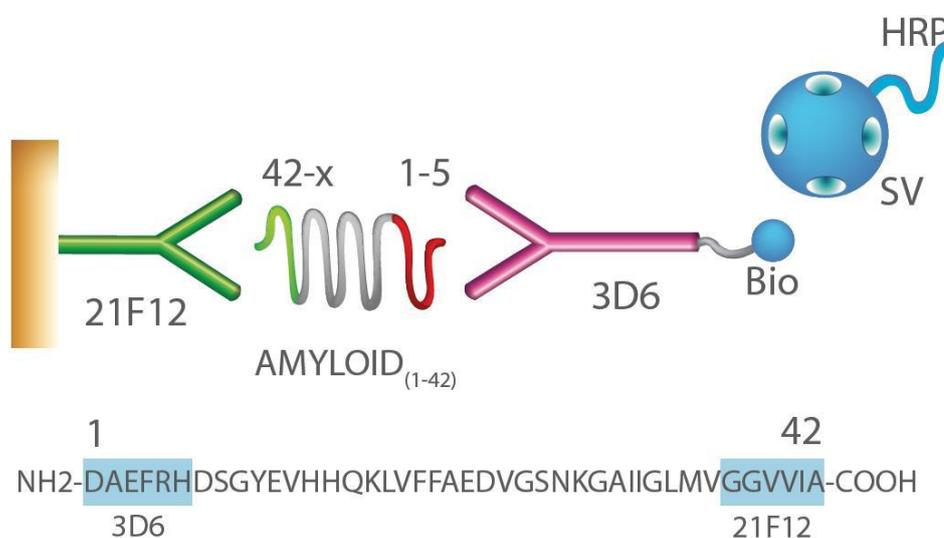


Figura 2.1 – Esquema da reação de deteção do peptídeo $A\beta_{42}$. Sequência de aminoácidos antigénicos reconhecidos pelo anticorpo primário (21F12) e pelo anticorpo secundário (3D6).

Após a aplicação das amostras e do anticorpo secundário na placa, a incubação do antigénio com os dois anticorpos ocorreu simultaneamente durante 1 hora a 25°C. A placa foi então lavada 5 vezes num lavador automático (*Plate Washer, das srl, Rome Italy*) sendo o complexo anticorpo-antigénio-anticorpo detetado através da aplicação de estreptavidina acoplada à enzima peroxidase. Após novo período de incubação (30 minutos) e lavagem, adicionou-se então o substrato da peroxidase, tetrametil benzidina,

ocorrendo o desenvolvimento da cor azul, diretamente proporcional à quantidade de antígeno ligado. Após 30 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico que produz cor amarela. A intensidade da coloração, em cada poço, foi medida espectrofotometricamente a 450 nm, com correção a 620 nm, no leitor de microplacas *Labsystems multiskan Ascent 354, Scientific, S. Diego, Califórnia, USA* (tabela 2.1).

Para a determinação dos níveis da proteína Tau total (t-Tau) recorremos ao teste *Innotest hTau Ag, FRI94931* da *Innogenetics^R Biotechnology for Healthcare, Gent, Belgium*, no qual o antígeno presente na amostra é capturado por um primeiro anticorpo monoclonal (AT120), que se encontra ligado à fase sólida da microplaca, que apresenta especificidade por uma sequência composta pelos aminoácidos Pro, Pro, Tre, Arg, Glu, Pro e Lys e por dois anticorpos secundários, HT7, com especificidade para a sequência de aminoácidos Pro, Pro, Gly, Gln e Lys e BT2, que apresenta especificidade por Asp, Arg, Ser, Gly, Tyr e Ser ambos marcados com biotina (fig. 2.2).

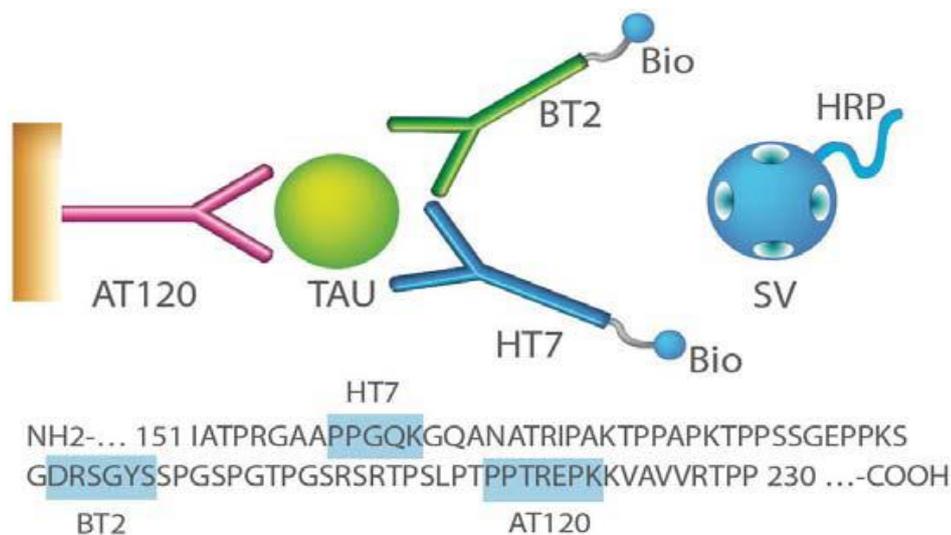


Figura 2.2 – Esquema da reação de detecção de t-Tau. Sequência de aminoácidos antigénicos reconhecidos pelo anticorpo primário (AT120) e pelos anticorpos secundários (HT7) e (BT2).

A quantificação da proteína Tau fosforilada (p-Tau) foi efetuada através do teste *Innotest Phospho-Tau(181P) INX75294* da *Innogenetics^R Biotechnology for Healthcare, Gent, Belgium*. Neste imunoensaio o antígeno presente na amostra é capturado por um primeiro anticorpo monoclonal ligado à fase sólida (HT7) e por um anticorpo secundário (AT270) marcado com biotina, os quais apresentam especificidade para as sequências de aminoácidos Pro, Pro, Gly, Gln, Lys, e Ala, Pro, Lys, Thr, Pro, Pro e Ser do

Tabela 2.1 – Especificidades de cada um dos ensaios dos biomarcadores (A β 42; Tau e p-Tau), incluindo volume de amostra e de padrões, suas concentrações, tempos e temperaturas de incubações e condições de validação do ensaio.

		A β 42	Tau	p-Tau	
<input type="checkbox"/>	Volume de amostra/branco/padrão	μ l	25	25	75
<input type="checkbox"/>	Curva de calibração (pg/ml)		125	75	15,6
			250	150	31,25
			500	300	62,5
			1000	600	125
			1500	1200	250
			2000		500
<input type="checkbox"/>	Volume de anticorpo primário	μ l	75	75	25
<input type="checkbox"/>	Incubação	Tempo	30 minutos	<i>Overnight</i>	<i>Overnight</i>
		temperatura	25°C	25°C	2-4°C
<input type="checkbox"/>	Lavagem		5 vezes	4 vezes	5 vezes
<input type="checkbox"/>	Volume de anticorpo secundário	μ l	100	100	100
<input type="checkbox"/>	Incubação	Tempo	30 minutos	30 minutos	60 minutos
		Temperatura	25°C	25°C	25°C
<input type="checkbox"/>	Lavagem		5 vezes	5 vezes	5 vezes
<input type="checkbox"/>	Substrato	μ l	100	100	100
<input type="checkbox"/>	Incubação	Tempo	30 minutos	30 minutos	30 minutos
		Temperatura	25°C	25°C	25°C
<input type="checkbox"/>	Solução Stop	μ l	50	50	50
<input type="checkbox"/>	Validação do ensaio	DO do branco	<0,1	<0,1	<0,1
		DO do padrão	>1,5	>1,7	>2,0
		mais elevado			

DO: densidade ótica

A partir dos duplicados das DOs das amostras e dos padrões, calculou-se a média, desvio padrão e respetivos coeficientes de variação (CV), que terá de ser inferior a 10% (no caso dos padrões) ou inferior a 20% (no caso das amostras), de forma a que o resultado seja aceite. A curva de calibração foi construída colocando a média das DO dos padrões no eixo do (Y) e a sua concentração no eixo do (X), e a partir da equação da curva de 4 parâmetros foram extrapolados os resultados das concentrações das diferentes amostras, expressos em pg/ml.

Para amostras com valores de DO superiores à do padrão de maior concentração, procedeu-se à diluição da amostra e à repetição da determinação. Nos casos de amostras

com um valor de DO inferior à do padrão de menor concentração, foi assumido um valor inferior à concentração do referido padrão.

2.2.2 Determinação da atividade das colinesterases no LCR

A determinação da atividade das colinesterases (AChE e BuChE), no LCR, foi efetuada por espectrofotometria, pelo método de *Ellman* (Ellman et al. 1961), com recurso ao equipamento UVIKON 933B de duplo feixe UV/VIS (*NorthStar Scientific, UK*), com controlo de temperatura. Este método é baseado na medida colorimétrica da velocidade de hidrólise da tiocolina pelas colinesterases. A tiocolina reage com o ácido 5,5'-dithio bis(2-nitrobenzóico) (DTNB) dando origem a um composto de cor amarela cuja absorvância é determinada espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 412nm segundo a reação seguinte:

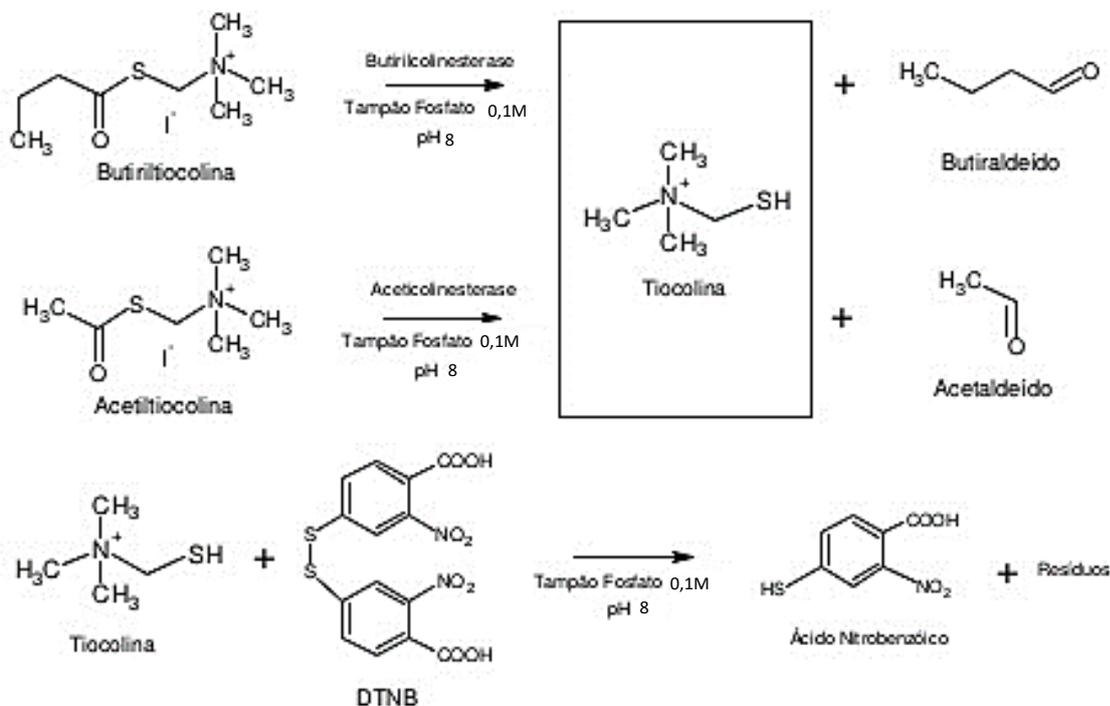


Figura 2.4 – Esquema da reação de Ellman catalisada pela Butirilcolinesterase (BuChE) e Acetilcolinesterase (AChE)

2.2.2.1 Determinação da atividade da AChE

Para a determinação específica da atividade da AChE, a 200 µl de amostra de LCR, adicionaram-se 2,75 ml de tampão de fosfato 0,1 M¹, pH=8; DTNB 10 mM e 50 µl de um inibidor específico da butirilcolinesterase, a etopropazina a 6,0 mM. Após incubação, durante 5 minutos, a 37°C, a reação foi então iniciada pela adição de 100 µl do substrato específico da acetilcolinesterase, o iodeto de acetiltiocolina, seguindo-se a variação da absorvância durante 10 minutos.

A atividade das acetilcolinesterases foi calculada através da variação da absorvância por minuto ($\Delta A/\text{min}$), segundo a fórmula:

$$\text{Atividade (U/l)} = \frac{\text{Vol ensaio (ml)} \times 10^9 \Delta A/\text{min}}{\text{vol amostra}(\mu\text{L}) \times \epsilon}$$

em que ϵ representa o coeficiente de extinção molar da tiocolina a 412nm, pH 8 ($13,6 \times 10^3$).

Na determinação das atividades da AChE, não foram incluídos os doentes, que no momento da colheita do LCR, estavam medicados com qualquer um dos inibidores das colinesterases (Donepezil, Galantamina, ou Rivastigmina).

2.2.2.2 Determinação da atividade da BuChE

A metodologia usada para a determinação da atividade da BuChE, foi em tudo semelhante à descrita em cima para a determinação da atividade da AChE, mas substituindo a etopropazina por um inibidor específico da AChE – BW 284 C51 *bis(4-allyldimethylammoniumphenyl) pentan-3-one dibromide*) a 0,6 mM, e o substrato da AChE, por um substrato específico da butirilcolinesterase, o iodeto de butiriltiocolina a 15 mM (figura 2.4).

Na determinação da atividade da BuChE, não foram incluídos os doentes, que no momento da colheita do LCR, estavam medicados com Rivastigmina, um dos inibidores desta colinesterase.

¹ Tampão fosfato 0,1 M: 77 ml de fosfato monossódico + 23 ml fosfato disódico + 100 ml de H₂O; pH=8,0. Fosfato monossódico 0,2 M NaH₂PO₄ (28g/l); Fosfato disódico 0,2 M Na₂HPO₄ (27,6g/l)

2.2.3 Análise molecular

A análise molecular envolveu o estudo de quatro polimorfismos, dois localizados no gene da *ApoE*, rs7412 e rs429358, e dois nos genes da *BuChE* e *AChE* rs1803274 e rs2571598, respetivamente.

A extração do DNA, a partir de sangue periférico, foi efetuada usando o Kit “*DNA isolation Kit for mammalian Blood, Roche, Germany*” e a sua quantificação foi efetuada no espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, USA*, versão 3.5.3, com *software* associado. Também a qualidade do DNA extraído foi avaliada pelo cálculo das razões das absorvâncias a A280nm/A260nm, e A280/A230 nm cujos valores devem estar compreendidos entre 1,8 e 2, garantindo a ausência de proteínas ou de RNA.

2.2.3.1 Genotipagem da ApoE

A genotipagem da ApoE foi determinada por amplificação do exão 4 do gene da *ApoE*, onde estão localizados os dois polimorfismos de interesse, rs7412 e rs429358, por *Polimerase Chain Reaction* (PCR), seguido de hidrólise com enzima de restrição, como descrito por Crook (Crook et al. 1994). Foram usados os *primers Forward*: tccaaggagctgcaggcggcgca e *Reverse*: acagaattcgccccggcctggtactgcca.

Na reacção de PCR, usámos DNA genómico (100-150ng/ μ l), 5 μ l de Tampão 5X, 1 μ l de dNTPs (5mM), 1.5 μ l de MgCl₂ (25mM), 2.5 μ l de DMSO, 1 μ l de cada *primer* (10 μ M) e 0.5 μ l de Taq DNA Polimerase (5U/ μ l) num volume final de 25 μ l de reacção. A reacção de amplificação foi realizada num termociclador Biometra, *Germany* de acordo com as seguintes condições: 1 ciclo de 95° C durante 2 minutos; 40 ciclos de 94° C 30 segundos, 65° C 30 segundos, 70° C 30 segundos; 1 ciclo final de 72° C durante 10 minutos.

Os produtos amplificados foram sujeitos a uma eletroforese em gel de agarose a 2%, com *Green Safe, (NZYtech)* seguida de visualização com luz ultra-violeta, no *Gel Doc XR* da *Biorad, USA*, e as imagens registadas em fotografia.

O restante volume foi usado para preparar a hidrólise com 0,75 unidades da enzima de restrição *Hin6I* a 37°C, durante 3-4 horas.

O genótipo foi então determinado através, do padrão de bandas resultante, da separação dos produtos da hidrólise por eletroforese em gel de agarose a 4%, cuja análise foi realizada por dois observadores independentes.

Assim, de acordo com o tamanho das bandas presentes no gel, a amostra foi considerada: homozigótica $\mathcal{E}2/\mathcal{E}2$ (bandas com 91 e 81 pb); heterozigótica $\mathcal{E}2/\mathcal{E}3$ (bandas com 91, 81 e 48 pb); heterozigótica $\mathcal{E}2/\mathcal{E}4$ (bandas com 91, 81, 72 e 48 pb); homozigótica $\mathcal{E}3/\mathcal{E}3$ (bandas com 91, e 48 pb); heterozigótica $\mathcal{E}3/\mathcal{E}4$ (bandas com 91, 72 e 48 pb); homozigótica $\mathcal{E}4/\mathcal{E}4$ (bandas com 72 e 48 pb).

2.2.3.2 Determinação da variante K da BuChE (rs 1803274)

O polimorfismo *rs1803274* do gene da BuChE é caracterizado pela substituição G/A no codão 539 deste gene, provocando uma substituição do aminoácido alanina por treonina (Ala/Thr), esta variação é conhecida por variante K.

A determinação deste polimorfismo foi efetuada através da amplificação, por *PCR*, do exão 4 deste gene, onde este se localiza, seguida de sequenciação direta pelo método de *Sanger*. Foram usados os *primers Forward*: ctgtactgtgtagtagaga e *Reverse*: attagagaccacacaactt.

As reações de *PCR* foram efetuadas num termociclador Biometra, *Germany*, para um volume de reação de 25 μ l, contendo 1x *Taq Buffer* (Promega), 0,2 mM de dNTPs (Fermentas), 1,5 mM $MgCl_2$ (Promega), 0,5 μ M de *primers*, 0,5 U de *Taq DNA Polimerase* (Promega) e 1 μ l de DNA (120 ng/ μ l).

Dos produtos amplificados por *PCR*, 5 μ l foram submetidos a electroforese, a 80 Volts, durante 30 minutos, em gel de agarose a 2% em tampão TBE 1x, com *Green Safe*, (*NZYTech*) para visualização dos fragmentos amplificadas.

Concluída a eletroforese, o gel foi visualizado num transiluminador *Gel Doc XR* da *Biorad*, *USA*, e as imagens registadas em fotografia.

2.2.3.2.1 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos obtidos por PCR, foram purificados para remoção de dNTPs, *primers* e sais, que não foram incorporados durante a reação de PCR, tendo sido usado as colunas de purificação “*NZYGelpure (NZYtech)*”, que utiliza colunas com membrana de sílica gel, para absorção dos fragmentos amplificados, na presença de tampões de ligação apropriados. As outras impurezas não se ligam à membrana e são removidas com o uso de um tampão de lavagem. Entre as várias etapas de purificação as colunas são centrifugadas a 13000 g, durante 1 minuto. No final, o produto purificado foi eluído com 50 µl de tampão de eluição para tubos *ependorf*.

2.2.3.2.2 Reação de sequenciação

A sequenciação foi efetuada, através do kit “*GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit*”, baseado na sequenciação de Sanger (Sanger et al. 1977). Foram utilizados os produtos de PCR previamente purificados e a reação de sequenciação do exão 4 do gene da *BuChE* foi realizada de acordo com o descrito na tabela 2.2.

72

Tabela 2.2 – Reagentes utilizados na reação de sequenciação

Reagentes	Volume
H ₂ O estéril	0 - 9,5 µl
Produto de PCR purificado	0,5 – 10 µl*
<i>Primer Forward</i> 10 mM	1 µl
<i>DTCS Quick Start Master Mix</i>	3 µl

* volume variável dependendo da intensidade das bandas dos produtos de PCR, observadas no gel de agarose

A reação de sequenciação decorreu num termociclador de acordo com as seguintes condições: 30 ciclos a 96°C durante 20 segundos seguidos de 60°C durante 4 minutos, sendo os resultantes produtos de sequenciação imediatamente purificados.

2.2.3.2.3 Purificação dos produtos de sequenciação

Os produtos de sequenciação foram purificados com o intuito da precipitação e remoção de sais residuais e ddNTPs marcados com fluorocromos que não foram incorporados na reação de sequenciação, impedindo, deste modo, a sua interferência na análise das sequências.

A purificação dos produtos de sequenciação foi feita através de etanol e foi desenvolvida em microplacas de 96 poços. Para tal procedeu-se à preparação de uma solução de acordo com as seguintes proporções: 3 µl de acetato de sódio (NaCH₃COO) (3M) a pH 5,2, 14,5 µl de água destilada estéril e 62,5 µl de etanol absoluto. Todos estes reagentes estão armazenados a 4°C, antes da preparação da solução desta mistura.

A cada um dos produtos de sequenciação são adicionados 80 µl da solução anterior, e colocados a -20°C, durante 10 minutos. Após esta etapa, é feita uma centrifugação a 6100g a 4°C, durante 30 minutos, sendo o sobrenadante eliminado sobre papel absorvente.

O *pellet* foi lavado duas vezes com etanol a 70% (v/v) a -20°C e centrifugado a 6100g durante 10 e 5 minutos, respetivamente.

Seguidamente foi feita uma centrifugação, invertida em papel absorvente, para remoção de todo o etanol residual a 92g durante 15 segundos.

Foi feita uma ressuspensão com 25 µl de solução de Formamida (*Beckman Coulter*, USA) a qual foi homogeneizada, por agitação. Para prevenção de evaporação, da amostra, foi colocada uma gota de óleo mineral em cada um dos poços da microplaca, antes desta ser colocada no sequenciador.

2.2.3.2.4 Eletroforese capilar

Os produtos de sequenciação purificados foram separados por eletroforese capilar no Sequenciador automatizado de DNA “*CEQ 8000 Beckman Coulter, Genetics Analysis System*, USA”.

2.2.3.2.5 Análise de eletroferogramas

A análise dos eletroferogramas obtidos foi realizada, através do *software Sequencher Demo*, versão 5.0 *Genes Code Corporation, USA*, por dois operadores independentes.

2.2.3.3 Determinação do polimorfismo rs 2571598 da AChE

O polimorfismo *rs2571598* da AChE é um polimorfismo localizado no intrão 3 do gene *AChE* caracterizado pela substituição de uma citosina por uma timina (C/T).

A determinação deste polimorfismo foi efetuada através da amplificação, por PCR, do intrão 3, onde está localizado este polimorfismo. Foram usados o *primer Forward*: ctttgggaggccaaggtgggaggatcccctcag e *primer Reverse*: ccagagatagggccactcaggctggag.

As reações de PCR foram efetuadas num termociclador Biometra, *Germany*, para um volume de reação de 25 µl, contendo 1x *Taq Buffer* (Promega), 0,2 mM de dNTPs (Fermentas), 1,5 mM MgCl₂ (Promega), 0,5 µM de *primers*, 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Promega) e 1 µl de DNA (120 ng/µl).

74

Os produtos amplificados por PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 1x, com *Green Safe*, (*NZYtech*), para visualização dos fragmentos amplificadas de DNA.

Concluída a eletroforese, a 80 volts, durante 30 minutos, o gel foi visualizado num transiluminador *Gel Doc XR* da *Biorad, USA* e as imagens registadas em fotografia.

A purificação dos produtos de PCR, foi idêntica à descrita no ponto 2.2.3.2.1. As condições de reação de sequenciação usadas para a determinação do polimorfismo rs 2571598, foram semelhantes às que foram utilizadas para determinar a variante K da BuChE, como descrito no ponto 2.2.3.2.2, com exceção do *primer* utilizado e que neste caso foi o *Reverse*. A purificação das reações de sequenciação em eletroforese capilar e análise dos eletroferogramas obtidos, foi realizada de acordo com o descrito acima nos pontos 2.2.3.2.3, 2.2.3.2.4 e 2.2.3.2.5, respetivamente.

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para descrevermos como determinadas características (variáveis) se comportavam na amostra recorreu-se a medidas de estatística descritiva e a métodos gráficos complementares (diagramas de barras com estatísticas de tendência central, dispersão e de frequências absolutas e relativas).

Para a tomada de decisão na escolha de testes paramétricos ou não paramétricos recorremos às medidas de forma de assimetria (*coeficiente de Skewness*), de achatamento (*coeficiente de Kurtosis*) e a normalidade da amostra foi testada com recurso aos testes não paramétricos *Kolmogorov-Smirnov* com o fator de *Correção Lilliefors* para dimensões da amostra >50 e *Shapiro-Wilk* para dimensões amostras ≤ 50 . Para a avaliação da homogeneidade de variâncias entre grupos recorremos ao *teste de Levene*.

Para testar a normalidade da distribuição dos polimorfismos avaliados, fomos estudar o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* com recurso às cadeias de *Markov*.

Para avaliarmos a relação entre variáveis do tipo qualitativo (dicotômica e multicotômica) aplicaram-se testes de *Qui-quadrado da Independência de Pearson*, com *Correção de Continuidade de Yates*. Para aplicação destes testes tivemos que ter em conta os seguintes pressupostos: total da amostra > 30 casos, 80% do total de frequências esperadas ≥ 5 e frequência esperada mínima > 1 . Perante o não cumprimento destes pressupostos recorreu-se ao *teste Exato de Fisher*. Foi também calculado a *Razão dos Produtos Cruzados (Odds Ratio)* e estimados os respetivos Intervalos de Confiança a 95% para cada estimativa de risco. Para a leitura dos valores da estatística da Razão dos Produtos Cruzados utilizamos os seguintes pontos de corte: valores $=1$ (valor nulo): dizemos que as frequências de doenças entre expostos e não expostos eram iguais e, portanto, não existia associação. Valores >1 : frequência de doença era maior nos expostos em relação aos não expostos. Este tipo de resultado sugeria que a exposição era um fator de risco para a doença. Valores < 1 : frequência da doença era menor nos expostos em relação aos não expostos.

A comparação de variáveis de natureza quantitativa entre dois grupos independentes foi realizada através do teste estatístico paramétrico *t-Student* ou do seu equivalente não paramétrico *Mann-Whitney U*. Para a comparação de médias entre três ou mais grupos independentes, aplicou-se o teste paramétrico Análise da Variância a I Fator (One Way ANOVA) perante a homogeneidade de variâncias. Na corrupção do pressuposto da homocedasticidade de variâncias aplicou-se o teste F de Brown-Forsythe (teste robusto à igualdade de médias). O não cumprimento dos pressupostos fundamentais para a estatística paramétrica recorremos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Nos modelos de análise estatística com 3 ou mais grupos independentes em que verificamos que estaríamos na presença de diferenças estatisticamente significativas entre pelo menos um dos pares do grupo recorremos aos testes de comparações múltiplas à posteriori. Os testes de comparações utilizados foram: perante a ANOVA a I Fator, o Bonferroni Ajustado; na presença do teste F de Brown-Forsythe recorreu-se ao teste de comparações múltiplas Games-Howell; perante um modelo não paramétrico (Kruskal-Wallis), o teste de comparações múltiplas aplicado foi Dunn de Bonferroni Corrigido.

Para avaliar a direção (sentido) da correlação bivariada, aplicou-se o *Coefficiente Ordinal de Spearman*. Para a avaliação da qualidade da magnitude/correlação: $r=1$ Correlação Perfeita Positiva; $0,8 \leq r < 1$ Correlação Forte Positiva; $0,5 \leq r < 0,8$ Correlação Moderada Positiva; $0,1 \leq r < 0,5$ Correlação Fraca Positiva; $0 < r < 0,1$ Correlação ínfima positiva; $0 =$ Ausência de correlação. Estes pontos de corte também se adequam para valores de correlação negativos.

O recurso ao teste da ANOVA Fatorial prendeu-se com a necessidade de compreender o efeito de pelo menos duas variáveis independentes do tipo qualitativo (dicotómico ou policotómico) na variação explicada da variável dependente tipo quantitativo. O mesmo teste avalia a significância quer do efeito de interação (efeito moderação) das variáveis independentes quer dos efeitos isolados destas sobre a variável dependente.

Assim, este teste foi usado para analisar, por exemplo, o efeito na variação dos níveis dos biomarcadores da doença de Alzheimer combinando quer os níveis altos ou baixos da atividade da butirilcolinesterase com a presença ou ausência do alelo $\epsilon 4$ da APOE, ou da variante k da butirilcolinesterase.

A Análise de Regressão Logística Binária permite estimar a probabilidade de uma determinada resposta na variável dependente do tipo qualitativa discreta (dicotómica: 1

sim; 0 não), usando variáveis preditoras (independentes) do tipo qualitativo (dicotômico ou policotômico) ou do tipo quantitativo (tipo razão). Esta abordagem foi então usada para identificar marcadores preditores de progressão para doença de Alzheimer (variável dependente) tendo em conta as variáveis independentes: idade, género e os genótipos APOE/ butirilcolinesterase.

Para a avaliação da progressão de defeito cognitivo ligeiro para doença de Alzheimer tendo em atenção a associação da variante BuChE-K e do alelo APOE- ϵ 4, recorremos à estimação da Curva de Sobrevivência de *Kaplan-Meier* (Método do produto-limite). Foram estimadas *tempo médio de progressão para DA* e recorreu-se também à estimação das respetivas Curvas. Por fim, aplicou-se o teste *Log-Rank* para avaliar as diferenças entre as curvas de sobrevida.

Para este tipo de análise de sobrevivência foi calculado o intervalo de tempo entre a avaliação inicial e o diagnóstico de demência, para os doentes de DCL que converteram para DA. Para o grupo de doentes que permaneceram estáveis em DCL, foi utilizado como período de cálculo a data da última consulta.

Software

Os *softwares* utilizados para análise e tratamento de dados, foram: o *IBM SPSS Statistics* versão 24.0 e o *GraphPad Prism* versão 7.

3. – Resultados

3.1 – ANÁLISE DA BUTIRILCOLINESTERASE

3.1.1 Caracterização da amostra

A amostra consistiu em 487 participantes: 217 com o diagnóstico clínico de DA, com uma média de idades de 70,6 ($\pm 9,3$) anos e 70 com diagnóstico clínico de DFT, que tinham uma média de idades de 66,1 ($\pm 9,7$) anos. Foram também estudados 200 indivíduos saudáveis com uma média de idades de 69,0 ($\pm 7,7$) anos (tabela 3.1). O grupo de doentes de DA tinha uma média de escolaridade de 5,6 ($\pm 4,5$) anos e apresentavam valores de MMSE de 17,2 ($\pm 6,5$). As idades dos grupos estudados eram estatisticamente diferentes ($p=0,001$) mantendo-se essas diferenças entre os doentes de DA e DFT ($p=0,001$), no entanto não se registaram diferenças entre doentes de DA e o grupo controlo ($p=0,178$) e entre o grupo de DFT e o controlo ($p=0,051$). De notar que não foram encontradas diferenças no género entre os grupos estudados ($p=0,881$).

78

Tabela 3.1 – Características da população estudada.

	DA n=217	DFT n=70	Controlo n=200	p-value
Género (M/F)	100/117	30/40	89/111	0,881 ^{a)}
Idade (anos)	70,6 ($\pm 9,3$)	66,1 ($\pm 9,7$)	69,0 ($\pm 7,7$)	0,001 ^{b)}
Idade de início (anos)	66,9 ($\pm 9,5$)	-----	-----	
Escolaridade (anos)	5,6 ($\pm 4,5$)	-----	-----	
MMSE	17,2 ($\pm 6,5$)	-----	-----	

Os dados são apresentados como média (\pm desvio padrão), salvo indicação em contrário.

A diferença entre os grupos de doentes e os controlos foram estudados pelos testes estatísticos: a) χ^2 da independência de Pearson; b) análise da variância a um fator. DA – Doença de Alzheimer; DFT – Demência Fronto Temporal; F – género feminino; M - género masculino; MMSE – *Mini Mental State Examination*.

A genotipagem da ApoE foi realizada na população em estudo e a distribuição dos seis diferentes genótipos encontra-se descrita na tabela 3.2, não se tendo verificado desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg na distribuição alélica. Quando analisamos a distribuição dos diferentes genótipos em função do diagnóstico, observamos que os doentes de DA apresentaram um predomínio do genótipo $\epsilon 3, \epsilon 3$, com 47,5% do total de doentes, logo seguido de $\epsilon 3, \epsilon 4$, com 39,6%, e os que apresentaram $\epsilon 4, \epsilon 4$ eram 7,8% do total de indivíduos genotipados. Nos doentes diagnosticados com DFT e no grupo controlo também foi o genótipo $\epsilon 3, \epsilon 3$ o que apresentou maior frequência, ocorrendo em 64,2% e 70,5% dos casos, respetivamente. A percentagem dos doentes $\epsilon 3, \epsilon 4$ e $\epsilon 4, \epsilon 4$ foi de 19,4% e 1,5% na DFT e de 14,5% e 1,0% no grupo controlo. Estes resultados mostraram uma distribuição dos diferentes genótipos estatisticamente diferente entre os três grupos ($p < 0,001$). Comparando os grupos dois a dois, observámos diferenças estatisticamente significativas entre os doentes de DA e DFT ($p < 0,001$) e DA e controlo ($p < 0,001$), mas não entre os grupos de DFT e controlo ($p = 0,426$).

Tabela 3.2 – Distribuição dos vários genótipos da ApoE, em doentes de DA, DFT e controlos

Genótipo ApoE	DA n=217	DFT *n=67	Controlos n=200	p-value
$\epsilon 2, 2$	1 (0,5%)	0 (0,0%)	1 (0,5%)	<0,001
$\epsilon 2, 3$	8 (3,7%)	7 (10,4%)	25 (12,5%)	
$\epsilon 2, 4$	2 (0,9%)	3 (4,5%)	2 (1,0%)	
$\epsilon 3, 3$	103 (47,5%)	43 (64,2%)	141 (70,5%)	
$\epsilon 3, 4$	86 (39,6%)	13 (19,4%)	29 (14,5%)	
$\epsilon 4, 4$	17 (7,8%)	1 (1,5%)	2 (1,0%)	

Os dados são apresentados como números (n) e percentagem (%) dentro de cada grupo.

*De notar que em três doentes de DFT não foi possível genotipar a ApoE.

A diferença entre os grupos de doentes e os controlos foram estudados pelo teste estatístico χ^2 da independência de Pearson. DA – Doença de Alzheimer; DFT – Demência Fronto Temporal.

Relativamente à frequência dos alelos no grupo de doentes com DA foi de 2,8% para o alelo $\epsilon 2$, de 69,1% para o $\epsilon 3$ e de 28,1% para o alelo $\epsilon 4$. Nos doentes com DFT a frequência do alelo $\epsilon 4$ foi de 13,4% e no grupo controlo foi de 8,7% (tabela 3.3). Esta distribuição alélica foi estatisticamente diferente ($p = 0,004$) (tabela 3.3). Quando comparámos a distribuição alélica em função dos grupos estudados, verificámos diferenças entre os doentes de DA face ao grupo controlo ($p = 0,002$) e também entre DA

e DFT ($p=0,021$). No entanto, não se verificaram diferenças entre DFT e o grupo controlo ($p=0,645$).

Tabela 3.3 – Distribuição da frequência alélica da ApoE.

Alelo	DA	DFT	Controlo	<i>p-value</i>
$\epsilon 2$	2,8%	7,5%	7,3%	0,004
$\epsilon 3$	69,1%	79,1%	84,0%	
$\epsilon 4$	28,1%	13,4%	8,7%	

Os dados são apresentados como percentagem (%) dentro de cada grupo.

A diferença entre os grupos de doentes e os controlos foram estudados pelo teste estatístico χ^2 da independência de Pearson. DA – Doença de Alzheimer; DFT – Demência Fronto Temporal.

Considerando agora as diferenças entre não portadores e portadores do alelo $\epsilon 4$, independentemente de serem heterozigóticos ou homozigóticos, dentro do grupo de DA, observamos que 48,4% eram portadores deste alelo. Nos doentes de DFT esse valor foi de 25,4%, enquanto no grupo controlo a frequência dos portadores do alelo $\epsilon 4$, foi de 16,5%. Estas diferenças na distribuição do alelo $\epsilon 4$ revelaram-se estatisticamente significativas entre os 3 grupos ($p < 0,001$).

Também, quando comparamos a distribuição dos portadores do alelo $\epsilon 4$ da ApoE entre os diferentes grupos dois a dois, verificamos que esta apresenta diferenças significativas entre o grupo de DA e controlo ($p < 0,001$), DA e DFT ($p < 0,001$), mas não entre o grupo de indivíduos com DFT e o grupo controlo ($p = 0,107$).

3.1.2 Determinação da variante K da butirilcolinesterase

Procedemos então ao estudo da distribuição do polimorfismo da variante K da butirilcolinesterase (rs1803274) na nossa população (tabela 3.4), não observando diferenças significativas entre os diversos grupos da amostra estudada ($p=0,356$). De notar que só 10 doentes de DA (4,6%), 1 de DFT (1,9%) e 3 controlos (1,5%) é que são homozigóticos para o alelo K da BuChE.

Considerando a presença do alelo K, independentemente de ser em homozigotia ou heterozigotia (NK+KK), encontramos 70 portadores no grupo com DA (32,2%), 19 no grupo com DFT (35,9%) e 64 no grupo controlo (32,0%) (tabela 3.4). Esta distribuição da variante K da BuChE, não mostrou ser significativamente diferente entre os grupos de estudo ($p=0,861$).

Na DA, a frequência do alelo N foi de 81,6% e do K de 18,4%; na DFT de 81,1% e 18,9% e no controlo foi de 83,3% e 16,7%, respetivamente, não se tendo verificado a existência de diferenças significativas entre a distribuição alélica nos grupos estudados ($p=0,934$). De notar que não se verificou desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, na distribuição alélica.

Tabela 3.4 – Distribuição do genótipo da butirilcolinesterase, em função do diagnóstico

	DA n=217	DFT *n=53	Controlo n=200	<i>p-value</i>
NN (n)	147	34	136	0,356
(%)	67,7	64,2	68,0	
NK (n)	60	18	61	
(%)	27,6	34,0	30,5	
KK (n)	10	1	3	
(%)	4,6	1,9	1,5	

Os dados são apresentados em número de casos (n) e sua percentagem (%) em função do diagnóstico.

* De notar que em 17 doentes DFT não foi possível genotipar a BuChE. Os dados foram estudados pelo teste do χ^2 da independência de Pearson. DA – Doença de Alzheimer; DFT – Demência Fronto Temporal.

Não foram encontradas diferenças da distribuição dos genótipos de acordo com o género, dentro dos grupos estudados (tabela 3.5).

Tabela 3.5 – Distribuição do genótipo da BuChE dentro de cada grupo de estudo em função do género.

	Género	NN	NK+KK	p
DA	Feminino (n/%)	79 (67,5%)	38 (32,5%)	0,940
	Masculino (n/%)	68 (68,0%)	32 (32,0%)	
DFT*	Feminino (n/%)	17 (63,0%)	10 (37,0%)	0,854
	Masculino (n/%)	17 (65,4%)	9 (34,6%)	
Controlo	Feminino (n/%)	74 (66,7%)	37 (33,3%)	0,652
	Masculino (n/%)	62 (69,7%)	27 (30,3%)	

Os dados são apresentados em número de casos (n) e sua percentagem (%) dentro de cada grupo.

* De notar que em 17 doentes de DFT não foi possível genotipar a BuChE. Os dados foram estudados pelo teste do χ^2 da independência de Pearson. DA – Doença de Alzheimer; DFT – Demência Fronto Temporal.

Seguidamente fomos subdividir os doentes de DA em função da idade de início da doença (<65 anos de idade; EOAD *versus* ≥ 65 anos de idade; LOAD) e o grupo controlo em função da idade de colheita, não tendo sido observadas diferenças na distribuição dos genótipos da BuChE estudados (NN, NK e KK) nos diferentes grupos (tabela 3.6).

82

Tabela 3.6 – Distribuição do genótipo da BuChE dos doentes de DA em função da idade de início da doença.

	DA*	Controlo	p-value
< 65 anos	(n = 75)	(n = 69)	
NN	52 (69,3%)	53 (76,8%)	0,425
NK	22 (29,3%)	16 (23,2%)	
KK	1 (1,3%)	0 (0,0%)	
≥ 65 anos	(n = 109)	(n = 131)	
NN	73 (67,0%)	83 (63,4%)	0,266
NK	30 (27,5%)	45 (34,4%)	
KK	6 (5,5%)	3 (2,3%)	

Os dados são apresentados em número de casos (n) e sua percentagem (%) dentro de cada grupo.

*De notar que em 33 doentes de DA não estava disponível a idade de início da doença. As diferenças entre os grupos estudados foram avaliadas pelo teste χ^2 da independência de Pearson. DA – Doença de Alzheimer.

Igualmente não observámos diferenças na distribuição genotípica da BuChE entre EOAD e LOAD (p=0,344). Também quando procedemos a uma análise em que considerámos a

associação dos portadores da variante K, independentemente de ser em homozigotia ou heterozigotia (NK+KK) não encontramos diferenças entre EOAD e LOAD ($p=0,586$).

3.1.3. Associação entre o alelo ApoE- $\epsilon 4$ e a BuChE K

De seguida analisámos a associação entre a variante K da BuChE e o alelo $\epsilon 4$ da ApoE, para os diferentes grupos em estudo. Embora não tenhamos encontrado diferenças estatisticamente significativas, verifica-se uma tendência para uma associação da variante K com o alelo ApoE- $\epsilon 4$ em doentes de DA. De facto dos 10 doentes KK, 8 são também portadores do alelo $\epsilon 4$ (tabela 3.7).

Tabela 3.7 – Distribuição do genótipo da variante K da BuChE, em doentes de DA, de DFT e controlos em função de serem ou não portadores do alelo $\epsilon 4$ da ApoE.

	Com ApoE $\epsilon 4$	Sem ApoE $\epsilon 4$	<i>p value</i>
DA			
<input type="checkbox"/> NN	65 (61,9%)	82 (73,2%)	0,060
<input type="checkbox"/> NK	32 (30,5%)	28 (25,0%)	
<input type="checkbox"/> KK	8 (7,6%)	2 (1,8%)	
DFT			
<input type="checkbox"/> NN	9 (60%)	25 (65,8%)	0,274
<input type="checkbox"/> NK	5 (33,3%)	13 (34,2%)	
<input type="checkbox"/> KK	1 (6,7%)	0 (0,0%)	
Controlos			
<input type="checkbox"/> NN	23 (69,7%)	113 (67,7%)	0,681
<input type="checkbox"/> NK	9 (27,3%)	52 (31,1%)	
<input type="checkbox"/> KK	1 (3,0%)	2 (1,2%)	

Os dados são apresentados em número de casos e sua percentagem (%) dentro de cada grupo.

As diferenças entre grupos foram avaliadas através do teste do χ^2 da independência de Pearson. DA – Doença de Alzheimer; DFT – Demência Fronto Temporal.

Mesmo quando procedemos a uma análise dos dados em que agrupámos os portadores da variante K da BuChE, associando os heterozigóticos aos homozigóticos (NK+KK), e comparámos com os que não eram portadores dessa variante (NN), subdivididos pela presença ou ausência do alelo $\epsilon 4$ da ApoE, continuámos a observar a mesma tendência dos resultados nos doentes de DA ($p=0,075$).

3.1.4 Atividade da BuChE

A atividade da BuChE no LCR foi determinada num subgrupo de 164 doentes, incluindo 95 doentes com DA e 69 com DFT. Na determinação das atividades da BuChE, não foram incluídos os doentes, que no momento da colheita do LCR, estavam medicados com Rivastigmina.

Os valores médios da atividade da enzima foram de 6,63 ($\pm 4,05$) U/L nos doentes de DA e de 6,82 ($\pm 3,29$) U/L nos de DFT (tabela 3.8 e figura 3.1). Os resultados da atividade da BuChE, entre estes dois tipos de demências, mostraram não ser estatisticamente diferentes ($p=0,273$).

Tabela 3.8 – Atividade da BuChE por grupos de diagnóstico de demências.

Diagnóstico	Atividade da BuChE (U/L)	<i>p-value</i>
DA	6,63 ($\pm 4,05$)	0,273
DFT	6,82 ($\pm 3,29$)	

A atividade da BuChE no LCR é apresentada em média \pm desvio padrão. As diferenças entre os grupos de demências foram calculadas pelo teste *Mann-Whitney*. DA – Doença de Alzheimer; DFT – Demência Fronto Temporal.

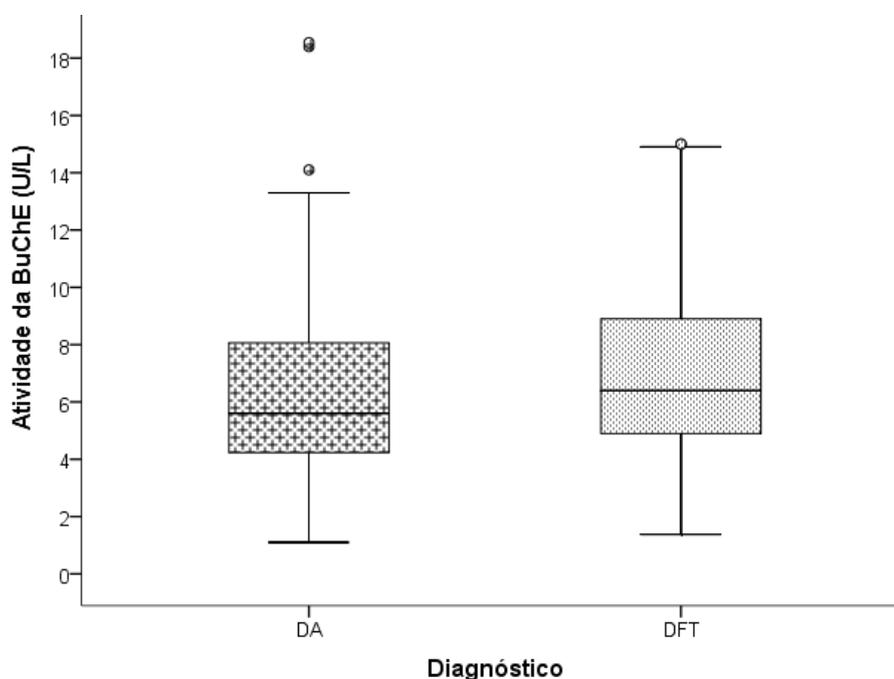


Figura 3.1 – Atividade da BuChE (U/L), nos doentes de Doença de Alzheimer (DA) e Demência Fronto Temporal (DFT).

Encontram-se representadas os valores de mediana e dos percentis 10, 25, 75 e 90. Os círculos apresentados correspondem aos outliers. DA – Doença de Alzheimer; DFT – Demência Fronto Temporal.

Nos doentes de DA não se registaram diferenças significativas no que respeita à atividade da BuChE dos doentes do género masculino ($6,23 \pm 2,96$ U/L), comparativamente aos do género feminino ($6,85 \pm 4,47$ U/L) ($p=0,938$). Quando procedemos ao mesmo tipo de análise nos doentes com DFT, também não verificámos diferenças estatisticamente significativas ($p=0,105$), sendo os resultados de atividade da BuChE nos homens e mulheres de $6,06 \pm 2,08$ e $7,41 \pm 3,54$ U/L, respetivamente.

No grupo de doentes com DA, quando ajustámos à idade de surgimento da doença, verificámos a ausência de diferenças significativas da atividade da BuChE, entre os doentes EOAD (<65anos) ($6,08 \pm 4,12$ U/L) e os LOAD (≥ 65 anos) ($6,70 \pm 3,41$ U/L) ($p=0,223$).

3.1.5 Associação entre a atividade da BuChE, biomarcadores, variante K e genótipo ApoE

Foram efetuadas determinações dos biomarcadores A β 42, Tau e p-Tau no LCR, a 115 indivíduos com DA e 70 doentes com DFT.

Como seria de esperar, observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de patologias para os três marcadores avaliados (tabela 3.9). Os doentes com DA apresentaram níveis médios de A β 42, no LCR, significativamente inferiores e de Tau e p-Tau significativamente elevados em relação aos doentes de DFT ($p < 0,001$ para todos os parâmetros).

Tabela 3.9 – Determinação dos níveis de A β 42, Tau e p-Tau em DA e DFT

	DA n=115	DFT n=70	<i>p value</i>
A β 42 (pg/ml)	421,9 (\pm 211,4)	726,4 (\pm 307,4)	<0,001
Tau (pg/ml)	521,9 (\pm 344,2)	380,2 (\pm 404,9)	<0,001
p-Tau (pg/ml)	59,1 (\pm 31,9)*	46,1 (\pm 40,2)	<0,001

Os resultados são apresentados em média \pm desvio padrão.

*Determinação efetuada em 114 doentes.

As diferenças entre os grupos de doentes foram calculados pelo teste de *Mann-Whitney*. DA – Doença de Alzheimer; DFT – Demência Fronto Temporal

Seguidamente avaliamos o possível efeito do genótipo da BuChE nos valores médios da sua atividade, bem como dos níveis do peptídeo A β 42, da proteína Tau e p-Tau no LCR nos dois grupos de doentes estudados (tabela 3.10).

Não encontramos diferenças em nenhum dos parâmetros estudados entre portadores e não portadores da variante K da BuChE, para os doentes com DA (tabela 3.10).

É contudo de referir que, nos doentes com DFT, a atividade da BuChE evidenciou uma diminuição significativa no subgrupo que possuía o alelo K da enzima ($5,19 \pm 2,62$ vs. $7,56 \pm 3,66$ U/L; $p = 0,026$).

Curiosamente no único doente de DFT, que era KK, a atividade da BuChE foi de 2,42 U/L. Para os níveis dos três biomarcadores estudados não foram observadas diferenças neste grupo de doentes.

Tabela 3.10 – Atividade da BuChE e níveis de A β 42, t-Tau e p-Tau, no LCR, em função da presença do alelo da variante K da BuChE, em doentes de DA e de DFT.

	NN	NK+KK	p-value
DA			
BuChE (U/L)	6,37 (\pm 3,47) (n=70)	7,37 (\pm 5,24) (n=25)	0,548
A β 42 (pg/ml)	423,9 (\pm 214,7) (n=86)	415,8 (\pm 204,9) (n=29)	0,928
Tau (pg/ml)	538,8 (\pm 375,2) (n=86)	471,7 (\pm 227,0) (n=29)	0,647
p-Tau (pg/ml)	60,1 (\pm 32,4) (n=85)	56,3 (\pm 32,4) (n=29)	0,456
DFT			
BuChE* (U/L)	7,56 (\pm 3,66) (n=33)	5,19 (\pm 2,62) (n=19)	0,026
A β 42** (pg/ml)	759,2 (\pm 307,9) (n=34)	720,2 (\pm 396,0) (n=19)	0,528
Tau** (pg/ml)	446,7 (\pm 521,1) (n=34)	309,4 (\pm 256,7) (n=19)	0,119
p-Tau** (pg/ml)	53,1 (\pm 49,1) (n=34)	36,7 (\pm 30,9) (n=19)	0,090

Os resultados são expressos em média (\pm) desvio padrão.

* Determinações da atividade da BuChE efetuada em 52 doentes;

** Determinações dos biomarcadores efetuadas em 53 doentes.

As diferenças entre os grupos foram estudadas pelo teste de *Mann-Whitney*.

DA – Doença de Alzheimer; DFT – Demência Fronto Temporal.

Procedemos de seguida a uma análise de variância a dois fatores, considerando o efeito do diagnóstico e o genótipo da BuChE, na actividade da BuChE, níveis de A β 42, Tau e p-Tau. De notar que para os níveis dos biomarcadores A β 42 ($p=0,675$), Tau ($p=0,732$) e p-Tau ($p=0,422$), não encontramos interação entre os dois fatores. É contudo de referir que para a atividade da BuChE existe uma interação significativa entre o genótipo e o diagnóstico ($p=0,017$), uma vez que no grupo DA, a atividade da enzima não é influenciada pela presença da variante K, ao contrário do grupo DFT, onde foi observada uma diminuição significativa da atividade nos portadores da variante K.

Posteriormente, procedemos à análise do efeito da presença do alelo ApoE- ϵ 4 nos valores médios de atividade da BuChE e dos biomarcadores A β 42, Tau e p-Tau, no LCR dos doentes com DA. Como podemos observar na tabela 3.11, os valores da atividade da BuChE, bem como os níveis de A β 42 no LCR não mostram diferenças significativas entre os portadores e não portadores do alelo ϵ 4. Os valores de Tau nos doentes com DA portadores do alelo ϵ 4, apresentam uma tendência para valores mais elevados, que não atingiu contudo significado estatístico. A sua forma fosforilada (p-Tau) mostrou-se

significativamente mais elevada nos doentes portadores do alelo $\epsilon 4$ da ApoE (tabela 3.11).

Tabela 3.11 – Atividade da BuChE e níveis de A β 42, Tau e p-Tau em doentes de DA portadores e não portadores do alelo $\epsilon 4$ da ApoE.

	BuChE (U/L)	Aβ42 (pg/ml)	Tau (pg/ml)	p-Tau (pg/ml)
Com ApoE $\epsilon 4$ (n=47)	6,59 ($\pm 4,13$)	391,7 ($\pm 150,8$)	557,2 ($\pm 301,2$)	64,0 ($\pm 29,4$)*
Sem ApoE $\epsilon 4$ (n=46)	6,67 ($\pm 3,92$)	448,5 ($\pm 251,5$)	490,7 ($\pm 378,0$)	54,8 ($\pm 33,5$)
p	0,858	0,428	0,060	0,043

Os resultados são expressos em média (\pm) desvio padrão.

*Determinações efetuadas em 46 doentes

As diferenças entre os grupos foram calculados pelo teste de *Mann-Whitney*.

DA – Doença de Alzheimer.

De seguida, analisámos a possível correlação entre os valores da atividade da BuChE e os níveis de biomarcadores A β 42, Tau e p-Tau, dentro do grupo de doentes com DA. Não encontramos correlação entre a atividade da BuChE e os níveis de A β 42 ($\rho=0,108$ e $p=0,305$) e proteína Tau ($\rho=0,191$ e $p=0,066$). Contudo, observámos a existência de uma correlação fraca entre a atividade da BuChE e o biomarcador p-Tau ($\rho=0,227$ e $p=0,037$).

Procedemos à análise da possível correlação da atividade da BuChE, subdividindo os doentes com DA, pelos que eram portadores do alelo $\epsilon 4$ da ApoE e aqueles que não possuíam esse alelo. Assim, nos que não eram portadores do alelo não encontramos correlação entre a atividade da BuChE e os níveis de A β 42 ($\rho=-0,040$ e $p=0,793$), Tau ($\rho=0,177$ e $p=0,239$) e com p-Tau ($\rho=0,246$ e $p=0,100$). No entanto, no grupo de doentes de DA que eram portadores do alelo $\epsilon 4$, encontramos uma correlação moderada para A β 42 ($\rho=0,419$ e $p=0,003$), e fraca para os restantes biomarcadores Tau ($\rho=0,317$ e $p=0,030$) e p-Tau ($\rho=0,301$ e $p=0,042$).

No entanto, quando procedemos ao mesmo tipo de análise nos doentes de DFT, não encontramos qualquer correlação entre a atividade da BuChE com A β 42 ($\rho=0,156$ e $p=0,202$), Tau ($\rho=0,210$ e $p=0,083$) e p-Tau ($\rho=0,212$ e $p=0,080$).

Subdividindo os doentes de DA em função da atividade da BuChE, no LCR, ser inferior ou superior ao valor médio (6,63 U/L) comparámos os níveis de A β 42, Tau e p-Tau e

encontrámos valores mais baixos para os três marcadores nos que apresentavam atividade da BuChE abaixo da média ($p=0,015$; $p=0,002$; $p=0,031$, respetivamente) (tabela 3.12).

Tabela 3.12 – Níveis de A β 42, Tau e p-Tau, em doentes de DA, em função da atividade da BuChE.

	Aβ42 (pg/ml)	Tau (pg/ml)	p-Tau (pg/ml)
Atividade da BuChE abaixo da média (n=58)	399,6 (\pm 212,6)	435,1 (\pm 232,1)	53,1 (\pm 26,3)
Atividade da BuChE acima da média (n=35)	491,1 (\pm 217,7)	675,8 (\pm 466,3)	66,9 (\pm 34,9)*
p	0,015	0,002	0,031

Os resultados são expressos em média (\pm) desvio padrão.

* As determinações da p-Tau foram efetuadas em 34 doentes.

As diferenças dos níveis dos biomarcadores A β 42, Tau e p-Tau entre grupos foram calculados pelo teste de *Mann-Whitney*.

Tendo em conta o facto dos doentes de DA serem portadores, ou não do alelo ϵ 4 da ApoE, verificámos que as diferenças dos resultados anteriores e que foram obtidos para A β 42 e Tau, só se mantêm no subgrupo dos doentes que eram portadores do alelo ApoE ϵ 4 ($p=0,004$ para os dois biomarcadores), não tendo encontrado diferenças no subgrupo dos que não eram portadores desse alelo ($p=0,540$ para A β 42 e $p=0,069$ para Tau) (tabela 3.13).

Tabela 3.13 – Níveis de A β 42, Tau e p-Tau em doentes de DA portadores e não portadores do alelo ϵ 4 da ApoE, em função da atividade da BuChE.

	Aβ42 (pg/ml)	Tau (pg/ml)	p-Tau (pg/ml)	
ApoE ϵ 4 (-)	Atividade abaixo da média (n=27)	457,9 (\pm 274,4)	395,9 (\pm 210,5)	45,5 (\pm 20,4)
	Atividade acima da média (n=19)	495,3 (\pm 257,6)	646,2 (\pm 541,6)	66,6 (\pm 43,2)
	p value	0,540	0,069	0,082
ApoE ϵ 4 (+)	Atividade abaixo da média (n=31)	348,8 (\pm 121,9)	469,2 (\pm 247,6)	59,7 (\pm 29,2)
	Atividade acima da média (n=16)	486,1 (\pm 166,4)	710,9 (\pm 372,1)	67,4 (\pm 22,1)*
	p value	0,004	0,004	0,137

Os resultados são expressos em média (\pm) desvio padrão.

*As determinações da p-Tau foram efetuadas em 15 doentes.

As diferenças dos níveis dos biomarcadores A β 42, Tau e p-Tau entre os doentes de DA com atividade da BuChE abaixo ou acima da média foram calculados pelo teste de *Mann-Whitney*.

De igual modo procedemos à subdivisão dos doentes de DFT em função da média da atividade da BuChE, não tendo observado diferenças nos níveis de A β 42 ($p=0,627$).

Contudo encontrámos valores mais baixos da Tau ($p=0,028$) e tendencialmente mais baixos da p-Tau no grupo de doentes que apresentavam atividade da BuChE abaixo da média ($p=0,078$) (tabela 3.14).

Tabela 3.14 – Níveis de A β 42, Tau e p-Tau, em doentes de DFT, em função da atividade da BuChE

	Aβ42 (pg/ml)	Tau (pg/ml)	p-Tau (pg/ml)
Atividade da BuChE abaixo da média (n=40)	707,4 (\pm 312,9)	317,7 (\pm 243,4)	40,7 (\pm 29,9)
Atividade da BuChE acima da média (n=29)	746,2 (\pm 307,1)	475,2 (\pm 551,6)	54,4 (\pm 50,9)
p	0,627	0,028	0,078

Os resultados resultados são expressos em média (\pm) desvio padrão. As diferenças dos níveis dos biomarcadores A β 42, Tau e p-Tau entre grupos foram calculados pelo teste de *Mann-Whitney*.

3.1.6 Efeitos da BuChE no funcionamento cognitivo global

Não encontramos diferença entre a avaliação cognitiva dos doentes com DA, através dos valores de MMSE e a presença, ou ausência da variante K da BuChE ($p=0,383$) (tabela 3.15).

Tabela 3.15 – *Mini Mental State Examination* (MMSE) em doentes de DA, em função da variante K da BuChE.

	MMSE	p
NN (n=116)	16,9 ($\pm 6,5$)	0,383
NK+KK (n=56)	17,8 ($\pm 6,4$)	

Os dados são apresentados como média (\pm desvio padrão). A diferença entre os grupos de doentes foram estudados pelo teste *Mann-Whitney*. DA – Doença de Alzheimer; MMSE – *Mini Mental State Examination*

Também ao procurarmos correlacionar a atividade da BuChE com a avaliação cognitiva não se encontrou uma correlação significativa ($\rho=0,085$ e $p=0,257$). Os valores do MMSE também não se mostraram diferentes em doentes de DA que apresentavam atividades da BuChE abaixo da média ou acima da média ($18,5 \pm 6,3$; $n=59$ versus $19,1 \pm 4,2$; $n=31$; $p=0,591$).

3.2 – EFEITO DA BUTIRILCOLINESTERASE NA CONVERSÃO DE DCL PARA DA

3.2.1 Caracterização da amostra estudada

Os dados das características clínicas e demográficas da população englobada neste estudo encontram-se descritas na tabela 3.16. Foram estudados 96 doentes com DCL, dos quais 50 progrediram para DA (DCL-DA), enquanto 38 se mantiveram cognitivamente estáveis durante o período de seguimento (DCL-Est). Os restantes 8 tiveram um tempo de acompanhamento inferior a dois anos, pelo que não foi possível classificá-los em relação à progressão ou não para DA.

Não existiram diferenças entre os tempos médios de seguimento dos doentes que progrediram para DA, ($5,8 \pm 3,7$ anos) e os que se mantiveram estáveis ($5,5 \pm 3,3$ anos) ($p=0,709$). De notar que o tempo médio de progressão para DA, no grupo dos DCL-DA foi de $4,0 \pm 3,0$ anos.

Tabela 3.16 – Características da população de DCL

	Total (n=96)	DCL-DA (n=50)	DCL-Est (n=38)	p-value
Género (M/F)	38/58	21/29	14/24	0,624 ^{a)}
Idade, anos	69,9 ($\pm 0,6$)	71,7 ($\pm 8,1$)	68,6 ($\pm 8,6$)	0,079 ^{b)}
Idade de início, anos	66,4 ($\pm 9,0$)	68,4 ($\pm 8,4$)	64,1 ($\pm 9,3$)	0,023 ^{b)}
Escolaridade, anos	6,0 ($\pm 3,8$)	6,5 ($\pm 4,0$)	5,7 ($\pm 3,8$)	0,346 ^{b)}
MMSE	26,4 ($\pm 3,0$)	25,0 ($\pm 3,2$)	27,4 ($\pm 2,6$)	<0,001 ^{b)}
ApoE:				
$\epsilon 2, \epsilon 2$ (n,%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,011 ^{a)}
$\epsilon 2, \epsilon 3$ (n,%)	4 (4,2%)	2 (4,0%)	1 (2,6%)	
$\epsilon 2, \epsilon 4$ (n,%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
$\epsilon 3, \epsilon 3$ (n,%)	54 (56,3%)	21 (42,0%)	29 (76,3%)	
$\epsilon 3, \epsilon 4$ (n,%)	34 (35,4%)	24 (48,0%)	8 (21,1%)	
$\epsilon 4, \epsilon 4$ (n,%)	4 (4,2%)	3 (6,0%)	0 (0,0%)	

Dados apresentados como média (\pm desvio padrão), e os genótipos da ApoE em valores absolutos e percentagem (%). A comparação das diferenças entre DCL-DA e DCL-Est foram calculados pelos testes estatísticos: a) χ^2 da independência de Pearson e b) pelo teste *t-student*. DCL-DA doentes de DCL que progrediram para Doença de Alzheimer (DA); DCL-Est – doentes de DCL que se mantiveram estáveis sem evoluírem para DA; F – género feminino; M - género masculino; MMSE – *Mini Mental State Examination*.

Não foram encontradas diferenças na distribuição de género entre os doentes de DCL-DA e os DCL-Est ($p=0,624$).

A nível da escolaridade, também não encontramos diferença entre os dois subgrupos com DCL ($p=0,346$). A idade de início da doença era significativamente mais alta nos DCL-DA ($p=0,023$), havendo também uma tendência para uma idade superior na altura da colheita do LCR ($p=0,079$).

Como era expetável, tanto os valores de base das pontuações do MMSE, foram estatisticamente mais baixos nos DCL-DA ($25,0 \pm 3,2$) do que nos DCL-Est ($27,4 \pm 2,6$) ($p<0,001$), como a percentagem de portadores do alelo $\epsilon 4$ da ApoE foi mais elevada no subgrupo de DCL-DA, com 54,0%, comparando com os DCL-Est, em que esse valor era de 21,1% ($p=0,004$). A distribuição dos seis possíveis genótipos da ApoE foi também estatisticamente diferente entre os dois subgrupos de DCL ($p=0,011$; tabela 3.16), não apresentando desvios ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. No subgrupo de DCL-Est o genótipo predominante foi $\epsilon 3\epsilon 3$, em 76,3% dos doentes, seguido pelo $\epsilon 3\epsilon 4$, em 21,1%, e nos doentes DCL-DA a frequência destes genótipos foi de 42,0% e 48,0%, respetivamente. Na nossa população não encontramos indivíduos com os genótipos $\epsilon 2\epsilon 2$ e $\epsilon 2\epsilon 4$. Digno de registo é o facto de todos os doentes homozigóticos para o alelo $\epsilon 4$ ($n=3$), terem progredido para DA.

3.2.2 Determinação da variante K da butirilcolinesterase nos indivíduos com DCL

A distribuição dos genótipos da BuChE (tabela 3.17) não mostrou ser significativamente diferente entre os dois subgrupos de doentes com DCL ($p=0,603$). Do mesmo modo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na percentagem de portadores da variante K da BuChE entre DCL-DA, com 42,0% e DCL-Est com 31,6% ($p=0,317$). A frequência do alelo K foi de 23,0% e de 17,0% para DCL-DA e DCL-Est, respetivamente, (OR: 1,45, 95% IC 0,68 – 3,09), sem diferença estatisticamente significativa. Também não foram encontradas diferenças na distribuição da variante K da BuChE por géneros, nem em DCL-DA ($p=0,999$), nem em DCL-Est ($p=0,954$).

Tabela 3.17 – Distribuição do genótipo da BuChE na população de DCL

	Total (n=96)	DCL-DA (n=50)	DCL-Est (n=38)
BuChE-variante K (n,%)	NN-59 (61,5) NK-34 (35,4) KK-3 (3,1)	NN-29 (58,0) NK-19 (38,0) KK-2 (4,0)	NN-26 (68,4) NK-11 (28,9) KK-1 (2,6)
Alelo N (n,%)	152 (79,2)	77 (77,0)	63 (82,9)
Alelo K (n,%)	40 (20,8)	23 (23,0)	13 (17,1)
Género Feminino (n,%)	NN-37 (63,8) NK+KK-21 (36,2)	NN-17 (58,6) NK+KK-12 (41,4)	NN-17 (70,8) NK+KK-7 (29,2)
Género Masculino (n,%)	NN-22 (57,9) NK+KK-16 (42,1)	NN-12 (57,1) NK+KK-9 (42,9)	NN-9 (64,3) NK+KK-5 (35,7)

Os dados são apresentados em número absoluto e percentagem.

As diferenças entre os grupos foram calculados pelo teste χ^2 da independência de Pearson. DCL-DA - doentes de DCL que progrediram para Doença de Alzheimer (DA); DCL-Est – doentes de DCL que se mantiveram estáveis sem evoluírem para DA.

Ao analisarmos os doentes de DCL como um todo, encontrámos uma associação entre ser portador do alelo $\epsilon 4$ da ApoE e da variante K da BuChE, sendo o alelo K significativamente mais frequente em portadores do alelo $\epsilon 4$, do que nos não portadores (55,3% versus 27,6%; $p=0,012$) (tabela 3.18). Interessantemente, quando dividimos os doentes de DCL, de acordo com a sua progressão clínica, esse efeito mantém-se no subgrupo de DCL-DA ($p=0,017$), mas não nos que se mantiveram estáveis, DCL-Est, ($p=0,982$).

Tabela 3.18 – Distribuição do Genótipo da Butirilcolinesterase de acordo com a presença do alelo $\epsilon 4$ da ApoE em doentes com DCL

	Com ApoE-$\epsilon 4$	Sem ApoE-$\epsilon 4$	<i>p value</i>
Total	(n=38)	(n=58)	
<input type="checkbox"/> NN	17 (44,7%)	42 (72,4%)	0,012
<input type="checkbox"/> NK+KK	21 (55,3%)	16 (27,6%)	
DCL-DA	(n=27)	(n=23)	
<input type="checkbox"/> NN	11 (40,7%)	18 (78,3%)	0,017
<input type="checkbox"/> NK+KK	16 (59,3%)	5 (21,7%)	
DCL-Est	(n=8)	(n=30)	
<input type="checkbox"/> NN	6 (75,0%)	20 (66,7%)	0,982
<input type="checkbox"/> NK+KK	2 (25,0%)	10 (33,3%)	

Os dados são apresentados em dados absolutos e percentagem.

As diferenças entre grupos foram calculados pelo teste χ^2 da independência de Pearson. DCL-DA - doentes de DCL que progrediram para Doença de Alzheimer (DA); DCL-Est – doentes de DCL que se mantiveram estáveis sem evoluírem para DA.

3.2.3 Associação dos alelos ApoE- ϵ 4 e BuChE-K com a deterioração cognitiva e a progressão para DA

Os doentes portadores de ambos os alelos ApoE ϵ 4(+) e BuChE K (NK+KK) foram os que apresentaram pontuações de base mais baixas no teste cognitivo (MMSE = 24,9 \pm 2,9), apresentando diferenças com significado estatístico ($p=0,043$) (tabela 3.19), relativamente aos outros grupos de doentes com as outras combinações alélicas.

Tabela 3.19 – MMSE em doentes com DCL

		MMSE	p
NN	ApoE ϵ 4 (+) (n=17)	27,4 (\pm 1,7)	0,043
	ApoE ϵ 4 (-) (n=42)	26,8 (\pm 2,7)	
NK+KK	ApoE ϵ 4 (+) (n=21)	24,9 (\pm 2,9)	
	ApoE ϵ 4 (-) (n=16)	26,3 (\pm 3,9)	

Os resultados são apresentados em média (\pm) desvio padrão.
As diferenças entre grupos foram calculadas pelo teste ANOVA a 1 fator. MMSE - *Mini Mental State Examination*.

A análise de Covariância revelou um efeito significativo da variante K da BuChE ($p=0,019$), mas não do alelo ϵ 4 da ApoE ($p=0,527$) na avaliação basal da cognição.

Além disso, como é possível observar na figura 3.2, verificou-se um aumento da incidência da progressão de DCL para DA na presença dos dois alelos ($p=0,005$).

Os doentes com DCL portadores da BuChE-K e do ApoE- ϵ 4, apresentaram a incidência de progressão para DA mais elevada (89%), comparado com os doentes sem BuChE-K, portadores de ApoE- ϵ 4 (65%). Esta diferença não atingiu contudo significado estatístico ($p=0,096$). Os doentes portadores da variante K da BuChE, na ausência de ApoE- ϵ 4 apresentaram a incidência de progressão para DA mais baixa (33%), que não revelou diferenças relativamente à progressão nos doentes não portadores dos dois alelos (47%; $p=0,535$).

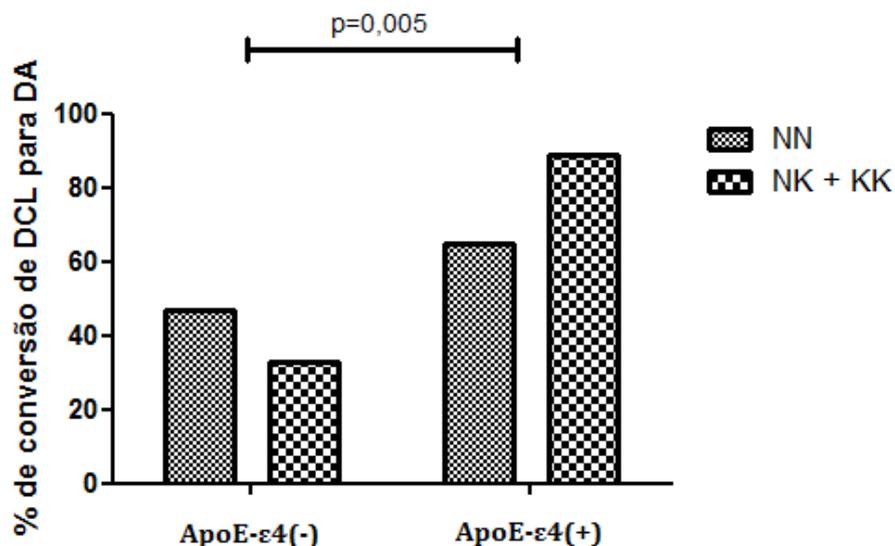


Figura 3.2 – Percentagem de doentes de DCL que progrediram para DA durante o período de seguimento clínico de acordo com os genótipos da ApoE e BuChE. Teste: χ^2 da independência de Pearson.

Uma análise de regressão multivariada que incluiu como variáveis independentes a idade, o género e os genótipos da ApoE e da BuChE, identificou a idade ($p=0,010$) e genótipo da ApoE/BuChE ($p=0,022$) como preditores de conversão para DA.

Digno de nota é que só a presença de ambos os alelos ApoE-ε4 e BuChE-K, e não cada um isoladamente, conferiu risco de conversão para DA (OR=7,246: 95% IC = 1,409-37,271) (tabela 3.20).

Tabela 3.20 – Modelo de regressão logística binária de preditores de conversão para DA

Variáveis	β (EP)	p	OR	IC (95%)
Constante	-6,036 (2,318)	0,009	0,002	
Idade	0,081 (0,032)	0,010	1,085	(1,020; 1,154)
Género	0,222 (0,490)	0,650	0,801	(0,306; 2,093)
ApoE/BuChE	1,842 (0,802)	0,022	6,308	(1,309; 30,395)

β (EP) = Coeficiente de Regressão Não Standardizado (Erro Padrão do Coeficientes de Regressão Não Standardizado); p = Significância do teste Wald; OR = Odds Ratio; IC (95%) = Intervalo de Confiança da 95% para a Estatística de Odds Ratio.

Seguidamente traçaram-se as curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para avaliar a probabilidade de conversão de DCL para DA ao longo do tempo, em função das possíveis combinações dos genótipos da ApoE e da BuChE (Figura 3.3). Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa no tempo médio de progressão de DCL para DA entre os quatro subgrupos de combinações genotípicas (BuChE NN/ApoE ε4- =

8,75±1,15 anos; BuChE/NN ApoE ε4+ = 4,71±0,43 anos; BuChE NK+KK/ApoE ε4- = 9,12±1,63 anos; BuChE NK+KK/ApoE ε4+ = 4,89±0,96 anos; p=0,037). A comparação das curvas duas a duas, revelou diferenças significativas apenas entre as combinações BuChE NN/ApoE ε4- e BuChE NK+KK/ApoE ε4+ (p=0,018) e entre BuChE NK+KK/ApoE ε4+ e BuChE NK+KK/ApoE ε4- (p=0,025).

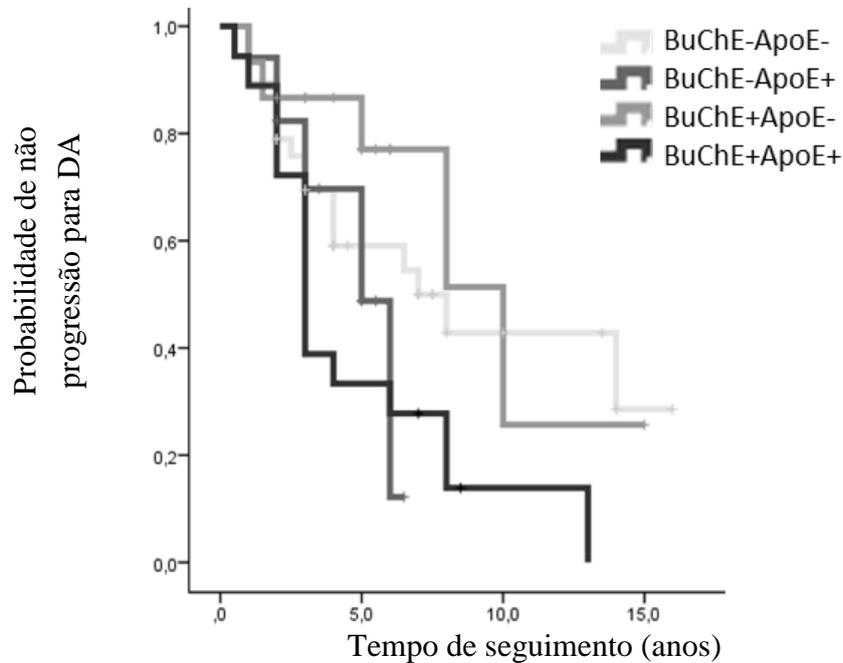


Figura 3.3 – Curvas de sobrevivência de Kaplan – Meier para a probabilidade de progressão para DA em doentes com DCL.

3.2.4 Atividade da BuChE e biomarcadores do LCR nos indivíduos com DCL

Os níveis da atividade basal da BuChE, no LCR, bem como os níveis de A β 42, Tau e p-Tau da população com DCL incluída neste estudo são apresentados na tabela 3.21. Na determinação das atividades da BuChE, não foram incluídos os doentes, que no momento da colheita do LCR, estavam medicados com Rivastigmina.

Tabela 3.21 – Níveis de A β 42, Tau e p-Tau e atividade da Butirilcolinesterase (BuChE) em doentes com DCL

	Total (n=96)	DCL-DA (n=50)	DCL-Est (n=38)	p-value
A β 42, pg/mL	663,3 (\pm 305,04)	536,5 (\pm 207,7)	815,2 (\pm 347,1)	<0,001
Tau, pg/mL	396,2 (\pm 295,1)	523,8(\pm 329,7)	247,1 (\pm 150,6)	<0,001
p-Tau, pg/ml	50,0 (\pm 28,7)	62,5 (\pm 30,3)	37,4 (\pm 20,9)	<0,001
Atividade da BuChE (U/L)	6,97 (\pm 3,10)*	6,93 (\pm 3,47)	6,96 (\pm 2,77)	0,965

Dados são apresentados como média (\pm desvio padrão).

*Determinações efetuadas em 94 doentes de DCL.

As diferenças dos níveis de A β 42, Tau e p-Tau entre os doentes de DCL-DA e DCL-Est foram calculadas pelo teste de *Mann-Whitney*.

DCL-DA - doentes de DCL que progrediram para Doença de Alzheimer (DA); DCL-Est – doentes de DCL que se mantiveram estáveis sem evoluírem para DA.

Não foram observadas diferenças na atividade da BuChE entre DCL-DA e DCL-Est ($p=0,965$).

Uma tendência para um aumento da atividade da BuChE foi observada nos homens, relativamente a mulheres ($7,76\pm 3,68$ versus $6,48\pm 2,59$ U/L; $p=0,064$), que também foi observada no subgrupo de homens que progrediram para DA ($8,18\pm 4,49$ vs. $6,37\pm 2,15$ U/L; $p=0,090$), mas não nos que permaneceram estáveis ($7,08\pm 2,65$ vs. $6,78\pm 3,04$ U/L; $p=0,856$).

Como era expectável os níveis basais de A β 42, no LCR, eram significativamente mais baixos e os níveis de Tau e p-Tau significativamente mais altos nos doentes DCL-DA ($p<0,001$). De referir que os valores observados no subgrupo de DCL-DA foram muito semelhantes aos já descritos nos doentes de DA em 3.1 (ver tabela 3.10 nessa secção).

Foi encontrada uma correlação entre a atividade da BuChE, no LCR e os níveis de Tau no conjunto total dos doentes de DCL estudados ($r=0,219$; $p=0,034$). Não foram

encontradas contudo outras correlações entre a atividade da BuChE e os outros biomarcadores (A β 42 e p-Tau), nem com a idade ou com os valores do MMSE, quer no grupo de DCL como um todo, quer nos subgrupos DCL-DA e DCL-Est.

3.2.5 Análise da influência do alelo ϵ 4 da ApoE e da variante K na atividade da BuChE e nos níveis de biomarcadores do LCR

Não se observou uma influência significativa da presença do alelo ApoE- ϵ 4 na atividade da BuChE no total dos doentes de DCL ($p=0,898$), nem nos subgrupo DCL-DA ($p=0,562$) e DCL-Est ($p=0,283$). Contudo observámos uma influência significativa da presença do alelo ApoE- ϵ 4 nos níveis de A β 42 ($p=0,008$), Tau ($p=0,025$) e p-Tau ($p=0,008$) no grupo de doentes de DCL total. No entanto, essas diferenças não se mantêm quando comparamos os valores desses biomarcadores nos subgrupos dos doentes de DCL-Est e nos de DCL-DA (tabela 3.22).

Tabela 3.22 – Atividade da BuChE e biomarcadores (A β 42, Tau e p-Tau) no LCR nos doentes com DCL em função de serem portadores do alelo ApoE ϵ 4

		DCL Total	DCL-DA	DCL-Est
BuChE (U/L)	ApoE- ϵ 4 (+)	6,89 (\pm 2,47) (n=37)	6,53 (\pm 2,09) (n=26)	7,99 (\pm 3,30) (n=8)
	(-)	7,03 (\pm 3,46) (n=57)	7,75 (\pm 4,38) (n=22)	6,60 (\pm 2,73) (n=30)
	p	0,898	0,562	0,283
A β 42 (pg/mL)	ApoE- ϵ 4 (+)	560,9 (\pm 254,6) (n=38)	494,2 (\pm 200,2) (n=27)	809,7 (\pm 275,3) (n=8)
	(-)	730,3 (\pm 318,5) (n=58)	586,1 (\pm 209,6) (n=23)	816,6 (\pm 368,0) (n=30)
	p	0,008	0,127	1,000
Tau (pg/mL)	ApoE- ϵ 4 (+)	469,2 (\pm 342,5) (n=38)	560,7 (\pm 362,4) (n=27)	229,8 (\pm 128,9) (n=8)
	(-)	348,4 (\pm 251,2) (n=58)	479,4 (\pm 288,5) (n=23)	251,8 (\pm 157,5) (n=30)
	p	0,025	0,316	0,775
p-Tau (pg/mL)	ApoE- ϵ 4 (+)	60,1 (\pm 33,8) (n=38)	70,5 (\pm 34,2) (n=27)	35,9 (\pm 16,0) (n=8)
	(-)	43,4 (\pm 22,7) (n=58)	53,2 (\pm 22,2) (n=23)	37,8 (\pm 22,2) (n=30)
	p	0,008	0,062	0,971

Os dados são apresentados em média (\pm) desvio padrão.

As diferenças entre grupos foram calculadas pelo Teste de *Mann-Whitney*.

DCL-DA – doentes de DCL que progrediram para Doença de Alzheimer (DA); DCL-Est – doentes de DCL que se mantiveram estáveis sem evoluírem para DA.

Quando analisámos a influência da presença da variante K, na atividade basal da BuChE, no LCR, no grupo total de doentes com DCL ($p=0,290$), e nos que progrediram para DA ($p=0,950$), não observámos um efeito significativo. Contudo, no grupo de doentes DCL-

Est, houve uma tendência para uma menor atividade da BuChE nos portadores da variante K da enzima ($5,71 \pm 2,17$ U/L vs. $7,44 \pm 3,02$ U/L; $p=0,076$).

Relativamente aos níveis dos biomarcadores A β 42, Tau e p-Tau, não foram encontradas diferenças em qualquer dos grupos estudados (tabela 3.23).

Tabela 3.23 – Atividade da BuChE e biomarcadores (A β 42, Tau e p-Tau) no LCR nos doentes com DCL em função de serem portadores ou não da variante K da BuChE.

		DCL Total	DCL-DA	DCL-Est
BuChE (U/L)	BuChE - NN	7,31 ($\pm 3,51$) (n=58)	7,34 ($\pm 4,02$) (n=28)	7,44 ($\pm 3,02$) (n=26)
	NK+KK	6,42 ($\pm 2,22$) (n=36)	6,75 ($\pm 2,18$) (n=20)	5,71 ($\pm 2,17$) (n=12)
	p	0,290	0,950	0,076
A β 42 (pg/mL)	BuChE - NN	694,5 ($\pm 319,3$) (n=59)	529,2 ($\pm 225,5$) (n=29)	855,6 ($\pm 338,6$) (n=26)
	NK+KK	613,4 ($\pm 277,7$) (n=37)	546,5 (185,2) (n=21)	727,5 ($\pm 363,9$) (n=12)
	p	0,297	0,673	0,362
Tau (pg/mL)	BuChE - NN	402,4 ($\pm 323,4$) (n=59)	556,3 ($\pm 375,8$) (n=29)	262,7 ($\pm 169,5$) (n=26)
	NK+KK	386,4 ($\pm 247,3$) (n=37)	477,7 ($\pm 254,7$) (n=21)	213,3 ($\pm 95,7$) (n=12)
	p	0,892	0,562	0,561
p-Tau (pg/mL)	BuChE - NN	50,1 ($\pm 27,1$) (n=59)	62,7 ($\pm 25,5$) (n=29)	39,1 ($\pm 24,3$) (n=26)
	NK+KK	49,8 ($\pm 31,4$) (n=37)	62,2 ($\pm 36,6$) (n=21)	33,8 ($\pm 10,0$) (n=12)
	p	0,580	0,415	0,851

Os dados são apresentados em média (\pm) desvio padrão.

As diferenças entre grupos foram calculadas pelo Teste de *Mann-Whitney*.

DCL-DA – doentes de DCL que progrediram para Doença de Alzheimer (DA); DCL-Est – doentes de DCL que se mantiveram estáveis sem evoluírem para DA.

Procedemos a uma análise de ANOVA a 3 fatores, considerando o efeito de 3 variáveis independentes: Conversão de DCL para DA, genótipo da variante K e a presença do alelo $\epsilon 4$ da ApoE, na atividade da BuChE. Não observámos qualquer efeito destas variáveis isoladamente, nem interação entre elas, relativamente à atividade da BuChE.

Contudo quando procedemos à análise dos efeitos, destas mesmas três variáveis, sobre os níveis de A β 42, Tau e p-Tau, para além do efeito de interação da conversão de DCL para DA, nestes três marcadores ($F=23,876$; $p<0,001$), observámos um efeito de interação da BuChE K/ApoE $\epsilon 4+$ ($F=5,520$; $p=0,020$), apenas nos níveis de A β 42, em que os doentes que têm esta combinação dos genótipos e que converteram para DA, apresentam valores mais baixos deste biomarcador.

3.3 ANÁLISE DA ACETILCOLINESTERASE

3.3.1 Caracterização da amostra

Foram estudados 202 doentes, dos quais 72 estavam diagnosticados com DA, 57 com DFT e 73 com DCL (tabela 3.24). Não se observaram diferenças na média de idades ($p=0,052$), nem na distribuição por géneros entre os três grupos de diagnóstico ($p=0,893$).

A média de idades de início dos doentes de DA e de DCL era semelhante ($p=0,674$), assim como os níveis de escolaridade destes dois grupos ($p=0,546$).

Como expectável os valores de MMSE foram significativamente mais baixos no grupo de doentes de DA ($19,0\pm 5,7$) comparativamente aos valores obtidos no grupo de doentes de DCL ($26,7\pm 2,8$) ($p<0,001$).

Também na distribuição do genótipo da ApoE os resultados obtidos nos três grupos de doentes foram diferentes ($p=0,010$) sendo a frequência do genótipo $\epsilon 3, \epsilon 4$ nos doentes de DA de 36,1% e nos de DCL de 37,0%, enquanto, nos de DFT, era de 20,4%. A presença do alelo $\epsilon 4$, em homozigotia era superior nos doentes de DA, com 12,5%, seguido dos de DCL com 4,1% e por fim dos de DFT com 1,9%.

Os biomarcadores A β 42, Tau e p-Tau apresentaram valores médios compatíveis com o perfil de diagnóstico de cada grupo, apresentando os doentes de DA níveis mais baixos de A β 42 e mais altos de Tau e p-Tau, comparativamente aos doentes de DCL e de DFT. Não se verificaram diferenças para nenhum dos biomarcadores entre os valores obtidos nos doentes de DCL e DFT.

Tabela 3.24 – Caracterização da amostra de doentes incluídos na avaliação da acetilcolinesterase.

	DA n=72	DFT n=57	DCL n=73	p
Género M/F (n,%)	30 (41,7%)/ 42 (58,3%)	25 (43,9%)/ 32 (56,1%)	29 (39,7%)/ 44 (60,3%)	0,893 ^{a)}
Idade (anos)	69,1 (±9,0)	65,6 (±9,9)	68,9 (±8,3)	0,052 ^{b)}
Idade de início (anos)	65,4 (±9,6)	-----	64,9 (±9,0)	0,674 ^{c)}
Escolaridade (anos)	5,6 (±3,3)	-----	5,8 (±4,7)	0,546 ^{c)}
MMSE	19,0 (±5,7)	-----	26,7 (±2,8)	<0,001 ^{c)}
ε2, ε3	1 (1,4%)	5 (9,3%)	3 (4,1%)	0,010 ^{a)}
ε2, ε4	1 (1,4%)	3 (5,6%)	0 (0,0%)	
ε3, ε3	35 (48,6%)	34 (63%)	40 (54,8%)	
ε3, ε4	26 (36,1%)	11 (20,4%)	27 (37%)	
ε4, ε4	9 (12,5%)	1 (1,9%)	3 (4,1%)	
Aβ42 (pg/ml)	451,1 (±224,5)	711,3 (±312,2)	670,6 (±307,5)	<0,001 ^{d)}
Tau (pg/ml)	508,6 (±365,8)	385,2 (±434,5)	399,8 (±316,4)	0,001 ^{d)}
p-Tau (pg/ml)	55,0 (±28,6)	47,9 (±43,0)	48,0 (±27,1)	0,022 ^{d)}

Dados apresentados como média (±) desvio padrão, e os genótipos da ApoE em valores absolutos e percentagem (%). A comparação das diferenças entre os grupos de doentes foram calculados através dos testes estatísticos: a) χ^2 da independência de Pearson; b) pelo teste ANOVA a uma via; c) pelo teste de *Mann-Whitney*; d) pelo teste de *Kruskal-Wallis*. DA - doentes de Alzheimer; DFT – Demência Fronto Temporal; DCL-Defeito Cognitivo Ligeiro; F – género feminino; M - género masculino; MMSE – *Mini Mental State Examination*.

3.3.2 Avaliação da AChE na DA e DFT

3.3.2.1 Determinação da atividade da AChE no LCR

Procedemos à determinação da atividade da Acetilcolinesterase, em amostras de LCR, de 72 doentes diagnosticados com DA e de 57 com DFT.

Na determinação das atividades da AChE, não foram incluídos os doentes, que no momento da colheita do LCR, estavam medicados com qualquer um dos inibidores das colinesterases (Donepezil, Galantamina, ou Rivastigmina).

A média da atividade da AChE encontrada nos dois grupos de diagnóstico (tabela 3.25) foi de 13,08 ($\pm 6,54$) U/L nos doentes com DA e de 14,58 ($\pm 10,75$) U/L nos doentes de DFT, as quais não se mostraram estatisticamente diferentes ($p=0,833$).

Tabela 3.25 – Determinação da atividade da AChE no LCR, de doentes com DA e com DFT.

Diagnóstico	Atividade da AChE (U/L)	p
DA (n=72)	13,08 ($\pm 6,54$)	0,833
DFT (n=57)	14,58 ($\pm 10,75$)	

Os resultados da atividade da AChE no LCR são expressos em média \pm desvio padrão.

As diferenças entre as atividades da AChE nos doentes de DA e nos de DFT foram calculadas pelo teste de *Mann-Whitney*. DA – Doença de Alzheimer; DFT – Demência Fronto Temporal

Procedemos à análise da atividade da AChE por género dentro dos dois grupos de demências, não tendo sido encontradas diferenças na atividade da enzima, entre o género feminino e o masculino (13,13 \pm 6,31 U/L *versus* 12,99 \pm 6,96 U/L; $p=0,732$), dos doentes de DA (tabela 3.26).

Nos doentes de DFT já foi encontrada diferença estatisticamente significativa na atividade da AChE que se revelou mais elevada no género feminino (17,55 \pm 13,19 U/L), relativamente à que foi determinada no género masculino (10,77 \pm 4,26 U/L) ($p=0,016$) (tabela 3.26).

Tabela 3.26 – Atividade da AChE dos doentes de DA e de DFT de acordo com o género

		DA	DFT
		n=72	n=57
Atividade da AChE (U/L)	Género masculino	12,99 ($\pm 6,96$) (n=30)	10,77 ($\pm 4,26$) (n=25)
	Género feminino	13,13 ($\pm 6,31$) (n=42)	17,55 ($\pm 13,19$) (n=32)
p		0,732	0,016

Os resultados da atividade da AChE no LCR são apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram calculadas pelo teste de *Mann-Whitney*. DA – Doença de Alzheimer; DFT – Demência Fronto Temporal.

Verificámos a existência de possíveis correlações nos doentes de DA entre a atividade da Acetilcolinesterase com outras variáveis, tais como: atividade da BuChE, idade, MMSE e os níveis dos três biomarcadores A β 42, Tau e p-Tau. Observou-se a existência de correlação com a atividade da BuChE ($\rho=0,570$; $p<0,001$) e com os níveis de p-Tau ($\rho=0,351$; $p=0,003$), mas não foi verificada a existência de qualquer correlação relativamente à idade dos doentes ($\rho=0,158$; $p=0,187$), aos níveis de A β 42 ($\rho=0,017$; $p=0,890$), da Tau ($\rho=0,137$; $p=0,260$) e também no indicador da avaliação cognitiva MMSE ($\rho=0,216$; $p=0,077$).

104 Comparámos os valores médios da atividade da AChE em função da idade de início da doença de Alzheimer, (EOAD vs LOAD), não se tendo verificado a existência de diferenças entre os dois grupos de doentes ($p=0,105$; tabela 3.27).

Tabela 3.27 – Atividade da AChE entre doentes de EOAD e LOAD.

	EOAD (n=28)	LOAD (n=44)	p
AChE (U/L)	11,87 \pm 6,79	13,85 \pm 6,34	0,105

Os resultados da atividade da AChE no LCR são apresentados como média \pm desvio padrão.

As diferenças entre grupos foram calculadas pelo teste de *Mann-Whitney*. EOAD – Doença de Alzheimer de início precoce; LOAD – Doença de Alzheimer de início tardio.

Também comparámos a atividade da AChE nos doentes de DA, em função de serem ou não portadores do alelo $\epsilon 4$ da ApoE, tendo-se observado resultados tendencialmente mais elevados ($p=0,055$) nos portadores do alelo, relativamente aos não portadores (tabela 3.28).

Tabela 3.28 – Atividade da AChE em doentes de DA, portadores e não portadores do alelo ApoE ϵ 4.

	Com ApoE ϵ 4 (n=36)	Sem ApoE ϵ 4 (n=36)	p
AChE (U/L)	14,70 (\pm 7,34)	11,46 (\pm 5,26)	0,055

Os resultados da atividade da AChE são apresentados em média \pm desvio padrão.

A diferença entre os grupos foi calculado pelo teste de *Mann Whitney*.

Seguidamente fomos verificar a existência de possíveis correlações nos doentes de DFT entre a atividade da AChE e outras variáveis. Foi encontrada uma correlação da atividade da AChE com a idade dos doentes ($\rho=0,446$; $p=0,001$), a atividade da BuChE ($\rho=0,501$; $p<0,001$), não se tendo verificado qualquer outro tipo de correlação com os biomarcadores A β 42 ($\rho=-0,001$; $p=0,994$), com Tau ($\rho=0,093$; $p=0,491$) e com p-Tau ($\rho=0,190$; $p=0,157$).

3.3.2.2 Distribuição do polimorfismo rs 2571598 da AChE em doentes de DA

Procedemos ao estudo da distribuição do polimorfismo rs 2571598 da AChE em 50 dos doentes de DA, incluídos neste estudo, o qual estava presente em 54,0% destes, 36,0% dos doentes de DA apresentavam o polimorfismo em heterozigotia (C/T), 18,0% eram homozigóticos (T/T), enquanto os restantes 46% não eram portadores (C/C) do polimorfismo estudado (tabela 3.29).

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas na distribuição deste polimorfismo entre homens e mulheres ($p=0,950$) (tabela 3.29). Mesmo quando associamos os portadores do polimorfismo rs 2571598 da AChE em homozigotia, com os que se apresentavam heterozigóticos (homozigóticos+heterozigóticos) não se observaram diferenças entre géneros ($p=0,879$; tabela 3.29).

Tabela 3.29 – Distribuição do polimorfismo rs 2571598 da AChE em doentes de DA.

Genótipo rs 2571598	Total (n=50)	Género feminino (n=31)	Género masculino (n=19)	χ^2
C/C (n,%)	23 (46,0%)	14 (45,2%)	9 (47,4%)	0,950
C/T (n,%)	18 (36,0%)	11 (35,5%)	7 (36,8%)	
T/T (n,%)	9 (18,0%)	6 (19,4%)	3 (15,8%)	
Não portadores (n, %)	23 (46,0%)	14 (45,2%)	9 (47,4%)	0,879
Portadores (n, %)	27 (54,0%)	17 (54,8%)	10 (52,6%)	

Os resultados são expressos em valor absoluto e percentagem (%).

A diferença entre os grupos estudados, foi calculada pelo teste estatístico do χ^2 da independência de Pearson.

C/C – não portadores do polimorfismo; C/T – portadores do polimorfismo em heterozigotia; T/T – portadores do polimorfismo em homozigotia.

Procurámos estudar a distribuição do polimorfismo da AChE em função da idade de início da DA, considerado como EOAD (<65 anos) e LOAD (≥ 65 anos) não se tendo encontrado diferenças entre estes dois subgrupos de doentes de DA ($p=0,914$; tabela 3.30).

Tabela 3.30 – Distribuição do polimorfismo rs 2571598 da AChE em função da idade de início da DA.

	Não portadores (n,%)	Portadores (n,%)	p
EOAD (n=17)	8 (34,8%)	9 (33,3%)	0,914
LOAD (n=33)	15 (65,2 %)	18 (66,7%)	

Os resultados são expressos em valor absoluto e percentagem (%).

A diferença entre os grupos estudados, foi calculada pelo teste estatístico do χ^2 da independência de Pearson.

EOAD - Doença de Alzheimer de início Precoce; LOAD - Doença de Alzheimer de início. Não portadores – C/C; Portadores (C/T+T/T).

3.3.2.2.1 Polimorfismo rs 2571598 da AChE em portadores do alelo ApoE ϵ 4

Procedemos à comparação da distribuição do polimorfismo rs 2571598 da AChE em doentes de DA, com e sem o alelo ϵ 4 da ApoE, não se tendo encontrado diferenças significativas na distribuição desse polimorfismo ($p=0,600$; tabela 3.31). Em 27 doentes que não são portadores do alelo ϵ 4 da ApoE, 11 também não possuem o polimorfismo rs 2571598 da AChE, enquanto 16 são portadores desse polimorfismo. Nos 23 doentes que possuem o alelo ϵ 4 da ApoE, 12 não possuem o polimorfismo da AChE, enquanto 11 são portadores também deste polimorfismo.

Tabela 3.31 – Distribuição do polimorfismo rs 2571598 da AChE, em doentes de DA, em função de serem ou não portadores do alelo ϵ 4 da ApoE.

	Não portadores (n,%)	Portadores (n,%)	p
Sem ApoE ϵ 4 (n=27)	11 (47,8%)	16 (59,3%)	0,600
Com ApoE ϵ 4 (n=23)	12 (52,2%)	11 (40,7%)	

A distribuição dos polimorfismos são apresentados em valor absoluto e percentagem (%).

A diferença entre χ^2 da independência de Pearson com correção de continuidade.

Não portadores – C/C; Portadores (C/T+T/T).

3.3.2.2 Efeito do polimorfismo rs 2571598 no funcionamento cognitivo global

Comparámos os valores do indicador de avaliação cognitiva global (MMSE) em função da presença do polimorfismo rs 2571598 da AChE, em 47 doentes de DA.

Não encontramos diferenças nos valores do indicador global de cognição, nos doentes de DA, portadores e não portadores deste polimorfismo da AChE ($p=0,422$; tabela 3.32).

Tabela 3.32 – Efeito do polimorfismo rs 2571598 da AChE nos níveis de MMSE em doentes de DA.

	Não portadores (n=22)	Portadores (n=25)	p
MMSE	20,4±4,8	18,9±5,5	0,422

Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão.

As diferenças entre os grupos foram calculadas pelo teste de *Mann-Whitney*. Não portadores – C/C; Portadores (C/T+T/T).

MMSE – *Mini Mental State Examination*.

3.3.2.3 - Atividade da AChE e biomarcadores em função do polimorfismo rs 2571598 da AChE

108

Foram analisadas as atividades da AChE nos doentes de DA que eram portadores do polimorfismo rs 2571598 (15,16±6,54 U/L) e nos que não eram portadores do referido polimorfismo (12,09±6,05 U/L), tendo-se observado uma tendência no aumento da atividade enzimática no grupo de doentes portadores do polimorfismo, relativamente aos não portadores ($p=0,056$; tabela 3.33).

Tabela 3.33 – Atividade da AChE no LCR em função do polimorfismo rs 2571598

Polimorfismo rs 2571598 da AChE	Atividade da AChE média (\pm DP) (U/L)	p
Não portadores (n=23)	12,09 (\pm 6,05)	0,056
Portadores (n=27)	15,16 (\pm 6,54)	

Os resultados são apresentados em média \pm desvio padrão.

A diferença entre os grupos foi calculada pelo teste de *Mann Whitney*. Não portadores – C/C; Portadores – C/T+T/T

Foram analisados os níveis de biomarcadores tendo em conta a presença ou ausência do polimorfismo rs 2571598 da AChE, não se tendo observado diferenças nos biomarcadores A β 42 ($p=0,327$), Tau ($p=0,451$) e p-Tau ($p=0,179$), entre o grupo de doentes de DA que

não eram portadores do polimorfismo rs 2571598 e os que possuíam esse polimorfismo quer em homozigotia quer em heterozigotia (tabela 3.34).

Tabela 3.34 – Níveis de A β 42, Tau e p-Tau no LCR em doentes de DA em função da presença do polimorfismo rs 2571598 da AChE.

	Não portadores do polimorfismo da AChE (n=23)	Portadores do polimorfismo da AChE (n=25)	p
A β 42 (pg/ml)	462,0 (\pm 296,4)	484,6 (\pm 191,8)	0,327
Tau (pg/ml)	489,3 (\pm 342,8)	586,1 (\pm 479,2)	0,451
p-Tau (pg/ml)	49,2 (\pm 22,5)*	63,4 (\pm 35,7)	0,179

Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão.

*Determinado em 22 doentes.

As diferenças entre grupos foram calculadas pelo teste de *Mann-Whitney*.

Não portadores – C/C; Portadores – C/T+T/T

3.3.3 Efeito da atividade da AChE na conversão de DCL para DA

A atividade da AChE, no LCR foi determinada em 73 doentes com DCL, dos quais 66 foram seguidos durante pelo menos 2 anos, o que permitiu avaliar a sua conversão, ou não, para DA. Destes, 35 converteram para DA, enquanto 31 deles não converteram durante o período de seguimento. Os valores da atividade média da AChE foram de $14,18 \pm 5,20$ U/L, para os que se mantiveram estáveis e de $14,95 \pm 5,03$ U/L para os que converteram para DA, não sendo estas diferenças estatisticamente significativas ($p=0,542$; tabela 3.35).

Tabela 3.35 – Atividade da AChE em doentes de DCL em função da conversão para DA

	DCL total (n=73)	DCL-Est (n=31)	DCL-DA (n=35)	p
Atividade da AChE (U/L)	14,39 (\pm 5,10)	14,18 (\pm 5,20)	14,95 (\pm 5,03)	0,542

Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão.

As diferenças entre grupos foi determinada pelo teste *t de Student*.

DCL-DA – doentes de DCL que progrediram para Doença de Alzheimer (DA); DCL-Est – doentes de DCL que se mantiveram estáveis sem evoluírem para DA.

Estudámos a atividade da AChE tendo em conta o género dos doentes, não se tendo observado diferenças na atividade da enzima entre homens e mulheres, tanto no grupo dos doentes que se mantiveram estáveis ($p=0,922$), como no grupo dos que converteram para DA ($p=0,090$) (tabela 3.36).

Tabela 3.36 – Atividade da AChE (U/L) de acordo com o género e conversão para DA.

	DCL-Est	DCL-DA
	n=31	n=35
Género Masculino	14,06 ($\pm 4,46$) (n=12)	13,19 ($\pm 4,39$) (n=14)
Género feminino	14,25 ($\pm 5,74$) (n=19)	16,13 ($\pm 5,19$) (n=21)
p	0,922	0,090

Os resultados são apresentados em média de atividade \pm desvio padrão.

A diferença entre grupos foi calculada pelo teste de *Mann-Whitney*.

DCL-DA – doentes de DCL que progrediram para Doença de Alzheimer (DA); DCL-Est – doentes de DCL que se mantiveram estáveis sem evoluírem para DA.

110

Fomos calcular a média da atividade da AChE nos doentes de DCL em função de serem, ou não, portadores do alelo $\epsilon 4$ da ApoE. Não se observaram diferenças significativas quer nos doentes que permaneceram estáveis (DCL-Est, $p=0,101$), quer nos doentes que converteram para DA (DCL-DA, $p=0,411$; tabela 3.37).

Tabela 3.37 – Atividade da AChE em doentes de DCL em função da presença do alelo ApoE $\epsilon 4$

	DCL-Est	DCL-DA
	n=31	n=35
AChE (U/L) ApoE- $\epsilon 4$ (+)	17,03 ($\pm 2,09$) (n=7)	14,34 ($\pm 4,83$) (n=20)
(-)	13,35 ($\pm 4,73$) (n=24)	15,77 ($\pm 5,35$) (n=15)
p-value	0,101	0,411

Os resultados da atividade da AChE são expressos em média \pm desvio padrão.

As diferenças entre os dois grupos de doentes de DCL foram calculados pelo teste de *Mann-Whitney*.

DCL-DA – doentes de DCL que progrediram para Doença de Alzheimer (DA);

DCL-Est – doentes de DCL que se mantiveram estáveis sem evoluírem para DA.

Procedemos ainda ao estudo de possíveis correlações entre a atividade da AChE e outras variáveis em estudo (atividade da BuChE, idade, MMSE e níveis dos biomarcadores A β 42, Tau e p-Tau).

No grupo de doentes que no período de estudo não converteram para DA (DCL-Est) verificamos que a atividade da AChE se correlacionava com a atividade da BuChE ($\rho=0,656$; $p<0,001$), com os níveis da proteína Tau ($\rho=0,403$; $p=0,025$) e da p-Tau ($\rho=0,565$; $p=0,001$), mas não apresentava correlação com a idade dos doentes ($\rho=0,298$; $p=0,104$), com os níveis do peptídeo A β 42 ($\rho=-0,091$; $p=0,625$) e com os valores de MMSE ($\rho=-0,271$; $p=0,140$).

A mesma análise efetuada nos doentes que converteram para DA (DCL-DA), só determinou a existência de correlação entre as atividades da AChE e da BuChE ($\rho=0,405$; $p=0,016$), sem correlação entre a atividade da AChE e a idade dos doentes ($\rho=0,234$; $p=0,176$), os níveis de A β 42 ($\rho=0,154$; $p=0,377$), Tau ($\rho=0,049$; $p=0,780$) e p-Tau ($\rho=0,013$; $p=0,941$), ou com os valores do MMSE ($\rho=-0,129$; $p=0,476$).

4. – Discussão

As Colinesterases são enzimas que pela sua atividade hidrolítica reguladora modulam a ação da acetilcolina, embora também tenham sido apontadas outras funções de caráter anti-inflamatório. Sendo a Doença de Alzheimer uma patologia onde há comprovado défice do sistema colinérgico, a clarificação do papel destas enzimas no desenvolvimento desta doença, reveste-se da maior importância.

Alguns estudos têm associado a variante K da Butirilcolinesterase à Doença de Alzheimer, pelo que fomos estudar a frequência da variante K da Butirilcolinesterase, num grupo de doentes de DA, comparando esses dados com os obtidos para um grupo controlo e também noutra forma de demência a DFT. Num subgrupo de doentes de doentes de DA e DFT determinámos também a atividade da BuChE no LCR. Procurámos então relacionar estes dois parâmetros com dados demográficos (idade e género) e cognitivos (MMSE) da população em estudo. Paralelamente correlacionámos os dados obtidos com a presença do alelo ApoE ϵ 4, o fator de risco consensualmente aceite para DA, e com os níveis de A β 42, Tau e p-Tau no LCR, reconhecidos biomarcadores para esta doença.

Numa segunda fase do nosso trabalho, seguimos uma abordagem semelhante à anteriormente descrita, para avaliar o efeito que a butirilcolinesterase teria na conversão dos doentes de DCL para DA. Para tal, recorreremos a um grupo de DCL, seguido durante um período de tempo superior a dois anos, possibilitando a sua subdivisão entre doentes que converteram para DA (DCL-DA) e os que se mantiveram estáveis (DCL-Est).

Por último fomos estudar os efeitos da Acetilcolinesterase na DA, DFT e DCL, tendo procedido à determinação da atividade da enzima no LCR de doentes com DA, DFT e DCL. De seguida avaliámos a distribuição do polimorfismo rs 2571598 da AChE apenas nos doentes de DA, por este polimorfismo ter sido previamente estudado na literatura em doentes com esta patologia. Nesta parte do estudo, tivemos em linha de conta as mesmas variáveis demográficas, clínicas e bioquímicas investigadas anteriormente.

A presente tese envolveu uma população total de 583 indivíduos, dos quais 217 estavam diagnosticados com DA, 70 com DFT, 96 com DCL e 200 controlos. Esta população serviu de base às três linhas de trabalho que nos propusemos desenvolver: i) Efeito da Butirilcolinesterase na DA; ii) Efeito da Butirilcolinesterase na progressão de DCL para DA; iii) Efeito da Acetilcolinesterase na DA.

4.1- BUTIRILCOLINESTERASE NA DA

O primeiro estudo da butirilcolinesterase envolveu 217 doentes de DA, 70 com diagnóstico de DFT e 200 indivíduos controlos, com uma distribuição por géneros semelhante entre os três grupos. No que respeita à idade, como expectável, os doentes de DFT apresentavam uma média de idades inferior à dos doentes de DA, uma vez que a maioria dos casos de DFT são diagnosticados antes dos 65 anos de idade (Balasa et al. 2015), maioritariamente entre a 3^a e a 4^a década de vida (Le Ber et al. 2007; Borroni et al. 2008), enquanto que a maioria dos casos de DA surgem em idades mais avançadas (idade superior a 65 anos), sendo considerado o aumento da idade, o principal fator de risco para o seu aparecimento (Rossor et al. 1996; Gatz et al. 2006; Perera et al. 2018).

No que se refere à frequência do alelo ApoE ϵ 4, os nossos resultados mostraram concordância com dados da literatura (American_Psychiatric_Association 1994) estando, também, de acordo com o que já foi previamente descrito para a população portuguesa (Fernandes et al. 1999), com um aumento significativo dos genótipos ϵ 3, ϵ 4 e ϵ 4, ϵ 4 nos doentes de DA, comparativamente com os doentes de DFT e com o grupo controlo, comprovando-se que a sua presença, constitui um já bem identificado fator de risco para esta doença (Corder et al. 1993).

Os resultados obtidos em doentes de DFT mostraram que a distribuição dos diferentes genótipos da ApoE não se diferenciava do grupo controlo, de acordo com o descrito previamente na literatura (Minthon et al. 1997).

Consequentemente, a frequência alélica da ApoE (ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4) mostrou uma distribuição estatisticamente diferente entre o grupo de doentes de DA, DFT e controlo, mesmo na análise dos grupos em estudo dois a dois, encontrámos diferenças entre as duas formas de demência e na comparação dos doentes de DA com o grupo controlo (Corder et al. 1998), no entanto, não existe diferença da distribuição alélica entre DFT e controlos, de acordo com outros autores (Minthon et al. 1997; Corder et al. 1998).

Relativamente ao polimorfismo da variante K da BuChE (rs1803274), nas amostras de doentes de DA e do grupo controlo, a sua frequência foi semelhante, não tendo sido observada a existência de diferenças entre a distribuição dos diferentes genótipos nestes dois grupos, dados que são corroborados por outros estudos (Simao-Silva et al. 2013; Bono et al. 2015). A frequência do alelo K em doentes de DA foi de 18,4%, tendo o grupo controlo apresentado uma frequência de 16,7%. Estes resultados não diferem do que é apontado para a população em geral (Bartels et al. 1992), nem em diversos estudos que envolveram diferentes populações do norte de Espanha (Alvarez-Arcaya et al. 2000), ilhas Canárias (Deniz-Naranjo et al. 2007) e nos Estados Unidos da América (Kehoe et al. 1998). Pelo contrário, doentes australianos (Panegyres et al. 1999), mostraram uma frequência mais elevada do alelo K da BuChE (24-32%), enquanto que doentes da Finlândia (Hiltunen et al. 1998), ou da China (Lee et al. 2000) apresentaram baixa frequência do alelo K (10-14%).

Apesar de alguns estudos terem identificado a variante K da BuChE como um fator de risco para o desenvolvimento de DA (Lehmann et al. 1997), no nosso estudo não foi encontrada associação entre esta variante, e um risco acrescido para DA. Isto está de acordo com uma recente meta-análise, na qual é reportado que esta variante não confere risco em populações Caucásicas (Wang et al. 2015). Trabalhos anteriores também não conseguiram mostrar uma associação entre esta variante e a DA na população do Reino Unido (Kehoe et al. 1998) e da Coreia (Ki et al. 1999).

Relativamente ao grupo de DFT, a distribuição da variante K da BuChE nestes doentes não apresentou diferenças relativamente aos doentes de DA, nem ao grupo controlo. A frequência do alelo K no grupo DFT foi de 18,9%, o que é semelhante ao que foi observada num estudo de Bizarro e colaboradores que encontrou uma frequência do alelo K da BuChE de 19,5% dos doentes com esta demência (Bizarro et al. 2010).

Os nossos resultados não estão contudo de acordo com o referido estudo previamente realizado em que foi observada uma menor frequência da variante K da BuChE, em doentes de DA (5,7%), comparados com doentes de DFT (19,5%) e controlos (10,1%) (Bizarro et al. 2010).

A distribuição desta variante em função dos géneros não se mostrou diferente, dentro dos três grupos de indivíduos que foram estudados, quer quando consideramos os três tipos possíveis (NN, NK, KK), quer quando associamos os heterozigóticos (NK) com os homozigóticos (KK). Pelo contrário um estudo de Alvarez-Arcaya apresenta a variante K

da BuChE com efeito protetor, em mulheres na DA, quando comparados a controles, apenas no subgrupo de doentes não portadores do alelo $\epsilon 4$ da ApoE (Alvarez-Arcaya et al. 2000).

No nosso estudo, quando estratificamos os doentes de DA por idade de início da doença, subdividindo entre EOAD e LOAD, com o grupo controlo também subdividido em função da idade no momento de colheita, continuámos a não encontrar associação entre a variante K da BuChE e o risco de DA. Contudo, tem sido mostrado que a BuChE-K modula a idade de início da doença, antecipando-a e acelerando o declínio cognitivo (Darreh-Shori et al. 2010; Darreh-Shori et al. 2011; Darreh-Shori et al. 2012; De Beaumont et al. 2016). No entanto, estes resultados não têm sido consensuais, tendo alguns estudos associado a expressão da variante K em homozigotia a formas de DA em idades mais avançadas, comprovadas em exames de necrópsia (Ghebremedhin et al. 2002). Curiosamente, este mesmo autor estudou a associação da variante K da BuChE com o desenvolvimento de patologia neurofibrilar e amilóide, em estudos de autopsia de rotina, tendo observado associação da expressão homozigótica desta variante com o aumento do risco de patologia neurofibrilar em idades precoces (<45 anos de idade) (Ghebremedhin et al. 2007).

Ao analisarmos uma eventual relação entre a presença do alelo $\epsilon 4$ e da variante K da BuChE, os nossos resultados não revelaram uma associação significativa entre estes dois fatores genéticos dentro de cada grupo estudado. No entanto, nos doentes de DA, parece existir uma tendência para uma associação entre a variante K da BuChE, em homozigotia e o alelo ApoE- $\epsilon 4$ (7,6% *versus* 1,8% nos que não eram portadores do alelo ApoE $\epsilon 4$), sendo de realçar que dos dez doentes homozigóticos para a variante K da BuChE, 8 possuíam simultaneamente o alelo $\epsilon 4$ da ApoE.

Também quando consideramos o conjunto dos portadores da variante K, somando os casos homozigóticos com os heterozigóticos, observou-se uma tendência semelhante ($p=0,075$) para uma associação com a presença do alelo ApoE $\epsilon 4$ nos doentes de DA.

De facto enquanto alguns estudos demonstraram um efeito de sinergia entre os portadores de ApoE $\epsilon 4$ e da variante K da BuChE em doentes de DA (Lehmann et al. 1997; Wiebusch et al. 1999), outros não conseguiram demonstrar este efeito (Singleton et al. 1998; Ki et al. 1999; Yamamoto et al. 1999). Esta discrepância de resultados poderá ser explicável pelo reduzido tamanho das amostras estudadas, com a consequente frequência baixa de

casos de homozigotia, que nalguns estudos não ultrapassa os 2%, não permitindo demonstrar este efeito de sinergia.

Para o grupo de doentes de DFT e controlos, não encontramos associação significativa entre os genótipos da BuChE-K e a presença do alelo ApoE ϵ 4, de acordo com o anteriormente observado por Bizarro e colaboradores (Bizzarro et al. 2010), nos doentes de DFT. Este dado, no entanto, não nos permite concluir que exista especificidade na associação destes dois fatores genéticos, pois na DFT apenas encontramos 1 doente que era homozigótico para a variante K da BuChE e que era portador do alelo ApoE ϵ 4 e no grupo controlo encontramos 3 homozigóticos para a BuChE-K, mas só um possuía, simultaneamente, o alelo ϵ 4 da ApoE.

A atividade da BuChE no LCR foi determinada em 95 doentes com DA e 69 doentes com DFT.

De notar que vários estudos mostraram que a atividade da butirilcolinesterase não é alterada pelo uso terapêutico de donepezil e galantamina, que são inibidores seletivos da acetilcolinesterase (Darreh-Shori et al. 2010; Parnetti et al. 2011). Assim sendo, no presente estudo nós incluímos 25 doentes que estavam sob tratamento desses inibidores, no momento da colheita da amostra.

116

Tivemos contudo em atenção o uso terapêutico de outros inibidores das colinesterases, no momento da colheita, não incluindo a determinação da atividade de 5 doentes que estavam sob tratamento da rivastigmina, um inibidor da acetilcolinesterase e da butirilcolinesterase.

A média da atividade da butirilcolinesterase que foi obtida nos doentes de DA (6,63 U/L) foi similar ao reportado noutros estudos (Darreh-Shori et al. 2012).

Não foi encontrada diferença entre a atividade desta enzima, no LCR, dos doentes com DA e DFT ($p=0,273$). Também alguns estudos não encontraram diferenças da atividade da BuChE no LCR, entre DA e outros tipos de demências (Huff et al. 1989) como por exemplo Demência de Corpos de Lewy (Maetzler et al. 2009), nem foram observadas diferenças na atividade da enzima *in vivo* entre DA e controlos, determinada com recurso a técnicas de imagem de PET, utilizando como marcador de hidrólise ^{11}C metil-4-piperidinil n-butirato, como substrato da BuChE, (Kuhl et al. 2006). No entanto, outros autores observaram aumento da atividade da enzima em DA, face a controlos, em exame *pos mortem*, utilizando tecido cerebral e com recurso ao método de *Karnovsky-Roots* (Macdonald et al. 2017). Enquanto outros observaram uma diminuição da atividade da

BuChE no LCR de doentes de DA face a controlos (Sirvio et al. 1989). Estes resultados aparentemente contraditórios continuam a justificar a investigação da atividade da BuChE na DA.

Da análise por género dos grupos de doentes, observámos que tanto para os doentes de DA como de DFT, não se registaram diferenças significativas no que respeita à atividade da BuChE entre os doentes do género masculino, comparativamente com os do género feminino. No entanto, para doentes de DA outros trabalhos apresentaram resultados de atividade da BuChE, no LCR, mais elevados em homens do que em mulheres (Maetzler et al. 2009).

Considerada a idade de início da DA e subdividindo os doentes em EOAD e LOAD, também não encontramos diferenças, nas médias de atividade da BuChE entre os dois subgrupos de doentes de DA.

Seguidamente, analisámos a influência que a presença ou ausência do alelo K da BuChE, tinha na atividade da enzima. Nos doentes com DA não encontramos diferenças estatisticamente significativas na média da atividade da butirilcolinesterase entre os portadores da variante K e os que não eram portadores dessa variante.

Estudos prévios, realizados em população sem demência, que evidenciavam prolongados períodos de apneia após tratamento com succinilcolina e que foram estudados para a caracterização genotípica da BuChE, mostraram que os portadores da variante K da BuChE, apresentavam uma redução de 20-50% da atividade periférica da enzima (Bartels et al. 1992). Relativamente à influência da variante K na atividade da enzima no LCR, dados existentes na literatura são escassos. Um estudo mostrou que a redução da atividade da BuChE no LCR não era tão robusta como a observada no sangue, uma vez que só era significativa em indivíduos homozigóticos para o alelo K da enzima (Darreh-Shori et al. 2012).

O facto de, no nosso trabalho, só possuímos amostras de LCR de dois doentes de DA homozigóticos para a variante K da BuChE, não nos permitiu avaliar esta associação.

De acordo com o nosso trabalho, um outro estudo reportou que a atividade no LCR da BuChE em doentes de DA não difere com a presença ou ausência da variante K da enzima (Johansson et al. 2013).

Importante referir que, no estudo acima mencionado e conduzido por Darreh-Shori e colaboradores (Darreh-Shori et al. 2012), a frequência alélica do alelo K foi mais alta do

que os nossos resultados (24% *versus* 18%), enquanto, no estudo conduzido por Johansson e colaboradores (Johansson et al. 2013) os resultados foram muito similares (14%), o que pode explicar algumas das diferenças observadas.

Curiosamente, entre os doentes com DFT, quando procedemos à análise das atividades da BuChE no LCR, observámos que os portadores da variante K da enzima, mostraram valores de atividade mais baixos (5,19 U/L) do que os que não eram portadores (7,56 U/L) ($p=0,026$), corroborando a diminuição de cerca de 30% verificada nos portadores da variante K, que foi reportada por Bartels et al. (Bartels et al. 1992). Uma análise de variância a dois fatores, considerando o diagnóstico e o genótipo da BuChE, mostrou uma interação significativa entre os dois fatores, uma vez que no grupo DA, a atividade da enzima não foi influenciada pela presença da variante K, ao contrário do grupo DFT, onde se observou uma diminuição significativa da atividade nos portadores da variante K.

De acordo com o genótipo da ApoE, também não encontramos nenhuma diferença na atividade da BuChE, entre os doentes de DA portadores do alelo $\epsilon 4$ e os que não eram portadores. Este resultado está de acordo com o reportado por outros autores envolvendo uma população mista de doentes de DA, outras demências e o grupo controlo (Johansson et al. 2013). Pelo contrário, Darreh-Shori e colaboradores (Darreh-Shori et al. 2006), observaram um decréscimo significativo da atividade da BuChE, em doentes de DA portadores do alelo $\epsilon 4$ da ApoE, sugerindo uma interação entre o genótipo da BuChE e da ApoE.

A discrepância destes resultados poderá ser explicada, para além das diferenças metodológicas, com o tamanho das amostras estudadas, que no primeiro estudo foi de 52 doentes, em que 22 eram doentes de DA, enquanto o segundo estudo englobou 80 doentes de DA.

Neste trabalho também avaliámos os níveis de A β 42, Tau e p-Tau, no LCR, que são bem estabelecidos biomarcadores para DA (Blennow et al. 2003; Baldeiras I et al. 2012; Baldeiras et al. 2015; Blennow et al. 2015). A comparação dos resultados de A β 42, Tau e p-Tau, no LCR, entre as duas formas de demência em estudo, evidenciaram diferenças estatisticamente significativas ($p<0,001$), compatíveis com os perfis destes biomarcadores previamente reportados para DA e DFT (Blennow et al. 2003; Baldeiras I et al. 2012; Baldeiras et al. 2015; Blennow et al. 2015), evidenciando a sua utilidade no diagnóstico diferencial destas demências. Assim, encontramos valores de t-Tau e p-Tau

significativamente mais elevados e de A β 42 significativamente mais baixos em doentes de DA, sendo este último diferenciador das duas formas de demências (Ewers et al. 2015), relacionando-se de forma inversa com as placas amiloide formadas.

Investigámos a influência da variante K da BuChE nos níveis dos biomarcadores do LCR, nomeadamente de A β 42, uma vez que, segundo alguns autores, esta variante tem menor capacidade em atenuar a formação de A β *in vitro* (Diamant et al. 2006; Podoly et al. 2009). Não foram encontradas diferenças nos níveis de A β 42, nem de t-Tau e p-Tau, entre os portadores da variante K da BuChE e os não portadores, quer nos doentes de DA, quer nos doentes de DFT.

Subdividimos os doentes de DA em função de serem ou não portadores do alelo ApoE ϵ 4, e comparando os níveis dos biomarcadores, não encontramos diferenças entre os dois subgrupos, com exceção dos doentes portadores do alelo ϵ 4, que apresentaram valores de p-Tau significativamente mais elevados, do que os que não possuíam esse alelo. A maioria dos estudos associam a presença do alelo ϵ 4 com diferenças em todos os biomarcadores, com diminuição de A β 42 e aumento de Tau e p-Tau, relativamente aos não portadores deste alelo em doentes de DA (Leoni 2011). Uma possível explicação para o facto de, no nosso trabalho, termos observado apenas diferenças significativas para a p-Tau, poderá dever-se ao tamanho da nossa amostra.

De seguida avaliámos a existência de uma possível correlação entre os valores da atividade da BuChE e os biomarcadores, subdividindo os doentes de DA em função de serem, ou não portadores de ApoE ϵ 4. No subgrupo de doentes que não possuíam esse alelo, não encontramos qualquer correlação entre a atividade da enzima com os níveis de A β 42, t-Tau e p-Tau. No entanto, em doentes de DA portadores do alelo ϵ 4 observámos uma correlação significativa, embora moderada, entre a atividade da BuChE e os níveis de A β 42, e fraca para os outros biomarcadores (Tau e p-Tau). De acordo com estes dados, Darreh-Shori e colaboradores, também observaram uma correlação entre aumento da atividade da BuChE e aumento dos níveis de A β 42 no LCR (Darreh-Shori et al. 2006) e decréscimo da retenção de *Pittsburgh Compound B* por Tomografia de Emissão de Positrões (PET-PIB) (Darreh-Shori et al. 2011).

A correlação fraca que observámos entre os níveis de t-Tau e p-Tau e a atividade da BuChE, no subgrupo dos doentes de DA portadores do alelo ApoE ϵ 4 não está de acordo com o que foi observado por Darreh-Shori e colaboradores, que encontraram uma correlação positiva entre a atividade da BuChE, no LCR, com a utilização cortical de

glicose, avaliada através de FDG-PET (Darreh-Shori et al. 2006; Darreh-Shori et al. 2011) e uma correlação negativa com os níveis de p-Tau (Darreh-Shori et al. 2011). Diferenças nas características da população de DA, nomeadamente no estadio da doença, podem explicar esta aparente discrepância, pois os doentes da população destes autores encontravam-se num estadio inicial da doença (valor médio de MMSE de 25,4), enquanto que os doentes que constituíram a amostra que foi por nós estudada se encontrava num estadio mais avançado da DA (valor médio de MMSE de 17,2).

Quando dividimos os doentes de DA em função da atividade da BuChE (acima ou abaixo da média) verificámos que os três marcadores apresentavam valores significativamente mais baixos no subgrupo com atividade da BuChE abaixo da média, e que essas diferenças só se mantiveram para a A β 42 e t-Tau nos doentes portadores do alelo ϵ 4 da ApoE. Este resultado, de um aumento dos níveis de A β 42, e consequentemente uma menor agregação de A β , em doentes de DA com valores da atividade da BuChE mais altos do que a média, apoia o papel desta enzima na prevenção da formação de agregados amilóide (Diamant et al. 2006) de forma dependente da ApoE.

De notar que esta associação entre os níveis de A β 42 e da atividade da BuChE foi específica para o grupo de DA, não se verificando no grupo de doentes de DFT. Pelo contrário, a associação dos níveis mais elevados de t-Tau e tendencialmente de p-Tau, com uma atividade da BuChE acima da média foi também encontrada nos doentes de DFT. Poderemos portanto especular que a atividade da BuChE poderá modular o processo neurodegenerativo/patologia neurofibrilar de forma inespecífica. Esta hipótese vem ao encontro dos resultados de um trabalho efetuado em doentes de esclerose múltipla, em que foi observada uma correlação entre a atividade da BuChE os níveis de C3 do sistema do Complemento e os níveis de Neurofilamentos no LCR, marcador de destruição axonal (Aeinehband et al. 2015).

Procurámos avaliar os possíveis efeitos que a presença da variante K da BuChE poderia ter no funcionamento cognitivo dos doentes de DA. Para tal partimos dos dados disponíveis de MMSE e comparámo-los entre os subgrupos dos doentes que não possuíam a variante K (NN) e os que a possuíam, independentemente de ser em homozigotia ou heterozigotia (NK+KK), não tendo encontrado diferenças nos valores deste indicador de funcionamento cognitivo global (MMSE).

Também a tentativa de correlação da atividade da BuChE com os dados de MMSE, revelaram a inexistência de qualquer correlação. De igual modo, a subdivisão dos doentes

em função da atividade ser acima, ou abaixo da média, não mostrou a existência de diferenças, nos valores de MMSE, entre estes dois conjuntos de doentes de DA. Estes resultados estão em desacordo com alguns trabalhos que mostraram uma correlação positiva entre a função cognitiva e a atividade da BuChE (Darreh-Shori et al. 2006; Darreh-Shori et al. 2011).

4.2 BUTIRILCOLINESTERASE NA CONVERSÃO DE DCL PARA DA

Neste estudo, em que foram incluídos 96 indivíduos com DCL, procurámos investigar a influência da variante K da BuChE na sua progressão para DA. A interação diferencial entre a BuChE-K, o genótipo ApoE, a atividade da BuChE no LCR e os biomarcadores do LCR (A β 42, t-Tau e p-Tau) nos doentes DCL que converteram para DA (DCL-DA) *versus* os que se mantiveram estáveis (DCL-Est) foi também avaliada.

Destes doentes, 8 tiveram um tempo de acompanhamento inferior a dois anos, pelo que, apesar de se manterem estáveis, não foram incluídos no grupo dos que não converteram. Dos 88 doentes de DCL que completaram o período longitudinal de avaliação clínica, 50 (56,8%) progrediram para DA durante um período médio de seguimento de 5,8 anos e 38 mantiveram-se estáveis (DCL-Est). Estes dados representam uma taxa de progressão de aproximadamente 10% ao ano, que está de acordo com o que tem sido reportado em trabalhos anteriores (Petersen et al. 1999; Tierney et al. 2000; Dubois et al. 2010).

122

As características demográficas e clínicas de base dos doentes com DCL que progrediram ou não para DA estão também em acordo com o reportado na literatura, mostrando que a idade e o alelo ApoE ϵ 4 são fortes fatores de risco para DA (Petersen et al. 1995; Fernandes et al. 1999; Baum et al. 2000). De facto, a idade de início da doença foi significativamente mais elevada no grupo dos doentes que progrediram para DA, assim como a percentagem de portadores de alelo ϵ 4 da ApoE, (54,0% *versus* 21,1%). De realçar o facto de os únicos três doentes que apresentavam homozigotia para o alelo ϵ 4, terem convertido para DA.

Embora esteja demonstrado que o género feminino apresenta uma maior suscetibilidade para DA (Podcasy et al. 2016), os nossos dados não mostraram nenhuma diferença na distribuição de géneros em função da progressão.

Também a baixa escolaridade é um conhecido fator de risco relacionado com o desenvolvimento da DA (Santana et al. 2016), que não foi particularmente evidenciado na nossa população.

Como expectável, as pontuações de base do MMSE eram significativamente mais baixas, no grupo de DCL-DA, corroborando o excelente desempenho deste instrumento na avaliação diagnóstica da DA (Santana et al. 2016).

A distribuição do genótipo da variante K da BuChE mostrou não existirem diferenças entre doentes DCL-DA e DCL-Est. Também não foram encontradas diferenças dentro de cada um dos dois subgrupos de doentes na distribuição desta variante por géneros. A percentagem dos portadores de variante K que encontramos no nosso estudo (38,5%) foi similar ao reportado noutros estudos em doentes com DCL (Lehmann et al. 1997; Lane et al. 2008; De Beaumont et al. 2016).

Tanto a frequência da variante K, como a distribuição do genótipo foram muito semelhantes às que previamente encontramos nos doentes de DA, DFT e controlos (ver secção 3.1.2), e também às descritas noutros coortes de DA e controlos (Wang et al. 2015). Isto confirma os nossos resultados prévios de que a variante K da BuChE, por si só, não confere risco para DA, e está de acordo com os resultados de Ferris e colaboradores (Ferris et al. 2009), que não mostraram diferenças significativas na progressão dos doentes com DCL, tratados com placebo, com diferentes genótipos da BuChE. Estudos mais recentes (De Beaumont et al. 2016) também não conseguiram demonstrar um efeito da variante K da BuChE na cognição ao longo do tempo, em doentes de DCL tratados com placebo.

Os nossos resultados mostraram uma associação entre a presença da variante K da BuChE e o alelo $\epsilon 4$ da ApoE na população total de DCL, sendo a variante K significativamente mais frequente em portadores do alelo $\epsilon 4$, do que nos não portadores (55,3% *versus* 27,6%). Um efeito de sinergia entre portadores de ApoE- $\epsilon 4$ e BuChE-K em doentes de DA, foi já reportada por alguns autores (Lehmann et al. 1997; Wiebusch et al. 1999). Quando analisámos separadamente os subgrupos DCL-DA e DCL-Est, verificámos que esta associação só se manteve no grupo de doentes com DCL que progrediram para DA, o que está de acordo com os resultados apresentados na secção 3.1.3, em que foi observada uma tendência para essa associação nos doentes de DA, mas não no grupo de doentes de DFT ou no grupo controlo.

Quando analisámos o efeito destas duas variantes genéticas na avaliação basal da função cognitiva, verificámos que os doentes com DCL portadores simultaneamente de BuChE-K e de ApoE- $\epsilon 4$, apresentaram uma pontuação significativamente mais baixa no teste cognitivo. Tal corrobora os resultados de Lane e colaboradores (Lane et al. 2008), onde

os doentes com DCL com ambos os alelos ApoE- ϵ 4 e BuChE-K tiveram maior deterioração cognitiva na base.

Verificámos também que a incidência de progressão de DCL para DA foi mais elevada nos portadores tanto da variante K da BuChE como do alelo ApoE- ϵ 4, atingindo um valor de 89%, muito mais elevado do que a taxa de progressão geral dentro de todo o grupo de DCL (56,8%). De facto, no nosso trabalho, o genótipo ApoE/BuChE foi identificado, juntamente com a idade, como um preditor de conversão de DCL para DA.

Também nas curvas de sobrevivência, de Kaplan-Meier, tendo em conta a associação dos genótipos da BuChE (NN) ou (NK+KK) e da presença ou ausência do alelo ApoE ϵ 4 se observaram diferenças estatisticamente significativas entre as curvas.

Assim, verificámos que o tempo médio de progressão para DA foi significativamente mais baixo em doentes portadores tanto da variante K da BuChE e do alelo ApoE- ϵ 4 (4,89 anos), quando comparado com os que eram portadores apenas da variante K (9,12 anos) e dos não portadores da variante K (NN) e do alelo ApoE- ϵ 4 (8,75 anos). Não se observaram, contudo, diferenças relativamente aos que eram portadores apenas do alelo ApoE- ϵ 4 (4,79 anos). Isto é consistente com os resultados de Beaumont e colegas (De Beaumont et al. 2016), indicando uma conversão cerca de 3 anos mais precoce nos doentes portadores em simultâneo do alelo ϵ 4 e da variante K.

Os nossos resultados estão também de acordo com o previamente reportado por Lane e colegas (Lane et al. 2008), mostrando uma tendência para a variante K incrementar o risco relativo de progressão para DA, só em doentes que sejam portadores de um alelo ApoE- ϵ 4. Também o estudo de Darreh-Shori (Darreh-Shori et al. 2012), aponta para um papel modulatório da ApoE- ϵ 4 no efeito da BuChE, com a variante BuChE-K a aumentar o risco para o desenvolvimento de DA na presença de ApoE- ϵ 4 e constituindo um fator protetor na sua ausência.

Os nossos resultados não mostraram diferenças na atividade basal da BuChE, em doentes com DCL-DA, comparados com os DCL-Est. Em geral, a média da atividade na população de DCL, por nós determinada, foi muito similar à anteriormente encontrada quer nos doentes de DA quer de DFT (ver secção 3.1.4) e também à reportada por outros autores em doentes de DA (De Beaumont et al. 2016).

Os nossos resultados mostraram uma tendência para o aumento na atividade da BuChE em homens relativamente a mulheres, considerando o total de doentes de DCL. Esta tendência manteve-se no subgrupo que progrediu para DA, mas que não se observou no

subgrupo que se manteve estável. Um aumento significativo da atividade da BuChE no género masculino foi observado por outros autores (Darreh-Shori et al. 2006). Contudo, apesar destes autores terem estudado 40 homens e 40 mulheres em estadio médio de DA, que é semelhante ao número total de doentes de DCL em que determinámos a atividade da BuChE no LCR, o facto dos nossos resultados só mostrarem essa tendência e não terem atingido a significância estatística poderá ser devido a que, quando analisámos os que converteram para DA, houve uma redução do número de casos estudados e que foi de 21 homens e 29 mulheres.

Tal como já tinha sido observado para os doentes de DA (ver secção 3.1.5), a atividade basal da BuChE no LCR, não foi influenciada pela presença do alelo $\epsilon 4$ da ApoE no total da população de DCL.

Relativamente ao efeito da presença da variante K da BuChE, tal como foi descrito para a DA (ver secção 3.1.5), não encontramos diferenças significativas na atividade da BuChE no grupo total de doentes DCL, nem no subgrupo DCL-DA. No entanto, à semelhança do que encontramos nos doentes de DFT (ver secção 3.1.5), observámos uma tendência para uma diminuição da atividade da BuChE nos portadores da variante K, no subgrupo de DCL-Est. Esta observação nos doentes de DCL deste subgrupo de uma redução da atividade da BuChE nos portadores da variante K em cerca de 30% (5,71U/L *versus* 7,44U/L) está de acordo com o reportado por Bartels e colaboradores (Bartels et al. 1992). Uma possível justificação para o facto de não termos observado diferenças na atividade da enzima no grupo de doentes de DCL que converteram para DA (DCL-DA), pode dever-se a uma possível interação da BuChE com os agregados amiloide que neste subgrupo se encontram aumentados relativamente aos DCL-Est, como proposto por Darreh-Shori e colaboradores (Darreh-Shori et al. 2011). De notar que os mesmos autores (Darreh-Shori et al. 2012) reportaram uma significativa redução da atividade da BuChE no LCR, tendo sido observada só em doentes de DA, homozigóticos para a variante K. Contudo, um outro estudo feito em doentes com DCL e com DA, reportou que a atividade da BuChE, no LCR, não difere entre os genótipos da variante K da BuChE (Johansson et al. 2013). No nosso estudo sómente 3 doentes do total de doentes de DCL é que eram homozigóticos para a variante K da BuChE (KK), o que não nos permitiu avaliar este efeito.

Não observámos uma influência significativa da presença do alelo ApoE- $\epsilon 4$ na atividade da BuChE no total de doentes de DCL, nem nos subgrupos DCL-DA e DCL-Est.

Também, como já descrito anteriormente nos doentes de DA, não foi observada qualquer influência do alelo ApoE- ϵ 4 na atividade da BuChE (ver secção 3.1.5.1). Relativamente aos dados da literatura não encontramos estudos a avaliar este efeito em doentes com DCL.

A determinação dos biomarcadores de DA no LCR, mostrou como seria de esperar valores significativamente mais baixos de A β 42 e altos de t-Tau e p-Tau, no grupo de doentes DCL-DA, de acordo com o previamente descrito por outros autores (Olsson et al. 2016; Herukka et al. 2017; Baldeiras et al. 2018), reforçando o valor preditivo destes biomarcadores na conversão de DCL para DA (Hampel et al. 2004; Hertze et al. 2010).

Tal como observámos para os doentes de DA (secção 3.1.5), não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de base de A β 42, t-Tau e p-Tau, entre os doentes de DCL portadores e não portadores da variante K da BuChE. Também Lane e colaboradores (Lane et al. 2008) não mostraram diferenças estatisticamente significativas nos níveis dos biomarcadores entre doentes de DCL com diferentes genótipos da BuChE. O efeito do alelo ϵ 4 da ApoE nos níveis dos três biomarcadores por nós encontrado nos doentes DCL, já foi previamente reportado por vários autores (Kester et al. 2011; Risacher et al. 2015), reforçando o papel da ApoE- ϵ 4 na deposição amiloide (Jack et al. 2010).

126

Uma análise de efeito a três fatores, em que se consideraram as variáveis conversão de DCL para DA e os genótipos da BuChE e da ApoE, revelou a existência de uma interação entre BuChE e ApoE ϵ 4 nos níveis de A β 42, com os doentes que possuem a variante K e o alelo ϵ 4 e que converteram para DA, a apresentarem valores mais baixos deste biomarcador. Este resultado, está em linha com uma eventual interação destes dois fatores genéticos, contribuindo para a agregação dos peptídeos amilóide, sugerindo um efeito preditivo de conversão de DCL para DA. Relativamente aos biomarcadores t-Tau e p-Tau e à atividade da BuChE, não encontramos nenhum efeito de interação entre as variáveis independentes.

Procurámos então correlacionar a atividade da BuChE com as outras variáveis em estudo e não encontramos correlação da atividade enzimática com a idade ou com os valores de MMSE, quer no grupo de doentes de DCL total, quer nos subgrupos dos que converteram ou não para DA.

Apenas encontramos uma correlação entre a atividade da BuChE e os níveis de t-Tau, quando considerámos o total de doentes de DCL. Esta correlação não se manteve contudo quando analisámos separadamente os subgrupos de DCL-DA e de DCL-Est. De referir

que a associação prévia que observámos entre o incremento dos níveis de A β 42, e portanto menos agregação de A β , e alta atividade da BuChE, nos doentes de DA (secção 3.1.5.1), não foi observada nos doentes com DCL. Este resultado parece sugerir que o efeito modulatório da BuChE varie durante o curso da doença, estando a alta atividade associada a menor agregação amiloide apenas em estadios mais tardios (Diamant et al. 2006).

4.3 ACETILCOLINESTERASE

Com o objetivo de avaliar o efeito da AChE nos 3 grupos patológicos fomos determinar a sua atividade no LCR de 202 doentes, em que 72 estavam diagnosticados com DA, 57 com DFT e 73 com DCL. As características demográficas deste subgrupo de doentes nomeadamente, idade, género, escolaridade e MMSE, estão de acordo com as descritas anteriormente para a população total de doentes.

4.3.1 Acetilcolinesterase na DA

Na comparação dos valores da atividade da Acetilcolinesterase, que foram determinadas no LCR de doentes de DA e DFT, não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos patológicos ($p=0,833$), de acordo com outros autores (Wallin et al. 2003).

128

No entanto foi descrito na literatura que em doentes com DA há uma marcada perda de atividade desta enzima mostrada em tecido cerebral (Geula et al. 1995; Cook et al. 2005), sendo também comprovado por estudos *pós mortem* em LCR colhido nos ventrículos laterais e região lombar (Appleyard et al. 1992), e também *in vivo* (Bizzarro et al. 2010) com recurso a marcação radioativa de análogos da acetilcolina, usados como substrato da AChE, embora a diminuição da sua atividade seja mais evidente numa fase precoce da doença, do que em estados mais tardios (Shinotoh 2007). Esta diminuição da atividade da enzima parece estar associada à sua agregação nas placas amiloides (Dinamarca et al. 2010), com consequentes efeitos neurotóxicos desses complexos. Também, vários têm sido os estudos que centraram a sua atenção na comparação da atividade da AChE no LCR de doentes de DA e de controlos, tendo observado diminuição da atividade da enzima no grupo de doentes de DA (Soininen et al. 1981; Johansson et al. 2013). Noutros tipos de demências, tais como a demência vascular, nomeadamente por multienfartes, também foi observada diminuição da atividade da AChE no LCR, face a controlos (Tune et al. 1985; Riekkinen et al. 1987).

Acresce que os resultados da atividade da AChE que foram por nós obtidos foram ligeiramente mais baixos ($13,08\pm 6,54$ U/L) nos doentes de DA, enquanto que outros

autores encontraram valores mais elevados ($16,4 \pm 3,4$ U/L) em doentes EOAD e em LOAD de ($19,7 \pm 2,8$ U/L) (Atack et al. 1988), embora os nossos resultados não sejam diferentes aos que foram observados por outros autores ($12,5 \pm 1,4$ U/L), quando não subdividem pela idade de início os doentes de DA estudados (Appleyard et al. 1992). Na comparação das médias da atividade da AChE, tendo em conta o género, não encontramos diferença, nos doentes de DA, entre os que eram do género masculino e o feminino.

Contudo, ao procedermos ao mesmo tipo de análise, dentro dos doentes com DFT, verificámos que os doentes do género feminino apresentavam uma atividade significativamente mais elevada, quando comparada com os valores da atividade enzimática da AChE obtida em homens. Não temos no entanto conhecimento de outros trabalhos que tenham avaliado a atividade desta enzima em doentes de DFT.

No presente estudo apenas observámos uma correlação da actividade da AChE no LCR de doentes com DA com a atividade da BuChE e com os níveis de p-Tau. Outros trabalhos também mostraram a existência de correlação entre a a atividade da AChE e os níveis de Tau e p-Tau (Johansson et al. 2013). Contudo, outros trabalhos não observaram correlação entre as atividades das duas colinesterases (Parnetti et al. 2011), facto que poderá ser devido à ação hidrolítica complementar das duas enzimas. Os nossos dados mostram alguma tendência para correlação da atividade da AChE com os valores de MMSE ($p=0,077$), sem atingir contudo significado estatístico, o que vai de encontro ao observado noutros estudos em que se verifica correlação da atividade da enzima no LCR com o declínio cognitivo observado em doentes de DA com formas severas relativamente a controlos (Sirvio et al. 1989). O conjunto de doentes de DA que constituíram a amostra do nosso estudo não estariam todos no mesmo estadio da doença o que pode corresponder a alguma diversidade dos resultados obtidos mas que, apesar disso, se aproximam da significância estatística.

Fomos ainda comparar as médias da atividade da AChE em função da idade de início da doença de Alzheimer, ser precoce (EOAD) ou tardia (LOAD) e não encontramos diferenças entre os dois grupos de doentes. No entanto outros autores encontraram uma diminuição da atividade da AChE em DA de início precoce (EOAD), mas não nas formas de início tardio (LOAD), quando comparados com controlos emparelhados por idade (Atack et al. 1988; Kumar et al. 1989). Embora este último estudo tenha sido limitado pelo baixo tamanho da amostra (52 doentes de DA e 20 controlos) que poderá ter limitado a inferência estatística.

Na comparação das médias da atividade da AChE, efetuada em doentes de DA, subdividindo-os de acordo com serem ou não portadores do alelo $\epsilon 4$ da ApoE, verificámos uma tendência de menor atividade dos que não eram portadores do referido alelo, relativamente aos que eram seus portadores, sem contudo termos conseguido atingir significado estatístico ($p=0,055$). Também um estudo com recurso a técnicas de imagem por PET, verificou que a atividade cortical da AChE era mais reduzida em doentes de DA que não eram portadores do alelo ApoE $\epsilon 4$, relativamente aos que eram portadores desse alelo (Eggers et al. 2006). Os nossos dados também encontram apoio em dados na literatura, em que foi descrito um aumento significativo na atividade da AChE no LCR, em doentes que eram portadores do alelo $\epsilon 4$ da ApoE, diferenças que não eram observadas em doentes que não possuíam esse alelo (Soininen et al. 1995).

De referir que, nos doentes de DFT, observámos apenas uma correlação da atividade da AChE com a idade dos doentes e com a atividade da BuChE, não tendo sido observada qualquer correlação com os níveis de biomarcadores ($A\beta 42$, t-Tau e p-Tau), ao contrário dos doentes com DA em que encontrámos uma correlação da atividade com a forma fosforilada da Tau (p-Tau).

130

Efetuámos o estudo da distribuição do polimorfismo rs2571598 da AChE nos doentes de DA, que consiste na substituição de uma Citosina por uma Timina (C/T) no intrão 3, e observámos 36% dos doentes de DA heterozigóticos e 18% homozigóticos. Esta frequência encontrada é ligeiramente mais elevada do que a reportada em bases de dados que apontam para uma frequência de portadores a nível da população europeia de 49% (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2571598>), quando o que encontrámos foi um total de 54%. Também num estudo que envolveu doentes de DA e controlos não foram encontradas diferenças na distribuição do polimorfismo rs 2571598 da AChE entre doentes e controlos com 47% de heterozigóticos (C/T) e 17% de homozigóticos (T/T) nos doentes de DA, enquanto que no grupo controlo esses valores foram de 41% e 17%, respetivamente.

Scacchi e colaboradores, com o intuito de procurar identificar fatores genéticos associados ao desenvolvimento de LOAD, estudaram este polimorfismo em 383 doentes e 209 controlos, do norte de Itália, mas não encontraram diferenças na distribuição deste polimorfismo entre os dois grupos (Scacchi et al. 2009).

Nos nossos resultados não encontrámos diferenças na distribuição deste polimorfismo entre os géneros masculino e feminino.

Na distribuição do polimorfismo rs 2571598 da AChE nos doentes de DA em função da idade (EOAD *versus* LOAD), não encontramos diferenças na distribuição deste polimorfismo entre os dois subgrupos de doentes de DA.

Dada a relevância que o alelo ApoE ϵ 4 tem no desenvolvimento da DA, procurámos estudar a distribuição do polimorfismo rs 2571598 da AChE, entre o grupo de doentes de DA que eram portadores, ou não portadores, do referido alelo da apolipoproteína, não tendo encontrado diferenças na distribuição do polimorfismo da enzima.

Procurámos avaliar eventuais efeitos que o polimorfismo rs 2571598 da AChE poderia ter nos valores do MMSE, como indicador global de cognição, não tendo encontrado resultados que mostrem a existência de diferenças, nos valores deste indicador, entre os doentes que são portadores do referido polimorfismo, comparativamente com os que não são portadores.

Analisámos então se a presença do polimorfismo rs 2571598 da AChE tinha influência na atividade dessa enzima, e observámos uma tendência para o aumento da atividade da enzima no LCR, entre os doentes de DA portadores do polimorfismo ($p=0,056$), sugerindo que a presença deste polimorfismo tem um efeito modulatório na atividade da enzima. No entanto, o baixo número de casos disponíveis com a informação do polimorfismo e da atividade da enzima (23 não portadores *versus* 27 portadores) podem ter condicionado o poder desta análise. De notar que na literatura apenas está reportado o efeito deste polimorfismo na atividade da AChE no soro de doentes com Esclerose Múltipla, em que foi observada uma diminuição da atividade nos portadores (Reale et al. 2018) e em doentes de DA uma melhor resposta ao tratamento com rivastigmina (Scacchi et al. 2009).

Também nos níveis de biomarcadores A β 42, t-Tau e p-Tau no LCR, não encontramos diferenças entre os doentes que eram portadores do polimorfismo rs 2571598 (C/T+T/T), comparativamente aos que não eram portadores (C/C).

4.3.2 Acetilcolinesterase na conversão de DCL para DA

O declínio da atividade da acetilcolinesterase em LCR, pelo seu papel na modulação do sistema colinérgico, tem sido apontada como um potencial marcador no aparecimento da

doença de Alzheimer, (Appleyard et al. 1983; Arendt et al. 1984). A diminuição da atividade da acetilcolinesterase observada em doentes de DA relativamente a controlos (Nakano et al. 1986), podendo ser um indicador da progressão para DA em doentes de DCL (Herholz et al. 2005) com a disfunção colinérgica como marcador precoce da evolução destes doentes (Haense et al. 2010). No sentido de investigar se existia uma diminuição da atividade desta enzima em doentes de DCL que converteram para DA (DCL-DA), fomos comparar as médias de atividade da AChE determinadas no LCR, com as que foram determinadas no grupo de doentes que não converteram (DCL-Est), não tendo encontrado diferenças entre os dois subgrupos de doentes.

Tal como já havíamos verificado nos doentes de DA, também não encontramos diferenças nas médias de atividade da AChE, entre homens e mulheres, tanto no grupo dos doentes de DCL-DA, como nos que se mantiveram estáveis DCL-Est.

Tendo os portadores do alelo $\epsilon 4$ da ApoE maior risco de conversão de DCL para DA (Fei et al. 2012), também foi associado maior défice colinérgico em doentes de DA portadores deste alelo (Poirier et al. 1995), nomeadamente com aumento da atividade da AChE, relativamente aos não portadores (Eggers et al. 2006). Contudo, nos nossos resultados ao procedermos à análise da atividade desta enzima, nos doentes que eram portadores do alelo ApoE $\epsilon 4$, comparados com a dos que não eram portadores, não encontramos diferenças que corroborem os resultados daqueles autores.

Por último, procedemos ao estudo de correlações entre a atividade da AChE, com a da BuChE, com os biomarcadores (A β 42, t-Tau e p-Tau) e MMSE, dentro de cada subgrupo de doentes de DCL (DCL-DA e DCL-Est).

Em ambos os grupos de doentes DCL-Est e DCL-DA foram observadas correlações da atividade da AChE com a atividade da BuChE. No entanto, no grupo de DCL-Est foram observadas ainda correlações entre a atividade da AChE e os biomarcadores t-Tau e p-Tau, ao contrário do grupo DCL-DA onde não foi encontrada qualquer outra correlação.

Há que realçar que em todos os grupos de doentes que foram por nós estudados foram encontradas correlações entre a atividade da AChE e a atividade da BuChE no LCR, como já previamente reportado em doentes de DA (Ruberg et al. 1987), sugerindo que a síntese e regulação de ambas as enzimas estão relacionadas.

5. – Conclusões

5.1 CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Face aos resultados obtidos ao longo deste trabalho, podemos identificar algumas conclusões gerais.

Não encontramos diferenças na distribuição do polimorfismo da variante K em nenhum dos grupos estudados, o que nos permite concluir que a variante K da BuChE, por si só, não confere risco para a DA na nossa população, nem para a conversão de DCL para DA. Contudo, os nossos dados sugerem uma associação entre a variante K da BuChE e a presença do alelo $\epsilon 4$ da ApoE na DA. Este efeito de sinergia contribuiu também para um aumento da incidência e redução do tempo de progressão de DCL para DA. Assim, a determinação dos dois genótipos poderá ser importante na avaliação de risco de progressão para DA em doentes com DCL, assim como na investigação futura de possíveis terapias modificadoras da doença.

Quanto à actividade da BuChE no LCR, esta não estava alterada nos doentes de DA e DCL que convertem para DA, relativamente ao grupo com DFT e DCL-Est. Também observámos que a presença da variante K não influencia a actividade da enzima nestes dois primeiros grupos de doentes, ao contrário do observado para os grupos de DFT e DCL-Est, em que a presença da variante leva a uma redução da actividade enzimática. A possível interacção da BuChE com os agregados amilóide presentes nos doentes DA e DCL-DA, poderá explicar o facto de não se ter observado esta redução da actividade, previamente reportada em estudos *in vitro*.

Nos doentes DA observámos que a presença de níveis mais baixos de A β 42 no LCR, e consequentemente de uma maior quantidade de agregados, estava associada a uma menor actividade da BuChE, enfatizando a possível interacção entre as duas proteínas.

Relativamente à acetilcolinesterase, a actividade da enzima no LCR também não estava alterada nos doentes de DA e DCL que converteram para DA, relativamente ao grupo com DFT e DCL-Est. De notar, que foi observada, em todos os grupos uma correlação das actividades da BuChE e da AChE, sugestiva de semelhanças nos mecanismos de síntese e regulação das duas enzimas.

Neste momento, e tendo em conta a parte experimental, podemos também identificar algumas das limitações inerentes ao desenvolvimento desta tese, bem como delinear perspectivas futuras de forma a prosseguir o estudo do papel das colinesterases na DA.

Assim, uma das principais fragilidades foi a não inclusão de amostras de LCR de controlos neurológicos, de forma a poder comparar a actividade da AChE e BuChE nos grupos com patologia. Uma vez que estas amostras são de muito difícil acesso, não foi exequível durante o desenvolvimento da parte experimental deste trabalho reunir um número suficiente de casos. Contudo, no futuro será possível colmatar esta limitação.

Dada a frequência dos polimorfismos estudados nesta população, parece-nos também que o tamanho da amostra relativamente a cada grupo deverá ser aumentado de forma a ter uma maior representatividade dos diferentes subgrupos e a análise ter maior poder estatístico.

No que respeita ao estudo da AChE no presente trabalho, este foi limitado à determinação da actividade deste enzima nos diferentes grupos de doentes e à distribuição do polimorfismo apenas nos doentes com DA. Assim, não foi possível tirar elações do papel que este terá na actividade da AchE nem da sua associação com a patologia DA. Será portanto essencial alargar o estudo do polimorfismo aos outros grupos de estudo.

Por último, tendo em conta alguns trabalhos que sugerem uma modulação da resposta à terapêutica com inibidores da colinesterases, pela presença de determinados polimorfismos (Scacchi et al. 2009; Patterson et al. 2011), pretendemos no futuro investigar na nossa população de DA, o possível efeito que a presença da variante K da BuChE e do rs2571598 da AChE poderão ter no declínio cognitivo de doentes submetidos a terapêutica anti-colinérgica.

6. – Referências

- Abbasi, S. W., S. Kulsoom, et al. (2012). "In silico pharmacophore model generation for the identification of novel butyrylcholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease." Medicinal Chemistry Research **21**(9): 2716-2722.
- Abreu-Villaca, Y., C. C. Filgueiras, et al. (2010). "Developmental aspects of the cholinergic system." Behavioural Brain Research.
- Aeinehband, S., R. P. Lindblom, et al. (2015). "Complement component C3 and butyrylcholinesterase activity are associated with neurodegeneration and clinical disability in multiple sclerosis." Plos One **10**(4): e0122048.
- Akiyama, H., S. Barger, et al. (2000). "Inflammation and Alzheimer's disease." Neurobiology of Aging **21**(3): 383-421.
- Albert, M. S., S. T. DeKosky, 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**(3): 270-279.
- Albuquerque, E. X., E. F. R. Pereira, et al. (2009). "Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function." Physiological Reviews **89**(1): 73-120.
- Alladi, S., J. Xuereb, et al. (2007). "Focal cortical presentations of Alzheimer's disease." Brain **130**(Pt 10): 2636-2645.
- Allain, H., D. Bentue-Ferrer, et al. (2003). "Alzheimer's disease: the pharmacological pathway." Fundamental & Clinical Pharmacology **17**(4): 419-428.
- Alonso, A. D., T. Zaidi, et al. (2001). "Interaction of tau isoforms with Alzheimer's disease abnormally hyperphosphorylated tau and in vitro phosphorylation into the disease-like protein." Journal of Biological Chemistry **276**(41): 37967-37973.
- Alvarez-Arcaya, A., O. Combarros, et al. (2000). "The butyrylcholinesterase K variant is a protective factor for sporadic Alzheimer's disease in women." Acta Neurologica Scandinavica **102**(6): 350-353.
- Alzheimer, A., R. A. Stelzmann, et al. (1995). "An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Uber eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde"." Clin Anat **8**(6): 429-431.
- Amanatkar, H. R., B. Papagiannopoulos, et al. (2017). "Analysis of recent failures of disease modifying therapies in Alzheimer's disease suggesting a new methodology for future studies." Expert Review of Neurotherapeutics **17**(1): 7-16.
- Amenta, F., L. Parnetti, et al. (2001). "Treatment of cognitive dysfunction associated with Alzheimer's disease with cholinergic precursors. Ineffective treatments or inappropriate approaches?" Mechanisms of Ageing and Development **122**(16): 2025-2040.
- American Psychiatric Association. and American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV. (1994). Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-IV. Washington, DC, American Psychiatric Association.
- American Psychiatric Association (1994). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Washington, DC, American Psychiatric Association.
- Ampuero, I., R. Ros, et al. (2008). "Risk factors for dementia of Alzheimer type and aging-associated cognitive decline in a Spanish population based sample, and in brains with

- pathology confirmed Alzheimer's disease." Journal of Alzheimers Disease **14**(2): 179-191.
- Amuah, J. E., D. B. Hogan, et al. (2010). "Persistence with cholinesterase inhibitor therapy in a population based cohort of patients with Alzheimer's disease." Pharmacoepidemiology and Drug Safety **19**(7): 670-679.
- Anand, R., K. D. Gill, et al. (2014). "Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future." Neuropharmacology **76 Pt A**: 27-50.
- Annaert, W. and B. De Strooper (2002). "A cell biological perspective on Alzheimer's disease." Annu Rev Cell Dev Biol **18**: 25-51.
- Appleyard, M. E. and B. McDonald (1992). "Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in cerebrospinal fluid from different levels of the neuraxis of patients with dementia of the Alzheimer type." J Neurol Neurosurg Psychiatry **55**(11): 1074-1078.
- Appleyard, M. E., A. D. Smith, et al. (1987). "Cholinesterase activities in cerebrospinal fluid of patients with senile dementia of Alzheimer type." Brain **110 (Pt 5)**: 1309-1322.
- Appleyard, M. E., A. D. Smith, et al. (1983). "Decreased CSF acetylcholinesterase activity in Alzheimer's disease." Lancet **2**(8347): 452.
- Arendt, T., V. Bigl, et al. (1984). "Decreased ratio of CSF acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase activity in Alzheimer's disease." Lancet **1**(8369): 173.
- Arendt, T., J. T. Stieler, et al. (2016). "Tau and tauopathies." Brain Res Bull **126**(Pt 3): 238-292.
- Assoc, A. (2015). "Alzheimer's Association Report 2015 Alzheimer's disease facts and figures." Alzheimers & Dementia **11**(3): 332-384.
- Atack, J. R., C. May, et al. (1988). "Cerebrospinal fluid cholinesterases in aging and in dementia of the Alzheimer type." Ann Neurol **23**(2): 161-167.
- Atack, J. R., E. K. Perry, et al. (1985). "Blood acetyl- and butyrylcholinesterases in senile dementia of Alzheimer type." Journal of the Neurological Sciences **70**(1): 1-12.
- Atagi, Y., C. C. Liu, et al. (2015). "Apolipoprotein E Is a Ligand for Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 (TREM2)." Journal of Biological Chemistry **290**(43): 26043-26050.
- Au, B., S. Dale-McGrath, et al. (2016). "Sex Differences in the Prevalence and Incidence of Mild Cognitive Impairment: A Meta-Analysis." Ageing Res Rev.
- Avila, J., J. J. Lucas, et al. (2004). "Role of tau protein in both physiological and pathological conditions." Physiological Reviews **84**(2): 361-384.
- Balasa, M., E. Gelpi, et al. (2015). "Diagnostic accuracy of behavioral variant frontotemporal dementia consortium criteria (FTDC) in a clinicopathological cohort." Neuropathology and Applied Neurobiology **41**(7): 882-892.
- Balasubramanian, A. S. and C. D. Bhanumathy (1993). "Noncholinergic functions of cholinesterases." FASEB J **7**(14): 1354-1358.
- Baldeiras I, Santana I, et al. (2012). "CSF biomarkers for the early diagnosis of Alzheimer's disease in a routine clinical setting – the first Portuguese study." Sinapse **2**(12): 14-22.
- Baldeiras, I., I. Santana, et al. (2018). "Addition of the Abeta42/40 ratio to the cerebrospinal fluid biomarker profile increases the predictive value for underlying Alzheimer's disease dementia in mild cognitive impairment." Alzheimers Res Ther **10**(1): 33.
- Baldeiras, I., I. Santana, et al. (2015). "Cerebrospinal fluid Abeta40 is similarly reduced in patients with Frontotemporal Lobar Degeneration and Alzheimer's Disease." Journal of the Neurological Sciences **358**(1-2): 308-316.
- Baldeiras, I. E., M. H. Ribeiro, et al. (2009). "Diagnostic value of CSF protein profile in a Portuguese population of sCJD patients." J Neurol **256**(9): 1540-1550.
- Ballard, C., S. Gauthier, et al. (2011). "Alzheimer's disease." Lancet **377**(9770): 1019-1031.
- Ballard, C., S. Gauthier, et al. (2011). "Alzheimer's disease." Lancet **377**(9770): 1019-1031.
- Ballard, C., W. Mobley, et al. (2016). "Dementia in Down's syndrome." Lancet Neurol **15**(6): 622-636.
- Bamburg, J. R. and G. S. Bloom (2009). "Cytoskeletal pathologies of Alzheimer disease." Cell Motil Cytoskeleton **66**(8): 635-649.

- Bandeira, M. L., A. B. Azevedo, et al. (2014). Dinâmicas demográficas e envelhecimento da população portuguesa (1950-2011): evolução e perspectivas, Fundação Francisco Manuel dos Santos.
- Barnes, D. E., K. Yaffe, et al. (2012). "Midlife vs late-life depressive symptoms and risk of dementia: differential effects for Alzheimer disease and vascular dementia." Arch Gen Psychiatry **69**(5): 493-498.
- Barnes, L. L., R. S. Wilson, et al. (2005). "Sex differences in the clinical manifestations of Alzheimer disease pathology." Arch Gen Psychiatry **62**(6): 685-691.
- Barrios, H., S. Narciso, et al. (2012). "Quality of life in patients with mild cognitive impairment." Aging Ment Health.
- Bartels, C. F., F. S. Jensen, et al. (1992). "DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites." Am J Hum Genet **50**(5): 1086-1103.
- Bartus, R. T. (1979). "Physostigmine and recent memory: effects in young and aged nonhuman primates." Science **206**(4422): 1087-1089.
- Bartus, R. T. (2000). "On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis." Exp Neurol **163**(2): 495-529.
- Bartus, R. T., R. L. Dean, 3rd, et al. (1982). "The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction." Science **217**(4558): 408-414.
- Bateman, R. J., C. Xiong, et al. (2012). "Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease." N Engl J Med **367**(9): 795-804.
- Baum, L., L. Chen, et al. (2000). "Apolipoprotein E isoforms in Alzheimer's disease pathology and etiology." Microsc Res Tech **50**(4): 278-281.
- Beach, T. G., S. E. Monsell, et al. (2012). "Accuracy of the clinical diagnosis of Alzheimer disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 2005-2010." J Neuropathol Exp Neurol **71**(4): 266-273.
- Bekris, L. M., C. E. Yu, et al. (2010). "Genetics of Alzheimer disease." J Geriatr Psychiatry Neurol **23**(4): 213-227.
- Bennett, C. E., D. De Boos, et al. (2018). "Developing a tool to support diagnostic delivery of dementia." Dementia (London): 1471301217750936.
- Benson, D. F., R. J. Davis, et al. (1988). "Posterior cortical atrophy." Arch Neurol **45**(7): 789-793.
- Binder, L. I., A. Frankfurter, et al. (1985). "The distribution of tau in the mammalian central nervous system." J Cell Biol **101**(4): 1371-1378.
- Birks, J. S., L. Y. Chong, et al. (2015). "Rivastigmine for Alzheimer's disease." Cochrane Database of Systematic Reviews(9).
- Bizzarro, A., V. Guglielmi, et al. (2010). "BuChE K variant is decreased in Alzheimer's disease not in fronto-temporal dementia." J Neural Transm (Vienna) **117**(3): 377-383.
- Bjerke, M., H. Zetterberg, et al. (2011). "Cerebrospinal fluid matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in combination with subcortical and cortical biomarkers in vascular dementia and Alzheimer's disease." Journal of Alzheimers Disease **27**(3): 665-676.
- Blennow, K., B. Dubois, et al. (2015). "Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease." Alzheimers & Dementia **11**(1): 58-69.
- Blennow, K. and H. Hampel (2003). "CSF markers for incipient Alzheimer's disease." Lancet Neurology **2**(10): 605-613.
- Blennow, K., N. Mattsson, et al. (2015). "Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease." Trends in Pharmacological Sciences **36**(5): 297-309.
- Boeve, B. F. (2007). "Links between frontotemporal lobar degeneration, corticobasal degeneration, progressive supranuclear palsy, and amyotrophic lateral sclerosis." Alzheimer Dis Assoc Disord **21**(4): S31-38.
- Bolognesi, M. L., R. Matera, et al. (2009). "Alzheimer's disease: new approaches to drug discovery." Current Opinion in Chemical Biology **13**(3): 303-308.

- Bono, G. F., D. P. Simao-Silva, et al. (2015). "Butyrylcholinesterase: K variant, plasma activity, molecular forms and rivastigmine treatment in Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population." *Neurochemistry International* **81**: 57-62.
- Borchelt, D. R., G. Thinakaran, et al. (1996). "Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo." *Neuron* **17**(5): 1005-1013.
- Borroni, B., A. Alberici, et al. (2008). "Education plays a different role in Frontotemporal Dementia and Alzheimer's disease." *Int J Geriatr Psychiatry* **23**(8): 796-800.
- Boutajangout, A., J. Ingadottir, et al. (2011). "Passive immunization targeting pathological phospho-tau protein in a mouse model reduces functional decline and clears tau aggregates from the brain." *Journal of Neurochemistry* **118**(4): 658-667.
- Bowen, D. M., C. B. Smith, et al. (1976). "Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies." *Brain* **99**(3): 459-496.
- Bowen, J., L. Teri, et al. (1997). "Progression to dementia in patients with isolated memory loss." *Lancet* **349**(9054): 763-765.
- Boyles, J. K., R. E. Pitas, et al. (1985). "Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system." *J Clin Invest* **76**(4): 1501-1513.
- Braak, E., H. Braak, et al. (1994). "A Sequence of Cytoskeleton Changes Related to the Formation of Neurofibrillary Tangles and Neuropil Threads." *Acta Neuropathologica* **87**(6): 554-567.
- Braak, H., I. Alafuzoff, et al. (2006). "Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry." *Acta Neuropathologica* **112**(4): 389-404.
- Braak, H. and E. Braak (1990). "Neurofibrillary Changes Confined to the Entorhinal Region and an Abundance of Cortical Amyloid in Cases of Presenile and Senile Dementia." *Acta Neuropathologica* **80**(5): 479-486.
- Braak, H. and E. Braak (1996). "Development of Alzheimer-related neurofibrillary changes in the neocortex inversely recapitulates cortical myelogenesis." *Acta Neuropathologica* **92**(2): 197-201.
- Braak, H., D. R. Thal, et al. (2011). "Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years." *J Neuropathol Exp Neurol* **70**(11): 960-969.
- Brookmeyer, R., D. A. Evans, et al. (2011). "National estimates of the prevalence of Alzheimer's disease in the United States." *Alzheimers & Dementia* **7**(1): 61-73.
- Brouwers, N., K. Sleegers, et al. (2008). "Molecular genetics of Alzheimer's disease: an update." *Ann Med* **40**(8): 562-583.
- Buchhave, P., L. Minthon, et al. (2012). "Cerebrospinal fluid levels of beta-amyloid 1-42, but not of tau, are fully changed already 5 to 10 years before the onset of Alzheimer dementia." *Arch Gen Psychiatry* **69**(1): 98-106.
- Buckingham, S. D., A. K. Jones, et al. (2009). "Nicotinic acetylcholine receptor signalling: roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection." *Pharmacol Rev* **61**(1): 39-61.
- Bullock, R., J. Touchon, et al. (2005). "Rivastigmine and donepezil treatment in moderate to moderately-severe Alzheimer's disease over a 2-year period." *Current Medical Research and Opinion* **21**(8): 1317-1327.
- Burke, K. A., E. A. Yates, et al. (2013). "Biophysical insights into how surfaces, including lipid membranes, modulate protein aggregation related to neurodegeneration." *Front Neurol* **4**: 17.
- Caccamo, A., S. Oddo, et al. (2006). "M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice." *Neuron* **49**(5): 671-682.
- Caceres, A. and K. S. Kosik (1990). "Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons." *Nature* **343**(6257): 461-463.
- Caminiti, S. P., N. Canessa, et al. (2015). "Affective mentalizing and brain activity at rest in the behavioral variant of frontotemporal dementia." *Neuroimage Clin* **9**: 484-497.

- Campanari, M. L., M. S. Garcia-Ayllon, et al. (2014). "Acetylcholinesterase protein level is preserved in the Alzheimer's brain." Journal of Molecular Neuroscience **53**(3): 446-453.
- Campion, D., A. Brice, et al. (1996). "A novel presenilin 1 mutation resulting in familial Alzheimer's disease with an onset age of 29 years." Neuroreport **7**(10): 1582-1584.
- Campoy, F. J., C. J. Vidal, et al. (2016). "Cholinergic system and cell proliferation." Chemico-Biological Interactions **259**: 257-265.
- Capell, A., H. Steiner, et al. (2000). "Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase." Journal of Biological Chemistry **275**(40): 30849-30854.
- Castro-Caldas, A. and A. Mendonça (2005). A Doença de Alzheimer e outras Demências em Portugal. Lousã (Portugal), LIDEL.
- Cataldo, J. K., J. J. Prochaska, et al. (2010). "Cigarette smoking is a risk factor for Alzheimer's Disease: an analysis controlling for tobacco industry affiliation." Journal of Alzheimers Disease **19**(2): 465-480.
- Cavallucci, V., M. D'Amelio, et al. (2012). "Abeta toxicity in Alzheimer's disease." Mol Neurobiol **45**(2): 366-378.
- Cerejeira, J., V. Nogueira, et al. (2012). "The cholinergic system and inflammation: common pathways in delirium pathophysiology." J Am Geriatr Soc **60**(4): 669-675.
- Chai, C. K. (2007). "The genetics of Alzheimer's disease." Am J Alzheimers Dis Other Dement **22**(1): 37-41.
- Chai, X., S. Wu, et al. (2011). "Passive immunization with anti-Tau antibodies in two transgenic models: reduction of Tau pathology and delay of disease progression." Journal of Biological Chemistry **286**(39): 34457-34467.
- Chalmers, K. A., G. K. Wilcock, et al. (2009). "Cholinesterase inhibitors may increase phosphorylated tau in Alzheimer's disease." J Neurol **256**(5): 717-720.
- Chen, V. P., W. K. Luk, et al. (2011). "Molecular Assembly and Biosynthesis of Acetylcholinesterase in Brain and Muscle: the Roles of t-peptide, FHB Domain, and N-linked Glycosylation." Front Mol Neurosci **4**: 36.
- Cherbuin, N., S. Kim, et al. (2015). "Dementia risk estimates associated with measures of depression: a systematic review and meta-analysis." BMJ Open **5**(12): e008853.
- Clos, J., S. Ghandour, et al. (1989). "The cholinergic system in developing cerebellum: comparative study of normal, hypothyroid and underfed rats." Dev Neurosci **11**(3): 188-204.
- Cohen, E., J. Bieschke, et al. (2006). "Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity." Science **313**(5793): 1604-1610.
- Contestabile, A. (2011). "The history of the cholinergic hypothesis." Behavioural Brain Research **221**(2): 334-340.
- Cook, L. J., L. W. Ho, et al. (2005). "Candidate gene association studies of genes involved in neuronal cholinergic transmission in Alzheimer's disease suggests choline acetyltransferase as a candidate deserving further study." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **132B**(1): 5-8.
- Corbo, R. M. and R. Scacchi (1999). "Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele?" Ann Hum Genet **63**(Pt 4): 301-310.
- Corbyn, Z. (2013). "New set of Alzheimer's trials focus on prevention." Lancet **381**(9867): 614-615.
- Corder, E. H., L. Lannfelt, et al. (1998). "The role of APOE polymorphisms in late-onset dementias." Cellular and Molecular Life Sciences **54**(9): 928-934.
- Corder, E. H., A. M. Saunders, et al. (1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families." Science **261**(5123): 921-923.
- Cornutiu, G. (2015). "The Epidemiological Scale of Alzheimer's Disease." J Clin Med Res **7**(9): 657-666.
- Crook, R., J. Hardy, et al. (1994). "Single-Day Apolipoprotein-E Genotyping." Journal of Neuroscience Methods **53**(2): 125-127.

- Cruts, M., J. Theuns, et al. (2012). "Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases." Human Mutation **33**(9): 1340-1344.
- Cummings, J. (2012). "Alzheimer's disease diagnostic criteria: practical applications." Alzheimers Res Ther **4**(5): 35.
- Cummings, J., G. Lee, et al. (2017). "Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017." Alzheimers Dement (N Y) **3**(3): 367-384.
- Czyzewski, K., A. Pfeffer, et al. (1998). "[Apolipoprotein E function in the nervous system]." Neurol Neurochir Pol **32**(1): 125-132.
- d'Abramo, C., C. M. Acker, et al. (2013). "Tau passive immunotherapy in mutant P301L mice: antibody affinity versus specificity." Plos One **8**(4): e62402.
- Dani, J. A. and D. Bertrand (2007). "Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system." Annual Review of Pharmacology and Toxicology **47**: 699-729.
- Dani, S. U., J. E. Pittella, et al. (1997). "Progressive formation of neuritic plaques and neurofibrillary tangles is exponentially related to age and neuronal size. A morphometric study of three geographically distinct series of aging people." Dement Geriatr Cogn Disord **8**(4): 217-227.
- Darreh-Shori, T., S. Brimijoin, et al. (2006). "Differential CSF butyrylcholinesterase levels in Alzheimer's disease patients with the ApoE epsilon 4 allele, in relation to cognitive function and cerebral glucose metabolism." Neurobiology of Disease **24**(2): 326-333.
- Darreh-Shori, T., A. Forsberg, et al. (2011). "Differential levels of apolipoprotein E and butyrylcholinesterase show strong association with pathological signs of Alzheimer's disease in the brain in vivo." Neurobiology of Aging **32**(12).
- Darreh-Shori, T., N. Modiri, et al. (2011). "The apolipoprotein E epsilon4 allele plays pathological roles in AD through high protein expression and interaction with butyrylcholinesterase." Neurobiology of Aging **32**(7): 1236-1248.
- Darreh-Shori, T., M. Siawesh, et al. (2012). "Apolipoprotein epsilon 4 Modulates Phenotype of Butyrylcholinesterase in CSF of Patients with Alzheimer's Disease." Journal of Alzheimers Disease **28**(2): 443-458.
- Darreh-Shori, T. and H. Soininen (2010). "Effects of Cholinesterase Inhibitors on the Activities and Protein Levels of Cholinesterases in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Alzheimer's Disease: A Review of Recent Clinical Studies." Current Alzheimer Research **7**(1): 67-73.
- Datta, P. K., A. Banerjee, et al. (1988). "Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7), a neurotransmitter enzyme in scorpion hemolymph." Biochemical Pharmacology **37**(5): 963-966.
- Davies, P. and A. J. Maloney (1976). "Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease." Lancet **2**(8000): 1403.
- Davies, P., J. Resnick, et al. (1998). "Consensus report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". " Neurobiology of Aging **19**(2): 109-116.
- Davis, A. A., J. J. Fritz, et al. (2010). "Deletion of M1 muscarinic acetylcholine receptors increases amyloid pathology in vitro and in vivo." Journal of Neuroscience **30**(12): 4190-4196.
- Davis, D. H., S. T. Creavin, et al. (2015). "Montreal Cognitive Assessment for the diagnosis of Alzheimer's disease and other dementias." Cochrane Database Syst Rev **10**: CD010775.
- Davis, K. L., R. C. Mohs, et al. (1999). "Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease." JAMA **281**(15): 1401-1406.
- de Almeida, J. P. L. and C. Saldanha (2010). "Nonneuronal Cholinergic System in Human Erythrocytes: Biological Role and Clinical Relevance." Journal of Membrane Biology **234**(3): 227-234.
- De Beaumont, L., S. Pelleieux, et al. (2016). "Butyrylcholinesterase K and Apolipoprotein E-varepsilon4 Reduce the Age of Onset of Alzheimer's Disease, Accelerate Cognitive Decline, and Modulate Donepezil Response in Mild Cognitively Impaired Subjects." Journal of Alzheimers Disease.

- De Jonghe, C., C. Esselens, et al. (2001). "Pathogenic APP mutations near the gamma-secretase cleavage site differentially affect A beta secretion and APP C-terminal fragment stability." Human Molecular Genetics **10**(16): 1665-1671.
- de Witt, L. and J. Ploeg (2016). "Caring for older people living alone with dementia: Healthcare professionals' experiences." Dementia (London) **15**(2): 221-238.
- Dean, R. A. and L. M. Shaw (2010). "Use of cerebrospinal fluid biomarkers for diagnosis of incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment." Clin Chem **56**(1): 7-9.
- Deane, R. and B. V. Zlokovic (2007). "Role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease." Current Alzheimer Research **4**(2): 191-197.
- Deardorff, W. J., E. Feen, et al. (2015). "The Use of Cholinesterase Inhibitors Across All Stages of Alzheimer's Disease." Drugs Aging **32**(7): 537-547.
- Deiana, S., B. Platt, et al. (2010). "The cholinergic system and spatial learning." Behavioural Brain Research.
- del Campo, M., B. Mollenhauer, et al. (2012). "Recommendations to standardize preanalytical confounding factors in Alzheimer's and Parkinson's disease cerebrospinal fluid biomarkers: an update." Biomark Med **6**(4): 419-430.
- Delacourte, A. and A. Defossez (1986). "Alzheimers-Disease - Tau Proteins, the Promoting Factors of Microtubule Assembly, Are Major Components of Paired Helical Filaments." Journal of the Neurological Sciences **76**(2-3): 173-186.
- Delfino, L. L., R. S. Komatsu, et al. (2017). "Brazilian transcultural adaptation of an instrument on communicative strategies of caregivers of elderly with dementia." Dement Neuropsychol **11**(3): 242-248.
- Deniz-Naranjo, M. C., C. Munoz-Fernandez, et al. (2007). "Butyrylcholinesterase, ApoE and Alzheimer's disease in a population from the Canary Islands (Spain)." Neuroscience Letters **427**(1): 34-38.
- DGS (2013). Portugal – Saúde Mental em números – 2013. Lisboa, Direção Geral de Saúde. **ISSN: 2183-0665**.
- Diamant, S., E. Podoly, et al. (2006). "Butyrylcholinesterase attenuates amyloid fibril formation in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(23): 8628-8633.
- Dickson, T. C. and J. C. Vickers (2001). "The morphological phenotype of beta-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease." Neuroscience **105**(1): 99-107.
- Dinamarca, M. C., J. P. Sagal, et al. (2010). "Amyloid-beta-Acetylcholinesterase complexes potentiate neurodegenerative changes induced by the A beta peptide. Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." Molecular Neurodegeneration **5**: -.
- Dingova, D., T. Fazekas, et al. (2016). "Low Plasma Cholinesterase Activities are Associated with Deficits in Spatial Orientation, Reduced Ability to Perform Basic Activities of Daily Living, and Low Body Mass Index in Patients with Progressed Alzheimer's Disease." Journal of Alzheimers Disease **51**(3): 801-813.
- Dixit, R., J. L. Ross, et al. (2008). "Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau." Science **319**(5866): 1086-1089.
- Dodel, R. C., Y. Du, et al. (2004). "Intravenous immunoglobulins containing antibodies against beta-amyloid for the treatment of Alzheimer's disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry **75**(10): 1472-1474.
- Dominguez, D. I., D. Hartmann, et al. (2004). "BACE1 and presenilin: two unusual aspartyl proteases involved in Alzheimer's disease." Neurodegenerative Diseases **1**(4-5): 168-174.
- Dosunmu, R., J. Wu, et al. (2007). "Environmental and dietary risk factors in Alzheimer's disease." Expert Review of Neurotherapeutics **7**(7): 887-900.
- Dougherty, J. J., J. L. Wu, et al. (2003). "beta-amyloid regulation of presynaptic nicotinic receptors in rat hippocampus and neocortex." Journal of Neuroscience **23**(17): 6740-6747.
- Doval, O. and M. Gaviria (2000). "[Fronto-temporal dementia]." Actas Esp Psiquiatr **28**(8): 13-28.

- Drachman, D. A. and J. Leavitt (1974). "Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging?" *Arch Neurol* **30**(2): 113-121.
- Drever, B. D., G. Riedel, et al. (2010). "The cholinergic system and hippocampal plasticity." *Behavioural Brain Research*.
- Dubois, B., H. H. Feldman, et al. (2010). "Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon." *Lancet Neurology* **9**(11): 1118-1127.
- Dubois, B., H. H. Feldman, et al. (2007). "Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria." *Lancet Neurol* **6**(8): 734-746.
- Dubois, B., H. H. Feldman, et al. (2014). "Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria." *Lancet Neurol* **13**(6): 614-629.
- Echeverria, V., A. Yarkov, et al. (2016). "Positive modulators of the alpha7 nicotinic receptor against neuroinflammation and cognitive impairment in Alzheimer's disease." *Prog Neurobiol* **144**: 142-157.
- Eggers, C., K. Herholz, et al. (2006). "Cortical acetylcholine esterase activity and ApoE4-genotype in Alzheimer disease." *Neuroscience Letters* **408**(1): 46-50.
- Eglen, R. M. (2005). "Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology." *Prog Med Chem* **43**: 105-136.
- Elble, R., E. Giacobini, et al. (1987). "Cholinesterases in cerebrospinal fluid. A longitudinal study in Alzheimer disease." *Arch Neurol* **44**(4): 403-407.
- Ellman, G. L., K. D. Courtney, et al. (1961). "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity." *Biochemical Pharmacology* **7**: 88-95.
- Ertel, K. A., M. M. Glymour, et al. (2008). "Effects of social integration on preserving memory function in a nationally representative US elderly population." *Am J Public Health* **98**(7): 1215-1220.
- Eustace, A., R. Coen, et al. (2002). "A longitudinal evaluation of behavioural and psychological symptoms of probable Alzheimer's disease." *Int J Geriatr Psychiatry* **17**(10): 968-973.
- Ewers, M., N. Mattsson, et al. (2015). "CSF biomarkers for the differential diagnosis of Alzheimer's disease: A large-scale international multicenter study." *Alzheimers Dement* **11**(11): 1306-1315.
- Ewers, M., C. Walsh, et al. (2010). "Prediction of conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease dementia based upon biomarkers and neuropsychological test performance." *Neurobiology of Aging*.
- Fagan, A. M., M. A. Mintun, et al. (2006). "Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans." *Ann Neurol* **59**(3): 512-519.
- Fage, B. A., C. C. Chan, et al. (2015). "Mini-Cog for the diagnosis of Alzheimer's disease dementia and other dementias within a community setting." *Cochrane Database Syst Rev* **2**: CD010860.
- Farlow, M. R., N. Andreasen, et al. (2015). "Long-term treatment with active Abeta immunotherapy with CAD106 in mild Alzheimer's disease." *Alzheimers Res Ther* **7**(1): 23.
- Farrer, L. A., L. A. Cupples, et al. (1997). "Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium." *JAMA* **278**(16): 1349-1356.
- Fei, M. and W. Jianhua (2012). "Apolipoprotein epsilon4-Allele as a Significant Risk Factor for Conversion from Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's disease: a Meta-analysis of Prospective Studies." *Journal of Molecular Neuroscience*.
- Feldman, H., S. Gauthier, et al. (2001). "A 24-week, randomized, double-blind study of donepezil in moderate to severe Alzheimer's disease." *Neurology* **57**(4): 613-620.
- Felten, D. L. and A. N. Shetty (2010). *Netter's atlas of neuroscience*. Philadelphia, PA, Saunders/Elsevier.
- Fernandes, M. A. S., C. R. Oliveira, et al. (1999). "Apolipoprotein E epsilon 4 allele is a risk factor for Alzheimer's disease: The central region of Portugal (Coimbra) as a case study." *European Neurology* **42**(3): 183-184.

- Ferreira-Vieira, T. H., I. M. Guimaraes, et al. (2016). "Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System." Current Neuropharmacology **14**(1): 101-115.
- Ferris, S., A. Nordberg, et al. (2009). "Progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease: effects of sex, butyrylcholinesterase genotype, and rivastigmine treatment." Pharmacogenetics and Genomics **19**(8): 635-646.
- Fitzpatrick, A. W. P., B. Falcon, et al. (2017). "Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease." Nature **547**(7662): 185-190.
- Folstein, M. F., S. E. Folstein, et al. (1975). ""Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician." J Psychiatr Res **12**(3): 189-198.
- Formichi, P., C. Battisti, et al. (2006). "Cerebrospinal fluid tau, A beta, and phosphorylated tau protein for the diagnosis of Alzheimer's disease." J Cell Physiol **208**(1): 39-46.
- Frisoni, G. B., N. C. Fox, et al. (2010). "The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease." Nat Rev Neurol **6**(2): 67-77.
- Gabuzda, D., J. Busciglio, et al. (1994). "Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative." Journal of Biological Chemistry **269**(18): 13623-13628.
- Gallagher, D., A. N. Mhaolain, et al. (2010). "Detecting prodromal Alzheimer's disease in mild cognitive impairment: utility of the CAMCOG and other neuropsychological predictors." Int J Geriatr Psychiatry **25**(12): 1280-1287.
- Gatz, M., C. A. Prescott, et al. (2006). "Lifestyle risk and delaying factors." Alzheimer Dis Assoc Disord **20**(3 Suppl 2): S84-88.
- Gatz, M., C. A. Reynolds, et al. (2006). "Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease." Arch Gen Psychiatry **63**(2): 168-174.
- Geda, Y. E., L. S. Schneider, et al. (2013). "Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: past progress and anticipation of the future." Alzheimers Dement **9**(5): 602-608.
- Geula, C. and M. Mesulam (1989). "Special properties of cholinesterases in the cerebral cortex of Alzheimer's disease." Brain Research **498**(1): 185-189.
- Geula, C. and M. M. Mesulam (1995). "Cholinesterases and the pathology of Alzheimer disease." Alzheimer Dis Assoc Disord **9** Suppl 2: 23-28.
- Ghebremedhin, E., D. R. Thal, et al. (2002). "Age-dependent association between butyrylcholinesterase K-variant and Alzheimer disease-related neuropathology in human brains." Neuroscience Letters **320**(1-2): 25-28.
- Ghebremedhin, E., D. R. Thal, et al. (2007). "Homozygosity for the K variant of BCHE gene increases the risk for development of neurofibrillary pathology but not amyloid deposits at young ages." Acta Neuropathol **114**(4): 359-363.
- Giannakopoulos, P., F. R. Herrmann, et al. (2003). "Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease." Neurology **60**(9): 1495-1500.
- Gilad, G. M., J. M. Rabey, et al. (1987). "Age-dependent loss and compensatory changes of septohippocampal cholinergic neurons in two rat strains differing in longevity and response to stress." Brain Research **436**(2): 311-322.
- Glennner, G. G. and C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." Biochem Biophys Res Commun **120**(3): 885-890.
- Gnatt, A., D. Ginzberg, et al. (1991). "Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Are Encoded by 2 Distinct Genes." Cellular and Molecular Neurobiology **11**(1): 91-104.
- Goedert, M., C. M. Wischik, et al. (1988). "Cloning and Sequencing of the Cdna-Encoding a Core Protein of the Paired Helical Filament of Alzheimer-Disease - Identification as the Microtubule-Associated Protein Tau." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **85**(11): 4051-4055.
- Gorno-Tempini, M. L., N. F. Dronkers, et al. (2004). "Cognition and anatomy in three variants of primary progressive aphasia." Ann Neurol **55**(3): 335-346.

- Grothe, M., L. Zaborszky, et al. (2010). "Reduction of basal forebrain cholinergic system parallels cognitive impairment in patients at high risk of developing Alzheimer's disease." Cerebral Cortex **20**(7): 1685-1695.
- Group, B. D. W. (2001). "Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework." Clinical Pharmacology & Therapeutics **69**(3): 89-95.
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, et al. (1986). "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(13): 4913-4917.
- Grundke-Iqbal, I., A. W. Vorbrodt, et al. (1988). "Microtubule-associated polypeptides tau are altered in Alzheimer paired helical filaments." Brain Research **464**(1): 43-52.
- Guerreiro M, Silva AP, et al. (2003). Avaliação Breve do Estado Mental: Escalas e Testes na Demência. Grupo de Estudos de Envelhecimento Cerebral e Demência.
- Guerreiro, R., A. Wojtas, et al. (2013). "TREM2 Variants in Alzheimer's Disease." New England Journal of Medicine **368**(2): 117-127.
- Guerreiro, R. J., E. Lohmann, et al. (2012). "Exome sequencing reveals an unexpected genetic cause of disease: NOTCH3 mutation in a Turkish family with Alzheimer's disease." Neurobiology of Aging **33**(5): 1008 e1017-1023.
- Guo, T., W. Noble, et al. (2017). "Roles of tau protein in health and disease." Acta Neuropathol **133**(5): 665-704.
- Guyton, A. C. and J. E. Hall (2000). Text book of Medical Physiology. Philadelphia, Pennsylvania, USA, SAUNDERS.
- Guzman, E. A., Y. Bouter, et al. (2014). "Abundance of Abeta(5)-x like immunoreactivity in transgenic 5XFAD, APP/PS1KI and 3xTG mice, sporadic and familial Alzheimer's disease." Molecular Neurodegeneration **9**: 13.
- Haense, C., E. Kalbe, et al. (2010). "Cholinergic system function and cognition in mild cognitive impairment." Neurobiology of Aging.
- Haider, A. and S. C. Dulebohn (2018). Dementia, Lewy Body. StatPearls. Treasure Island (FL).
- Hampel, H., L. S. Schneider, et al. (2014). "Advances in the therapy of Alzheimer's disease: targeting amyloid beta and tau and perspectives for the future." Expert Review of Neurotherapeutics **15**(1): 83-105.
- Hampel, H., S. J. Teipel, et al. (2004). "Value of CSF beta-amyloid1-42 and tau as predictors of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment." Mol Psychiatry **9**(7): 705-710.
- Hansson, O., H. Zetterberg, et al. (2006). "Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study." Lancet Neurol **5**(3): 228-234.
- Hardy, J. (2006). "A hundred years of Alzheimer's disease research." Neuron **52**(1): 3-13.
- Hardy, J. A. and G. A. Higgins (1992). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." Science **256**(5054): 184-185.
- Harold, D., R. Abraham, et al. (2009). "Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease (vol 41, pg 1088, 2009)." Nature Genetics **41**(10): 1156-1156.
- Hasin, Y., N. Avidan, et al. (2004). "A paradigm for single nucleotide polymorphism analysis: the case of the acetylcholinesterase gene." Hum Mutat **24**(5): 408-416.
- Haugaard, N. and R. M. Levin (2000). "Regulation of the activity of choline acetyl transferase by lipoic acid." Molecular and Cellular Biochemistry **213**(1-2): 61-63.
- Hellstrom-Lindahl, E. (2000). "Modulation of beta-amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation by acetylcholine receptors." European Journal of Pharmacology **393**(1-3): 255-263.
- Heneka, M. T., M. J. Carson, et al. (2015). "Neuroinflammation in Alzheimer's disease." Lancet Neurol **14**(4): 388-405.
- Herholz, K., E. Salmon, et al. (2002). "Discrimination between Alzheimer dementia and controls by automated analysis of multicenter FDG PET." Neuroimage **17**(1): 302-316.

- Herholz, K., S. Weisenbach, et al. (2005). "Cerebral acetylcholine esterase activity in mild cognitive impairment." Neuroreport **16**(13): 1431-1434.
- Herholz, K., S. Weisenbach, et al. (2004). "In vivo study of acetylcholine esterase in basal forebrain, amygdala, and cortex in mild to moderate Alzheimer disease." Neuroimage **21**(1): 136-143.
- Hertze, J., L. Minthon, et al. (2010). "Evaluation of CSF biomarkers as predictors of Alzheimer's disease: a clinical follow-up study of 4.7 years." Journal of Alzheimers Disease **21**(4): 1119-1128.
- Herukka, S. K., A. H. Simonsen, et al. (2017). "Recommendations for cerebrospinal fluid Alzheimer's disease biomarkers in the diagnostic evaluation of mild cognitive impairment." Alzheimers Dement **13**(3): 285-295.
- Hiltunen, M., A. Mannermaa, et al. (1998). "Butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 genes do not act in synergy in Finnish late-onset Alzheimer's disease patients." Neuroscience Letters **250**(1): 69-71.
- Hodges, J. R. and K. Patterson (2007). "Semantic dementia: a unique clinicopathological syndrome." Lancet Neurol **6**(11): 1004-1014.
- Hogan, D. B. (2014). "Long-Term Efficacy and Toxicity of Cholinesterase Inhibitors in the Treatment of Alzheimer Disease." Canadian Journal of Psychiatry-Revue Canadienne De Psychiatrie **59**(12): 618-623.
- Hollingworth, P., D. Harold, et al. (2011). "Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease." Nature Genetics **43**(5): 429+.
- Holmes, C. (2002). "Genotype and phenotype in Alzheimer's disease." Br J Psychiatry **180**: 131-134.
- Holmes, C., D. Boche, et al. (2008). "Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial." Lancet **372**(9634): 216-223.
- Holtzman, D. M., J. C. Morris, et al. (2011). "Alzheimer's disease: the challenge of the second century." Sci Transl Med **3**(77): 77sr71.
- Hosey, M. M. (1992). "Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors." FASEB J **6**(3): 845-852.
- Hsiao, K. (1998). "Transgenic mice expressing Alzheimer amyloid precursor proteins." Exp Gerontol **33**(7-8): 883-889.
- Hu, J., A. Igarashi, et al. (2001). "Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity." Journal of Biological Chemistry **276**(51): 47863-47868.
- Huff, F. J., C. T. Reiter, et al. (1989). "Activities and kinetic properties of lumbar cerebrospinal fluid cholinesterases in relation to clinical diagnosis, severity, and progression of Alzheimer's disease." Can J Neurol Sci **16**(4): 406-410.
- Ichimura, H., K. Parthasarathi, et al. (2003). "Mechano-oxidative coupling by mitochondria induces proinflammatory responses in lung venular capillaries." J Clin Invest **111**(5): 691-699.
- Imbimbo, B. P., S. Ottonello, et al. (2012). "Solanezumab for the treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease." Expert Rev Clin Immunol **8**(2): 135-149.
- in t' Veld, B. A., A. Ruitenber, et al. (2001). "Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease." N Engl J Med **345**(21): 1515-1521.
- Irwin, D. J., J. Brettschneider, et al. (2016). "Deep clinical and neuropathological phenotyping of Pick disease." Ann Neurol **79**(2): 272-287.
- Ittner, L. M., Y. D. Ke, et al. (2010). "Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models." Cell **142**(3): 387-397.
- Iwata, N., S. Tsubuki, et al. (2000). "Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition." Nat Med **6**(2): 143-150.

- Jack, C. R., Jr., D. A. Bennett, et al. (2018). "NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease." *Alzheimers Dement* **14**(4): 535-562.
- Jack, C. R., Jr., D. A. Bennett, et al. (2016). "A/T/N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers." *Neurology* **87**(5): 539-547.
- Jack, C. R., Jr., D. S. Knopman, et al. (2013). "Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers." *Lancet Neurol* **12**(2): 207-216.
- Jack, C. R., Jr., D. S. Knopman, et al. (2010). "Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade." *Lancet Neurol* **9**(1): 119-128.
- Jack, C. R., Jr., V. J. Lowe, et al. (2009). "Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease." *Brain* **132**(Pt 5): 1355-1365.
- Jack, C. R., Jr., T. M. Therneau, et al. (2016). "Transition rates between amyloid and neurodegeneration biomarker states and to dementia: a population-based, longitudinal cohort study." *Lancet Neurol* **15**(1): 56-64.
- Jack, C. R., Jr., H. J. Wiste, et al. (2010). "Brain beta-amyloid measures and magnetic resonance imaging atrophy both predict time-to-progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease." *Brain* **133**(11): 3336-3348.
- Jack, C. R., Jr., H. J. Wiste, et al. (2014). "Age-specific population frequencies of cerebral beta-amyloidosis and neurodegeneration among people with normal cognitive function aged 50-89 years: a cross-sectional study." *Lancet Neurol* **13**(10): 997-1005.
- Jack, C. R., D. S. Knopman, et al. (2016). "Suspected non-Alzheimer disease pathophysiology - concept and controversy." *Nature Reviews Neurology* **12**(2): 117-124.
- Jan, A., O. Gokce, et al. (2008). "The ratio of monomeric to aggregated forms of Abeta40 and Abeta42 is an important determinant of amyloid-beta aggregation, fibrillogenesis, and toxicity." *Journal of Biological Chemistry* **283**(42): 28176-28189.
- Janssen, J. C., J. A. Beck, et al. (2003). "Early onset familial Alzheimer's disease - Mutation frequency in 31 families." *Neurology* **60**(2): 235-239.
- Jarmolowicz, A. I., H. Y. Chen, et al. (2015). "The Patterns of Inheritance in Early-Onset Dementia: Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia." *American Journal of Alzheimers Disease and Other Dementias* **30**(3): 299-306.
- Jayadev, S., J. B. Leverenz, et al. (2010). "Alzheimer's disease phenotypes and genotypes associated with mutations in presenilin 2." *Brain* **133**(Pt 4): 1143-1154.
- Jean, L., C. F. Lee, et al. (2008). "Structural elements regulating amyloidogenesis: a cholinesterase model system." *Plos One* **3**(3): e1834.
- Johansson, P., E. G. Almqvist, et al. (2013). "Cerebrospinal Fluid (CSF) 25-Hydroxyvitamin D Concentration and CSF Acetylcholinesterase Activity Are Reduced in Patients with Alzheimer's Disease." *Plos One* **8**(11).
- Johansson, P., E. G. Almqvist, et al. (2013). "Cerebrospinal fluid (CSF) 25-hydroxyvitamin D concentration and CSF acetylcholinesterase activity are reduced in patients with Alzheimer's disease." *Plos One* **8**(11): e81989.
- Jonsson, M., O. Norrgard, et al. (2007). "Presence of a marked nonneuronal cholinergic system in human colon: study of normal colon and colon in ulcerative colitis." *Inflamm Bowel Dis* **13**(11): 1347-1356.
- Jonsson, T., H. Stefansson, et al. (2013). "Variant of TREM2 Associated with the Risk of Alzheimer's Disease." *New England Journal of Medicine* **368**(2): 107-116.
- Jorm, A. F. (1990). *Incidence and Prevalence*. In Jorm (Ed.). *The epidemiology of Alzheimer's disease and related disorders* (pp. 54-86). London, England, Chapman and Hall.
- Kaesler, P. F., J. Ghika, et al. (2015). "Visual signs and symptoms in patients with the visual variant of Alzheimer disease." *Bmc Ophthalmology* **15**: 65.
- Kamenov, K., M. Cabello, et al. (2016). "Factors Related to Social Support in Neurological and Mental Disorders." *Plos One* **11**(2): e0149356.

- Kanekiyo, T. and G. Bu (2014). "The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and amyloid-beta clearance in Alzheimer's disease." *Front Aging Neurosci* **6**: 93.
- Kang, J., H. G. Lemaire, et al. (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." *Nature* **325**(6106): 733-736.
- Kang, S. G., K. S. Na, et al. (2017). "Dementia Care by Healthy Elderly Caregivers Is Associated with Improvement of Patients' Memory and the Caregivers' Quality of Life: A Before and After Study." *Psychiatry Investig* **14**(4): 458-462.
- Karch, C. M. and A. M. Goate (2015). "Alzheimer's Disease Risk Genes and Mechanisms of Disease Pathogenesis." *Biological Psychiatry* **77**(1): 43-51.
- Karran, E., M. Mercken, et al. (2011). "The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics." *Nat Rev Drug Discov* **10**(9): 698-712.
- Kehoe, P. G., H. Williams, et al. (1998). "The butyrylcholinesterase K variant and susceptibility to Alzheimer's disease." *Journal of Medical Genetics* **35**(12): 1034-1035.
- Kertesz, A., P. Martinez-Lage, et al. (2000). "The corticobasal degeneration syndrome overlaps progressive aphasia and frontotemporal dementia." *Neurology* **55**(9): 1368-1375.
- Kertesz, A., P. McMonagle, et al. (2005). "The evolution and pathology of frontotemporal dementia." *Brain* **128**(Pt 9): 1996-2005.
- Kester, M. I., N. A. Verwey, et al. (2011). "Progression from MCI to AD: predictive value of CSF Aβ₄₂ is modified by APOE genotype." *Neurobiology of Aging* **32**(8): 1372-1378.
- Ki, C. S., D. L. Na, et al. (1999). "No association between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset Alzheimer's disease." *American Journal of Medical Genetics* **88**(2): 113-115.
- Kilimann, I., L. Hausner, et al. (2017). "Parallel Atrophy of Cortex and Basal Forebrain Cholinergic System in Mild Cognitive Impairment." *Cerebral Cortex* **27**(3): 1841-1848.
- Kim, K. W., J. H. Jhoo, et al. (2001). "Neither the butyrylcholinesterase K variant nor transferrin C2 variant confers a risk for Alzheimer's disease in Koreans." *J Neural Transm (Vienna)* **108**(10): 1159-1166.
- King, M. E., H. M. Kan, et al. (2006). "Tau-dependent microtubule disassembly initiated by prefibrillar beta-amyloid." *J Cell Biol* **175**(4): 541-546.
- Klyubin, I., V. Betts, et al. (2008). "Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization." *Journal of Neuroscience* **28**(16): 4231-4237.
- Kobayashi, H., T. Ohnishi, et al. (2016). "The comparative efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a Bayesian network meta-analysis." *Int J Geriatr Psychiatry* **31**(8): 892-904.
- Kolarova, M., F. Garcia-Sierra, et al. (2012). "Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease." *Int J Alzheimers Dis* **2012**: 731526.
- Kopeikina, K. J., B. T. Hyman, et al. (2012). "Soluble forms of tau are toxic in Alzheimer's disease." *Transl Neurosci* **3**(3): 223-233.
- Kuhl, D. E., R. A. Koeppe, et al. (2006). "In vivo butyrylcholinesterase activity is not increased in Alzheimer's disease synapses." *Ann Neurol* **59**(1): 13-20.
- Kumar, D., A. Ganeshpurkar, et al. (2018). "Secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Long road ahead." *European Journal of Medicinal Chemistry* **148**: 436-452.
- Kumar, V., E. Giacobini, et al. (1989). "CSF choline and acetylcholinesterase in early-onset vs. late-onset Alzheimer's disease patients." *Acta Neurologica Scandinavica* **80**(5): 461-466.
- Kurochkin, I. V. and S. Goto (1994). "Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme." *Febs Letters* **345**(1): 33-37.
- Kwok, J. B. J., Q. X. Li, et al. (2000). "Novel Leu723Pro amyloid precursor protein mutation increases amyloid beta 42(43) peptide levels and induces apoptosis." *Annals of Neurology* **47**(2): 249-253.
- Lacor, P. N., M. C. Buniel, et al. (2007). "Aβ oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease." *Journal of Neuroscience* **27**(4): 796-807.

- LaFerla, F. M., K. N. Green, et al. (2007). "Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease." Nat Rev Neurosci **8**(7): 499-509.
- Lambert, J. C., S. Heath, et al. (2009). "Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease." Nature Genetics **41**(10): 1094-U1068.
- Lambert, J. C., C. A. Ibrahim-Verbaas, et al. (2013). "Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease." Nature Genetics **45**(12): 1452-U1206.
- Lane, R., H. H. Feldman, et al. (2008). "Synergistic effect of apolipoprotein E epsilon4 and butyrylcholinesterase K-variant on progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease." Pharmacogenet Genomics **18**(4): 289-298.
- Lane, R., H. H. Feldman, et al. (2008). "Synergistic effect of apolipoprotein E epsilon 4 and butyrylcholinesterase K-variant on progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease." Pharmacogenetics and Genomics **18**(4): 289-298.
- Larson, E. B., K. Yaffe, et al. (2013). "New insights into the dementia epidemic." N Engl J Med **369**(24): 2275-2277.
- Layer, P. G. (1995). "Nonclassical roles of cholinesterases in the embryonic brain and possible links to Alzheimer disease." Alzheimer Dis Assoc Disord **9 Suppl 2**: 29-36.
- Le Ber, I. and B. Dubois (2007). "[Frontotemporal dementia]." Presse Med **36**(10 Pt 2): 1477-1484.
- Leduc, V., S. Jasmin-Belanger, et al. (2010). "APOE and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease." Trends Mol Med **16**(10): 469-477.
- Lee, D. W., H. C. Liu, et al. (2000). "No association between butyrylcholinesterase K-variant and Alzheimer disease in Chinese." American Journal of Medical Genetics **96**(2): 167-169.
- Lee, S. J., H. S. Lim, et al. (2011). "Protein aggregate spreading in neurodegenerative diseases: problems and perspectives." Neuroscience Research **70**(4): 339-348.
- Lehericy, S., E. C. Hirsch, et al. (1991). "Cholinergic neuronal loss in the globus pallidus of Alzheimer disease patients." Neuroscience Letters **123**(2): 152-155.
- Lehmann, D. J., C. Johnston, et al. (1997). "Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease." Hum Mol Genet **6**(11): 1933-1936.
- Leitão, M. J., I. Baldeiras, et al. (2016). "CSF Tau proteins reduce misdiagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease suspected cases with inconclusive 14-3-3 result." J Neurol **263**(9): 1847-1861.
- Leitao, M. J., I. Baldeiras, et al. (2015). "Chasing the Effects of Pre-Analytical Confounders - A Multicenter Study on CSF-AD Biomarkers." Front Neurol **6**: 153.
- Leitão, M. J., I. Baldeiras, et al. (2015). "Chasing the Effects of Pre-Analytical Confounders - A Multicenter Study on CSF-AD Biomarkers." Front Neurol **6**: 153.
- Leoni, V. (2011). "The effect of apolipoprotein E (ApoE) genotype on biomarkers of amyloidogenesis, tau pathology and neurodegeneration in Alzheimer's disease." Clinical Chemistry and Laboratory Medicine **49**(3): 375-383.
- Levy-Lahad, E., W. Wasco, et al. (1995). "Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus." Science **269**(5226): 973-977.
- Li, C. and J. Gotz (2017). "Tau-based therapies in neurodegeneration: opportunities and challenges." Nat Rev Drug Discov **16**(12): 863-883.
- Li, X. L., N. Hu, et al. (2014). "Behavioral and psychological symptoms in Alzheimer's disease." Biomed Res Int **2014**: 927804.
- Li, Y., S. Camp, et al. (1991). "Gene Structure of Mammalian Acetylcholinesterase - Alternative Exons Dictate Tissue-Specific Expression." Journal of Biological Chemistry **266**(34): 23083-23090.
- Li, Y., S. Hai, et al. (2015). "Cholinesterase inhibitors for rarer dementias associated with neurological conditions." Cochrane Database Syst Rev **3**: CD009444.
- Lodish, H., A. Berk, et al. (1999). Molecular Cell Biology. England, Freeman.
- Lomen-Hoerth, C., T. Anderson, et al. (2002). "The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia." Neurology **59**(7): 1077-1079.

- Macdonald, I. R., S. P. Maxwell, et al. (2017). "Quantification of Butyrylcholinesterase Activity as a Sensitive and Specific Biomarker of Alzheimer's Disease." Journal of Alzheimers Disease **58**(2): 491-505.
- Maetzler, W., S. Keller, et al. (2009). "No differences of butyrylcholinesterase protein activity and allele frequency in Lewy body diseases." Neurobiol Dis **35**(2): 296-301.
- Mahley, R. W. and S. C. Rall, Jr. (2000). "Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein." Annu Rev Genomics Hum Genet **1**: 507-537.
- Mandelkow, E. M., J. Biernat, et al. (1995). "Tau Domains, Phosphorylation, and Interactions with Microtubules." Neurobiology of Aging **16**(3): 355-362.
- Markesbery, W. R. (1999). "The role of oxidative stress in Alzheimer disease." Arch Neurol **56**(12): 1449-1452.
- Martin, A., M. Domercq, et al. (2018). "Inflammation in stroke: the role of cholinergic, purinergic and glutamatergic signaling." Ther Adv Neurol Disord **11**: 1756286418774267.
- Martins, R. N., R. Clarnette, et al. (1995). "ApoE genotypes in Australia: roles in early and late onset Alzheimer's disease and Down's syndrome." Neuroreport **6**(11): 1513-1516.
- Masters, M. C., J. C. Morris, et al. (2015). ""Noncognitive" symptoms of early Alzheimer disease: a longitudinal analysis." Neurology **84**(6): 617-622.
- Mattsson, N., U. Andreasson, et al. (2017). "Association of Plasma Neurofilament Light With Neurodegeneration in Patients With Alzheimer Disease." JAMA Neurol **74**(5): 557-566.
- Mattsson, N., H. Zetterberg, et al. (2009). "CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment." JAMA **302**(4): 385-393.
- Maurer, S. V. and C. L. Williams (2017). "The Cholinergic System Modulates Memory and Hippocampal Plasticity via Its Interactions with Non-Neuronal Cells." Front Immunol **8**: 1489.
- McGeer, P. L., E. McGeer, et al. (1990). "Anti-inflammatory drugs and Alzheimer disease." Lancet **335**(8696): 1037.
- McGeer, P. L. and E. G. McGeer (2000). "Autotoxicity and Alzheimer disease." Arch Neurol **57**(6): 789-790.
- McGeer, P. L., M. Schulzer, et al. (1996). "Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies." Neurology **47**(2): 425-432.
- Mckhann, G., D. Drachman, et al. (1984). "Clinical-Diagnosis of Alzheimers-Disease - Report of the Nincds-Adrda Work Group under the Auspices of Department-of-Health-and-Human-Services Task-Force on Alzheimers-Disease." Neurology **34**(7): 939-944.
- McKhann, G. M., M. S. Albert, et al. (2001). "Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease." Arch Neurol **58**(11): 1803-1809.
- McKhann, G. M., D. S. Knopman, 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**(3): 263-269.
- Meek, P. D., E. K. McKeithan, et al. (1998). "Economic considerations in Alzheimer's disease." Pharmacotherapy **18**(2): 68-73.
- Mesulam, M. (2004). "The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show?" Learn Mem **11**(1): 43-49.
- Mesulam, M. M. (1982). "Slowly progressive aphasia without generalized dementia." Ann Neurol **11**(6): 592-598.
- Mesulam, M. M. (2001). "Primary progressive aphasia." Ann Neurol **49**(4): 425-432.
- Mesulam, M. M. (2003). "Primary progressive aphasia--a language-based dementia." N Engl J Med **349**(16): 1535-1542.
- Mesulam, M. M. and M. Asuncion Moran (1987). "Cholinesterases within neurofibrillary tangles related to age and Alzheimer's disease." Ann Neurol **22**(2): 223-228.

- Meyer-Luehmann, M., J. Coomaraswamy, et al. (2006). "Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host." *Science* **313**(5794): 1781-1784.
- Meyers, B. and E. F. Domino (1964). "The Effect of Cholinergic Blocking Drugs on Spontaneous Alternation in Rats." *Arch Int Pharmacodyn Ther* **150**: 525-529.
- Minthon, L., C. Hesse, et al. (1997). "The apolipoprotein E epsilon4 allele frequency is normal in fronto-temporal dementia, but correlates with age at onset of disease." *Neuroscience Letters* **226**(1): 65-67.
- Misra, C., Y. Fan, et al. (2009). "Baseline and longitudinal patterns of brain atrophy in MCI patients, and their use in prediction of short-term conversion to AD: results from ADNI." *Neuroimage* **44**(4): 1415-1422.
- Mohs, R. C., W. G. Rosen, et al. (1983). "The Alzheimers-Disease Assessment Scale - an Instrument for Assessing Treatment Efficacy." *Psychopharmacology Bulletin* **19**(3): 448-450.
- Mok, W. Y., L. W. Chu, et al. (2004). "The relationship between non-cognitive symptoms and functional impairment in Alzheimer's disease." *Int J Geriatr Psychiatry* **19**(11): 1040-1046.
- Moralev, S. N. and E. V. Rozengart (2007). *Comparative Enzymology of Cholinesterases*. California, International University Line.
- Moran, M. A., E. J. Mufson, et al. (1994). "Cholinesterases colocalize with sites of neurofibrillary degeneration in aged and Alzheimer's brains." *Acta Neuropathol* **87**(3): 284-292.
- Moulton, P. V. and W. Yang (2012). "Air pollution, oxidative stress, and Alzheimer's disease." *J Environ Public Health* **2012**: 472751.
- Muhs, A., D. T. Hickman, et al. (2007). "Liposomal vaccines with conformation-specific amyloid peptide antigens define immune response and efficacy in APP transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(23): 9810-9815.
- Munoz-Delgado, E., M. F. Montenegro, et al. (2010). "Expression of cholinesterases in human kidney and its variation in renal cell carcinoma types." *Febs Journal* **277**(21): 4519-4529.
- Munoz, D. G. and H. Feldman (2000). "Causes of Alzheimer's disease." *CMAJ* **162**(1): 65-72.
- Naj, A. C., G. Jun, et al. (2011). "Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease." *Nature Genetics* **43**(5): 436-+.
- Nakai, M., T. Kawamata, et al. (1996). "Expression of apolipoprotein E mRNA in rat microglia." *Neuroscience Letters* **211**(1): 41-44.
- Nakamura, A., N. Kaneko, et al. (2018). "High performance plasma amyloid-beta biomarkers for Alzheimer's disease." *Nature* **554**(7691): 249-254.
- Nakano, S., T. Kato, et al. (1986). "Acetylcholinesterase activity in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and senile dementia." *Journal of the Neurological Sciences* **75**(2): 213-223.
- Nalivaeva, N. N., C. Beckett, et al. (2012). "Are amyloid-degrading enzymes viable therapeutic targets in Alzheimer's disease?" *Journal of Neurochemistry* **120** Suppl 1: 167-185.
- Nasreddine, Z. S., N. A. Phillips, et al. (2005). "The montreal cognitive assessment, MoCA: A brief screening tool for mild cognitive impairment." *Journal of the American Geriatrics Society* **53**(4): 695-699.
- Nath, S., L. Agholme, et al. (2012). "Spreading of neurodegenerative pathology via neuron-to-neuron transmission of beta-amyloid." *Journal of Neuroscience* **32**(26): 8767-8777.
- Neve, R. L., P. Harris, et al. (1986). "Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2." *Brain Research* **387**(3): 271-280.
- Nicol, E. (2017). "The ageing population in healthcare: a challenge to, and in, the workforce." *Clin Med (Lond)* **17**(4): 291-292.
- Nicolas, G., C. Charbonnier, et al. (2016). "SORL1 rare variants: a major risk factor for familial early-onset Alzheimer's disease." *Mol Psychiatry* **21**(6): 831-836.
- Niewiadomska, G., A. Mietelska-Porowska, et al. (2010). "The cholinergic system, nerve growth factor and the cytoskeleton." *Behavioural Brain Research*.

- Nimmrich, V., C. Grimm, et al. (2008). "Amyloid beta oligomers (A beta(1-42) globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents." Journal of Neuroscience **28**(4): 788-797.
- Niu, H., I. Alvarez-Alvarez, et al. (2017). "Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis." Neurologia **32**(8): 523-532.
- Nordberg, A., I. Alafuzoff, et al. (1992). "Nicotinic and muscarinic subtypes in the human brain: changes with aging and dementia." J Neurosci Res **31**(1): 103-111.
- Norton, S., F. E. Matthews, et al. (2014). "Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data." Lancet Neurol **13**(8): 788-794.
- O'Brien, R. J. and P. C. Wong (2011). "Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease." Annu Rev Neurosci **34**: 185-204.
- Okello, A., J. Koivunen, et al. (2009). "Conversion of amyloid positive and negative MCI to AD over 3 years: an 11C-PIB PET study." Neurology **73**(10): 754-760.
- Olsson, B., R. Lautner, et al. (2016). "CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis." Lancet Neurol **15**(7): 673-684.
- Orre, M., W. Kamphuis, et al. (2013). "Reactive glia show increased immunoproteasome activity in Alzheimer's disease." Brain **136**(Pt 5): 1415-1431.
- Ovsepian, S. V., V. B. O'Leary, et al. (2016). "Cholinergic Mechanisms in the Cerebral Cortex: Beyond Synaptic Transmission." Neuroscientist **22**(3): 238-251.
- Panda, D., J. C. Samuel, et al. (2003). "Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four-repeat tau: implications for the onset of neurodegenerative disease." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9548-9553.
- Panegyres, P. K., C. D. S. Mamotte, et al. (1999). "Butyrylcholinesterase K variant and Alzheimer's disease." Journal of Neurology **246**(5): 369-370.
- Parnetti, L., D. Chiasserini, et al. (2011). "Changes in CSF acetyl- and butyrylcholinesterase activity after long-term treatment with AChE inhibitors in Alzheimer's disease." Acta Neurologica Scandinavica **124**(2): 122-129.
- Patterson, C. E., S. A. Todd, et al. (2011). "Effect of apolipoprotein E and butyrylcholinesterase genotypes on cognitive response to cholinesterase inhibitor treatment at different stages of Alzheimer's disease." Pharmacogenomics J **11**(6): 444-450.
- Paul, S., W. K. Jeon, et al. (2015). "Interaction of basal forebrain cholinergic neurons with the glucocorticoid system in stress regulation and cognitive impairment." Front Aging Neurosci **7**: 43.
- Pedersen, J. T. and E. M. Sigurdsson (2015). "Tau immunotherapy for Alzheimer's disease." Trends Mol Med **21**(6): 394-402.
- Perera, G., L. Pedersen, et al. (2018). "Dementia prevalence and incidence in a federation of European Electronic Health Record databases: The European Medical Informatics Framework resource." Alzheimers Dement **14**(2): 130-139.
- Perl, D. P. (2010). "Neuropathology of Alzheimer's disease." Mt Sinai J Med **77**(1): 32-42.
- Perry, E. K., B. E. Tomlinson, et al. (1978). "Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia." Br Med J **2**(6150): 1457-1459.
- Peter, J., J. Lahr, et al. (2016). "Contribution of the Cholinergic System to Verbal Memory Performance in Mild Cognitive Impairment." Journal of Alzheimers Disease **53**(3): 991-1001.
- Petersen, R. C. (2004). "Mild cognitive impairment as a diagnostic entity." Journal of Internal Medicine **256**(3): 183-194.
- Petersen, R. C. and J. C. Morris (2005). "Mild cognitive impairment as a clinical entity and treatment target." Archives of Neurology **62**(7): 1160-1163.
- Petersen, R. C., G. E. Smith, et al. (1995). "Apolipoprotein E status as a predictor of the development of Alzheimer's disease in memory-impaired individuals." JAMA **273**(16): 1274-1278.
- Petersen, R. C., G. E. Smith, et al. (1999). "Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome." Arch Neurol **56**(3): 303-308.

- Petersen, R. C., J. C. Stevens, et al. (2001). "Practice parameter: Early detection of dementia: Mild cognitive impairment (an evidence-based review) - Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology." Neurology **56**(9): 1133-1142.
- Piccardi, M., D. Congiu, et al. (2007). "Alzheimer's disease: case-control association study of polymorphisms in AChE, CHAT, and BCHE genes in a Sardinian sample." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **144B**(7): 895-899.
- Pitas, R. E., J. K. Boyles, et al. (1987). "Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins." Biochim Biophys Acta **917**(1): 148-161.
- Podcasy, J. L. and C. N. Epperson (2016). "Considering sex and gender in Alzheimer disease and other dementias." Dialogues Clin Neurosci **18**(4): 437-446.
- Podoly, E., D. E. Shalev, et al. (2009). "The butyrylcholinesterase K variant confers structurally derived risks for Alzheimer pathology." Journal of Biological Chemistry **284**(25): 17170-17179.
- Pohanka, M. (2011). "Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **155**(3): 219-229.
- Poirier, J., M. C. Delisle, et al. (1995). "Apolipoprotein E4 allele as a predictor of cholinergic deficits and treatment outcome in Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 12260-12264.
- Pottier, C., T. A. Ravenscroft, et al. (2016). "TYROBP genetic variants in early-onset Alzheimer's disease." Neurobiology of Aging **48**: 222 e229-222 e215.
- Puzzo, D., R. Piacentini, et al. (2017). "LTP and memory impairment caused by extracellular Abeta and Tau oligomers is APP-dependent." Elife **6**.
- Puzzo, D., L. Privitera, et al. (2011). "Endogenous amyloid-beta is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory." Ann Neurol **69**(5): 819-830.
- Puzzo, D., L. Privitera, et al. (2008). "Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus." Journal of Neuroscience **28**(53): 14537-14545.
- Rafnsson, S. B., M. Orrell, et al. (2017). "Loneliness, Social Integration, and Incident Dementia Over 6 Years: Prospective Findings From the English Longitudinal Study of Ageing." J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci.
- Raudino, F. (2013). "Non-cognitive symptoms and related conditions in the Alzheimer's disease: a literature review." Neurol Sci **34**(8): 1275-1282.
- Reale, M., E. Costantini, et al. (2018). "Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase polymorphisms in Multiple Sclerosis patients: implication in peripheral inflammation." Sci Rep **8**(1): 1319.
- Reitz, C. and R. Mayeux (2014). "Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers." Biochemical Pharmacology **88**(4): 640-651.
- Reitz, C. and R. Mayeux (2014). "Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers." Biochemical Pharmacology **88**(4): 640-651.
- Riekkinen, P. J., H. Soininen, et al. (1987). "Dementia without cholinergic deficit." Gerontology **33**(3-4): 268-272.
- Ringman, J. M., A. Goate, et al. (2014). "Genetic Heterogeneity in Alzheimer Disease and Implications for Treatment Strategies." Current Neurology and Neuroscience Reports **14**(11).
- Risacher, S. L., S. Kim, et al. (2015). "APOE effect on Alzheimer's disease biomarkers in older adults with significant memory concern." Alzheimers & Dementia **11**(12): 1417-1429.
- Rodriguez-Perez, M., A. Abreu-Sanchez, et al. (2017). "Coping strategies and quality of life in caregivers of dependent elderly relatives." Health Qual Life Outcomes **15**(1): 71.
- Rogers, J., L. C. Kirby, et al. (1993). "Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease." Neurology **43**(8): 1609-1611.
- Rohn, T. T. (2013). "The Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2: "TREM-ming" the Inflammatory Component Associated with Alzheimer's Disease." Oxidative Medicine and Cellular Longevity.

- Rossor, M. N., N. C. Fox, et al. (1996). "Clinical features of sporadic and familial Alzheimer's disease." Neurodegeneration **5**(4): 393-397.
- Rovelet-Lecrux, A., D. Hannequin, et al. (2006). "APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy." Nature Genetics **38**(1): 24-26.
- Roychaudhuri, R., M. Yang, et al. (2009). "Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease." Journal of Biological Chemistry **284**(8): 4749-4753.
- Ruberg, M., A. Villageois, et al. (1987). "Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity in the cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative diseases involving cholinergic systems." J Neurol Neurosurg Psychiatry **50**(5): 538-543.
- Ruiz, C. A., S. G. Rossi, et al. (2015). "Rescue and Stabilization of Acetylcholinesterase in Skeletal Muscle by N-terminal Peptides Derived from the Noncatalytic Subunits." Journal of Biological Chemistry **290**(34): 20774-20781.
- Sabbagh, M. and J. Cummings (2011). "Progressive cholinergic decline in Alzheimer's Disease: consideration for treatment with donepezil 23 mg in patients with moderate to severe symptomatology." Bmc Neurology **11**: -.
- Sabri, O., M. N. Sabbagh, et al. (2015). "Florbetaben PET imaging to detect amyloid beta plaques in Alzheimer's disease: phase 3 study." Alzheimers Dement **11**(8): 964-974.
- Sadak, T. I., J. Katon, et al. (2014). "Key neuropsychiatric symptoms in common dementias: prevalence and implications for caregivers, clinicians, and health systems." Res Gerontol Nurs **7**(1): 44-52.
- Saito, T., T. Suemoto, et al. (2011). "Potent amyloidogenicity and pathogenicity of Abeta43." Nature Neuroscience **14**(8): 1023-1032.
- Sakono, M. and T. Zako (2010). "Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers." Febs Journal **277**(6): 1348-1358.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467.
- Santana, I. (1999). Doença de Alois Alzheimer. PhD Thesis, Universidade de Coimbra.
- Santana, I., I. Baldeiras, et al. (2018). "Underlying Biological Processes in Mild Cognitive Impairment: Amyloidosis Versus Neurodegeneration." Journal of Alzheimers Disease.
- Santana, I. and L. Cunha (2005). Demência(s) Manual para Médicos. Coimbra, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
- Santana, I., D. Duro, et al. (2016). "[Mini-Mental State Examination: Screening and Diagnosis of Cognitive Decline, Using New Normative Data]." Acta Med Port **29**(4): 240-248.
- Santana, I., F. Farinha, et al. (2015). "[The Epidemiology of Dementia and Alzheimer Disease in Portugal: Estimations of Prevalence and Treatment-Costs]." Acta Med Port **28**(2): 182-188.
- Sattelle, D. B. and H. Breer (1990). "Cholinergic Nerve-Terminals in the Central-Nervous-System of Insects - Molecular Aspects of Structure, Function and Regulation." Journal of Neuroendocrinology **2**(3): 241-256.
- Scacchi, R., G. Gambina, et al. (2009). "Variability of AChE, BChE, and ChAT genes in the late-onset form of Alzheimer's disease and relationships with response to treatment with Donepezil and Rivastigmine." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **150B**(4): 502-507.
- Schliebs, R. and T. Arendt (2010). "The cholinergic system in aging and neuronal degeneration." Behavioural Brain Research.
- Schroeter, E. H., M. X. G. Ilagan, et al. (2003). "A presenilin dimer at the core of the gamma-secretase enzyme: Insights from parallel analysis of Notch 1 and APP proteolysis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(22): 13075-13080.
- Selkoe, D. J. (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." Physiological Reviews **81**(2): 741-766.

- Selkoe, D. J. (2004). "Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases." *Nat Cell Biol* **6**(11): 1054-1061.
- Serrano-Pozo, A., M. P. Frosch, et al. (2011). "Neuropathological alterations in Alzheimer disease." *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**(1): a006189.
- Seshadri, S., A. L. Fitzpatrick, et al. (2010). "Genome-wide Analysis of Genetic Loci Associated With Alzheimer Disease." *Jama-Journal of the American Medical Association* **303**(18): 1832-1840.
- Shaw, L. M., H. Vanderstichele, et al. (2009). "Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects." *Ann Neurol* **65**(4): 403-413.
- Shcherbatykh, I. and D. O. Carpenter (2007). "The role of metals in the etiology of Alzheimer's disease." *Journal of Alzheimers Disease* **11**(2): 191-205.
- Sherrington, R., E. I. Rogaev, et al. (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." *Nature* **375**(6534): 754-760.
- Shi, Y., K. Yamada, et al. (2017). "ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy." *Nature* **549**(7673): 523-+.
- Shinotoh, H. (2007). "[Imaging of brain acetylcholinesterase activity in dementias and extrapyramidal disorders]." *Rinsho Shinkeigaku* **47**(11): 822-825.
- Simao-Silva, D. P., P. H. Bertolucci, et al. (2013). "Association analysis between K and -116A variants of butyrylcholinesterase and Alzheimer's disease in a Brazilian population." *Chem Biol Interact* **203**(1): 358-360.
- Simões M.R., F. S., Santana I., Firmino H., Martins C., Nasreddine Z., Vilar M. (2008). *Montreal Cognitive Assessment (MoCA): Versão final portuguesa*. Coimbra, Faculdade de Psicologia e de Ciências da Educação, Universidade de Coimbra.
- Singleton, A. B., G. Smith, et al. (1998). "No association between the K variant of the butyrylcholinesterase gene and pathologically confirmed Alzheimer's disease." *Human Molecular Genetics* **7**(5): 937-939.
- Sirvio, J., R. Kutvonen, et al. (1989). "Cholinesterases in the cerebrospinal fluid, plasma, and erythrocytes of patients with Alzheimer's disease." *J Neural Transm* **75**(2): 119-127.
- Sirvio, J. and P. J. Riekkinen (1992). "Brain and cerebrospinal fluid cholinesterases in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and aging. A critical review of clinical and experimental studies." *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* **4**: 337-358.
- Slaets, S., N. Le Bastard, et al. (2013). "Amyloid pathology influences abeta1-42 cerebrospinal fluid levels in dementia with lewy bodies." *Journal of Alzheimers Disease* **35**(1): 137-146.
- Slegers, K., N. Brouwers, et al. (2006). "APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy." *Brain* **129**: 2977-2983.
- Soininen, H., T. Halonen, et al. (1981). "Acetylcholinesterase activities in cerebrospinal fluid of patients with senile dementia of Alzheimer type." *Acta Neurologica Scandinavica* **64**(3): 217-224.
- Soininen, H., M. Lehtovirta, et al. (1995). "Increased acetylcholinesterase activity in the CSF of Alzheimer patients carrying apolipoprotein epsilon4 allele." *Neuroreport* **6**(18): 2518-2520.
- Soreq, H., D. Zevinsonkin, et al. (1985). "A Human Acetylcholinesterase Gene Identified by Homology to the Ace Region of Drosophila." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**(6): 1827-1831.
- Sperling, R. A., P. S. Aisen, 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**(3): 280-292.
- Strittmatter, W. J., A. M. Saunders, et al. (1993). "Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(5): 1977-1981.
- Strong, R., P. Hicks, et al. (1980). "Age-related alterations in the rodent brain cholinergic system and behavior." *Neurobiology of Aging* **1**(1): 59-63.

- Suarez-Gonzalez, A., S. J. Crutch, et al. (2016). "Neuropsychiatric Symptoms in Posterior Cortical Atrophy and Alzheimer Disease." *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* **29**(2): 65-71.
- Suh, G. H., S. H. Ryu, et al. (2011). "Cholinesterase inhibitors for Alzheimer disease: do they provide more than symptomatic benefits?" *Am J Geriatr Psychiatry* **19**(3): 266-273.
- Sultan, A., F. Nessler, et al. (2011). "Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection." *Journal of Biological Chemistry* **286**(6): 4566-4575.
- Sun, L., R. Zhou, et al. (2017). "Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the in vitro production of Aβ42 and Aβ40 peptides by gamma-secretase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**(4): E476-E485.
- Suszkiw, J. B. and G. Pilar (1976). "Selective Localization of a High Affinity Choline Uptake System and Its Role in Ach Formation in Cholinergic Nerve-Terminals." *Journal of Neurochemistry* **26**(6): 1133-1138.
- Swerdlow, R. H., J. M. Burns, et al. (2014). "The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives." *Biochim Biophys Acta* **1842**(8): 1219-1231.
- Swerdlow, R. H. and S. M. Khan (2004). "A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease." *Medical Hypotheses* **63**(1): 8-20.
- Szabados, T., C. Dul, et al. (2004). "A chronic Alzheimer's model evoked by mitochondrial poison sodium azide for pharmacological investigations." *Behavioural Brain Research* **154**(1): 31-40.
- Takeda, A., E. Loveman, et al. (2006). "A systematic review of the clinical effectiveness of donepezil, rivastigmine and galantamine on cognition, quality of life and adverse events in Alzheimer's disease." *Int J Geriatr Psychiatry* **21**(1): 17-28.
- Takeda, M., R. Martinez, et al. (2011). "Pharmacogenomics of Alzheimer's disease." *Asia-Pacific Psychiatry* **3**(1): 10-16.
- Tan, C. C., J. T. Yu, et al. (2014). "Efficacy and safety of donepezil, galantamine, rivastigmine, and memantine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis." *Journal of Alzheimers Disease* **41**(2): 615-631.
- Tanajewski, L., M. Franklin, et al. (2015). "Economic Evaluation of a General Hospital Unit for Older People with Delirium and Dementia (TEAM Randomised Controlled Trial)." *Plos One* **10**(12): e0140662.
- Tariot, P. N., P. R. Solomon, et al. (2000). "A 5-month, randomized, placebo-controlled trial of galantamine in AD. The Galantamine USA-10 Study Group." *Neurology* **54**(12): 2269-2276.
- Tatebe, H., T. Kasai, et al. (2017). "Quantification of plasma phosphorylated tau to use as a biomarker for brain Alzheimer pathology: pilot case-control studies including patients with Alzheimer's disease and down syndrome." *Molecular Neurodegeneration* **12**(1): 63.
- Teipel, S. J., T. Meindl, et al. (2010). "The cholinergic system in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: An in vivo MRI and DTI study." *Hum Brain Mapp.*
- Terry, R. D. (1996). "The pathogenesis of Alzheimer disease: an alternative to the amyloid hypothesis." *J Neuropathol Exp Neurol* **55**(10): 1023-1025.
- Terry, R. D., E. Masliah, et al. (1991). "Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment." *Ann Neurol* **30**(4): 572-580.
- Theunis, C., N. Crespo-Biel, et al. (2013). "Efficacy and safety of a liposome-based vaccine against protein Tau, assessed in tau.P301L mice that model tauopathy." *Plos One* **8**(8): e72301.
- Theuns, J., J. Del-Favero, et al. (2000). "Genetic variability in the regulatory region of presenilin 1 associated with risk for Alzheimer's disease and variable expression." *Human Molecular Genetics* **9**(3): 325-331.
- Tierney, M. C., J. P. Szalai, et al. (2000). "Prediction of probable Alzheimer disease in patients with symptoms suggestive of memory impairment - Value of the mini-mental state examination." *Arch Fam Med* **9**(6): 527-532.

- Tierney, M. C., J. P. Szalai, et al. (1996). "Prediction of probable Alzheimer's disease in memory-impaired patients: A prospective longitudinal study." *Neurology* **46**(3): 661-665.
- Toledano-Gasca, A. (1988). "Hypotheses concerning the aetiology of Alzheimer's disease." *Pharmacopsychiatry* **21 Suppl 1**: 17-25.
- Trinh, N. H., J. Hoblyn, et al. (2003). "Efficacy of cholinesterase inhibitors in the treatment of neuropsychiatric symptoms and functional impairment in Alzheimer disease: a meta-analysis." *JAMA* **289**(2): 210-216.
- Tune, L., S. Gucker, et al. (1985). "Cerebrospinal fluid acetylcholinesterase activity in senile dementia of the Alzheimer type." *Ann Neurol* **17**(1): 46-48.
- Turner, A. J. and K. Tanzawa (1997). "Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX." *FASEB J* **11**(5): 355-364.
- Turro-Garriga, O., L. Calvo-Perxas, et al. (2015). "Pharmaceutical consumption and cost in patients with dementia: A longitudinal study by the Registry of Dementias of Girona (ReDeGi) in Catalonia (Spain)." *Arch Gerontol Geriatr* **60**(3): 448-452.
- Uberti, F., C. Bardelli, et al. (2017). "Stimulation of the Nonneuronal Cholinergic System by Highly Diluted Acetylcholine in Keratinocytes." *Cells Tissues Organs* **203**(4): 215-230.
- Ulrich, J., W. Meier-Ruge, et al. (1990). "Senile plaques: staining for acetylcholinesterase and A4 protein: a comparative study in the hippocampus and entorhinal cortex." *Acta Neuropathol* **80**(6): 624-628.
- Utermann, G., U. Langenbeck, et al. (1980). "Genetics of the apolipoprotein E system in man." *Am J Hum Genet* **32**(3): 339-347.
- Vallee, A. and J. N. Vallee (2017). "Experience for caregivers of dependent elderly persons with dementia." *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil* **15**(2): 138-144.
- Villemagne, V. L., V. Dore, et al. (2017). "Abeta-amyloid and Tau Imaging in Dementia." *Semin Nucl Med* **47**(1): 75-88.
- Vinters, H. V., C. Zarow, et al. (2018). "Review: Vascular dementia: clinicopathologic and genetic considerations." *Neuropathol Appl Neurobiol* **44**(3): 247-266.
- Visser, P. J., F. Verhey, et al. (2009). "Prevalence and prognostic value of CSF markers of Alzheimer's disease pathology in patients with subjective cognitive impairment or mild cognitive impairment in the DESCRIPA study: a prospective cohort study." *Lancet Neurol* **8**(7): 619-627.
- Wallin, A., M. Sjogren, et al. (2003). "Decreased cerebrospinal fluid acetylcholinesterase in patients with subcortical ischemic vascular dementia." *Dement Geriatr Cogn Disord* **16**(4): 200-207.
- Wallon, D., S. Rousseau, et al. (2012). "The French Series of Autosomal Dominant Early Onset Alzheimer's Disease Cases: Mutation Spectrum and Cerebrospinal Fluid Biomarkers." *Journal of Alzheimers Disease* **30**(4): 847-856.
- Wang, C. Y., P. N. Wang, et al. (2017). "UB-311, a novel UBITH((R)) amyloid beta peptide vaccine for mild Alzheimer's disease." *Alzheimers Dement (N Y)* **3**(2): 262-272.
- Wang, J. Z., Y. Y. Xia, et al. (2013). "Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration." *Journal of Alzheimers Disease* **33 Suppl 1**: S123-139.
- Wang, Z., Y. Jiang, et al. (2015). "Butyrylcholinesterase K variant and Alzheimer's disease risk: a meta-analysis." *Med Sci Monit* **21**: 1408-1413.
- Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, et al. (1975). "A protein factor essential for microtubule assembly." *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(5): 1858-1862.
- Wenk, G. L. and L. B. Willard (1998). "The neural mechanisms underlying cholinergic cell death within the basal forebrain." *International Journal of Developmental Neuroscience* **16**(7-8): 729-735.
- Wessler, I., C. J. Kirkpatrick, et al. (1999). "The cholinergic 'pitfall': Acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **26**(3): 198-205.

- Wevers, A. (2011). "Localisation of pre- and postsynaptic cholinergic markers in the human brain." Behavioural Brain Research **221**(2): 341-355.
- Whitehouse, P. J., D. L. Price, et al. (1981). "Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis." Ann Neurol **10**(2): 122-126.
- WHO (1992). International Classification of Diseases. Geneva, World Health Organization.
- WHO (1994). "The Icd-10 Classification of Mental and Behavioral-Disorders - Diagnostic-Criteria-Res." European Journal of Psychiatry **8**(4): 253-253.
- Wiebusch, H., J. Poirier, et al. (1999). "Further evidence for a synergistic association between APOE epsilon4 and BCHE-K in confirmed Alzheimer's disease." Hum Genet **104**(2): 158-163.
- Wimo, A., L. Jonsson, et al. (2013). "The worldwide economic impact of dementia 2010." Alzheimers Dement **9**(1): 1-11 e13.
- Wimo, A., G. Ljunggren, et al. (1997). "Costs of dementia and dementia care: A review." International Journal of Geriatric Psychiatry **12**(8): 841-856.
- Wingo, T. S., J. J. Lah, et al. (2012). "Autosomal recessive causes likely in early-onset Alzheimer disease." Arch Neurol **69**(1): 59-64.
- Wisniewski, T. and F. Goni (2015). "Immunotherapeutic approaches for Alzheimer's disease." Neuron **85**(6): 1162-1176.
- Wright, C. I., C. Guela, et al. (1993). "Protease inhibitors and indoleamines selectively inhibit cholinesterases in the histopathologic structures of Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 683-686.
- Xu, L., J. Zheng, et al. (2016). "How Does Hyperphosphorylation Promote Tau Aggregation and Modulate Filament Structure and Stability?" Acs Chemical Neuroscience **7**(5): 565-575.
- Yamakawa, G. R., P. Basu, et al. (2016). "The cholinergic forebrain arousal system acts directly on the circadian pacemaker." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(47): 13498-13503.
- Yamamoto, Y., S. Nakano, et al. (1990). "Plasma and serum G4 isoenzyme of acetylcholinesterase in patients with Alzheimer-type dementia and vascular dementia." Ann Clin Biochem **27** (Pt 4): 321-326.
- Yamamoto, Y., M. Yasuda, et al. (1999). "Failure to confirm a synergistic effect between the K-variant of the butyrylcholinesterase gene and the epsilon 4 allele of the apolipoprotein gene in Japanese patients with Alzheimer's disease." Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry **67**(1): 94-96.
- Yau, W. W., D. L. Tudorascu, et al. (2015). "Longitudinal assessment of neuroimaging and clinical markers in autosomal dominant Alzheimer's disease: a prospective cohort study." Lancet Neurol **14**(8): 804-813.
- Yoon, H., W. Myung, et al. (2015). "Association of the Choline Acetyltransferase Gene with Responsiveness to Acetylcholinesterase Inhibitors in Alzheimer's Disease." Pharmacopsychiatry **48**(3): 111-117.
- Younkin, S. G. (1998). "The role of A beta 42 in Alzheimer's disease." J Physiol Paris **92**(3-4): 289-292.
- Zhang, H., Q. Ma, et al. (2012). "Proteolytic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein." Journal of Neurochemistry **120** Suppl 1: 9-21.
- Zheng, H. and E. H. Koo (2011). "Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein." Molecular Neurodegeneration **6**(1): 27.
- Zimmerman, G. and H. Soreq (2006). "Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission." Cell and Tissue Research **326**(2): 655-669.