



2010

FACULDADE DE MEDICINA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**Abordagem farmacogenómica na doença de Alzheimer:  
variação genética associada a CYP2D6**

Abordagem farmacogenómica na doença de Alzheimer: variação genética associada a CYP2D6

Patrícia A. G. Martins

Patrícia Andreia Gabriel Martins

2010



# FACULDADE DE MEDICINA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## **Abordagem farmacogenómica na doença de Alzheimer: variação genética associada a CYP2D6**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Medicina Legal e Ciências Forenses, realizada sob a Orientação Científica da Professora Doutora Maria Manuela Monteiro Grazina.

Copyright© 2010. Todos os direitos reservados.

Patrícia Andreia Gabriel Martins

2010

## **Agradecimentos**

Muitas foram as vezes em que duvidei que este trabalho chegaria ao fim, se realmente seria capaz e confesso que cheguei mesmo a pensar em desistir mas como a “morte do homem começa quando ele desiste de aprender” e a “vida é uma constante aprendizagem”, fui aprendendo que as derrotas não nos podem deixar ir abaixo mas sim dar-nos força para continuar a luta.

Uma luta que, felizmente não travei sozinha, e por isso mesmo muitos são aqueles dignos do meu muito obrigado.

À minha orientadora Professora Doutora Maria Manuela Grazina, o meu profundo reconhecimento pela sua capacidade profissional, pelo seu vasto conhecimento científico e acima de tudo por ter acreditado em mim e por me ajudar a desenvolver um projecto de investigação.

Ao Doutor Filipe Miguel Pereira da Silva, com quem muito aprendi, agradeço toda a ajuda, que foi essencial, sem a qual este estudo não se teria realizado.

Aos clínicos que seguiram os doentes dos quais foram retiradas as amostras para realização do estudo, pela colaboração e cedência de dados clínicos, em particular à Sra. Professora Doutora Isabel Santana, responsável da consulta de demências do Serviço de neurologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra.

A toda a equipa do laboratório e aqueles que por lá passaram durante a minha estadia, pelo carinho, apoio e convivência. Agradeço a todos mas de uma forma muito especial à Daniela pelo apoio científico prestado e principalmente à Carolina, pela pessoa que demonstrou ser, sempre disponível para me ajudar, e pelo inestimável apoio não apenas profissional mas sobretudo pessoal.

À Sra. Prof. Doutora Catarina Resende de Oliveira agradeço por ter autorizado a realização do presente trabalho no Instituto da Faculdade de Medicina, de que é Directora.

Ao coordenador do mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses, Sr. Professor Doutor Duarte Nuno Vieira pela forma como a parte curricular do mestrado decorreu e que também contribuiu para que fosse possível a realização do presente estudo.

Aos meus verdadeiros amigos que sempre acreditaram em mim e me deram forças para prosseguir até ao fim desta caminhada. De forma muito especial ao Marcelo, que, com a sua paciência, carinho e compreensão me deu a força de que muitas vezes necessitei.

Aos meus pais que, como sempre foram chave fulcral para o meu sucesso, graças ao seu enorme e incondicional amor, ternura, apoio e incentivo em mais uma etapa da minha vida.

A todos que de alguma forma contribuíram com a sua preciosa ajuda, o meu muito obrigado.

*Patrícia Martins*

*Quando se sonha sozinho, é apenas um sonho.*

*Quando sonhamos juntos, é o começo da realidade.*

*(D. Quixote)*



## Abreviaturas

A $\beta$  - peptídeo amilóide  $\beta$

Ach – acetilcolina

AchE - acetilcolinesterase

ADI - *Alzheimer's Disease International*

APO-E- gene que codifica Apolipoproteína E

APP – *Amyloid Protein Precursor* (Proteína Precursora de amilóide)

APFADA – Associação portuguesa de familiares e amigos de doentes de Alzheimer

CDR - *Clinical Dementia Rating* (Avaliação clínica da demência)

CYP450 – família de proteínas citocromo P450

DA – Doença de Alzheimer

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTPs – Desoxinucleótidos de Trifosfato

EOFAD – *Early-Onset Familial Alzheimer Disease* (Doença de Alzheimer familiar com início precoce)

LOAD- *Late-Onset Alzheimer Disease* (Doença de Alzheimer esporádica de início tardio)

MCI - *Mild Cognitive Impairment* (Défice cognitivo ligeiro)

MMSE - *Mini-mental state examination* (Exame cognitivo mini-mental)

ONU – Organização das Nações Unidas

pb – pares de bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reacção da polimerase em cadeia)

PET - Tomografia por Emissão de Positrões

PS1 e PS2 – proteínas presenilina 1 e 2, respectivamente

*PS1*- gene que codifica a Presenilina 1

*PS2* – gene que codifica a Presenilina 2

RFLP – *Restriction fragment length polymorphism* (Polimorfismos de fragmentos de DNA resultantes da acção de enzimas de restrição)

ROS – *Reactive oxygen species* (Espécies reactivas de oxigénio)

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism* (polimorfismos de nucleótidos simples)

# Índice de Figuras

|  | Página |
|--|--------|
| <b>Figura 1.1</b> - Número de pessoas com demência nos países desenvolvidos e em desenvolvimento                                 | 3      |
| <b>Figura 1.2</b> - Representação da história natural da Demência de Alzheimer   | 4      |
| <b>Figura 1.3</b> - Relação entre as diferentes fases da doença e os sintomas associados   | 6      |
| <b>Figura 1.4</b> - Comparação entre o cérebro de uma pessoa normal e o cérebro de uma pessoa com DA                             | 7      |
| <b>Figura 1.5</b> - A - Esquematização de placas senis; B - Placas senis visualizadas pela técnica de Bielschowsky               | 8      |
| <b>Figura 1.6</b> - Esquema representativo da formação de placas de proteína beta-amilóide                                       | 8      |
| <b>Figura 1.7</b> - Numerosos agregados neurofibrilares no hipocampo (à esquerda) e na amígdala (à direita)                      | 10     |
| <b>Figura 1.8</b> - Diagrama da desintegração dos microtubulos e da agregação da proteína Tau na DA                              | 11     |
| <b>Figura 1.9</b> - Degenerescência Granulovacuolar de Simchowicz  | 11     |
| <b>Figura 1.10</b> - Imagens de cérebros obtidos por PET.  | 12     |
| <b>Figura 1.11</b> - Hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase  | 13     |
| <b>Figura 1.12</b> - Genes envolvidos na DA familiar e na DA esporádica.   | 16     |
| <b>Figura 1.13</b> - Paralelismo entre o desenvolvimento de doenças monogénicas e poligénicas                                    | 18     |
| <b>Figura 1.14</b> - Esquema da estrutura secundária do P450   | 20     |
| <b>Figura 1.15</b> - Esquema de dose e resposta terapêutica baseada no genótipo CYP2D6.  | 24     |
| <b>Figura 2.1</b> - Esquemas representativos dos diferentes passos do método de PCR  | 30     |
| <b>Figura 3.1</b> - Electroferograma de uma amostra heterozigótica CT para o polimorfismo 100C>T                                 | 38     |
| <b>Figura 3.2</b> - Distribuição de frequências genótípicas (A) e alélicas (B) para o polimorfismo 100C>T nos doentes estudados. | 39     |
| <b>Figura 3.3</b> - Distribuição dos genótipos (A) e alelos (B) de acordo com o sexo dos indivíduos                              | 40     |
| <b>Figura 3.4</b> - Distribuição dos genótipos(A) e alelos (B) consoante a história familiar                                     | 41     |
| <b>Figura 3.5</b> - Distribuição dos genótipos (A) e alelos (B) consoante a idade de início da doença                            | 42     |



|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 3.6</b> - Relação da idade de início da doença com os genótipos                                     | 43 |
| <b>Figura 3.7</b> - Distribuição dos genótipos (A) e alelos (B) consoante a presença ou ausência de depressão | 44 |
| <b>Figura 3.8</b> - Distribuição dos genótipos(A) e alelos (B) consoante agressão positiva ou negativa        | 45 |
| <b>Figura 3.9</b> - Distribuição dos genótipos(A) e alelos (B) para MMSE $< 24$ e $\geq 24$                   | 46 |
| <b>Figura 3.10</b> - Relação do MMSE com os genótipos   | 47 |
| <b>Figura 3.11</b> - Distribuição dos genótipos(A) e dos alelos (B) para valores de CDR: 1 e 2 vs 3           | 48 |
| <b>Figura 3.12</b> - Distribuição dos genótipos(A) e dos alelos (B) para valores de CDR: 2 e 3 vs 1           | 49 |
| <b>Figura 3.13</b> - Relação do CDR com os genótipos  | 50 |

## Índice de tabelas

|   | Página |
|---|--------|
| <b>Tabela 2.1</b> - Relação entre a concentração do gel de agarose e o tamanho dos fragmentos que são separados na electroforese. | 32     |
| <b>Tabela 3.1</b> - Distribuição dos indivíduos com DA por genótipos e alelos característicos do polimorfismo 100C>T              | 39     |
| <b>Tabela 3.2</b> - Resultados da análise estatística para o polimorfismo 100C>T  | 51     |
| <b>Tabela 4.1</b> - Frequência do alelo CYP2D6*10 em diferentes populações  | 53     |

# Índice geral

|   | Página |
|---|--------|
| <b>1 Introdução</b>   | 1      |
| 1.1 Doença de Alzheimer - Epidemiologia                                       | 2      |
| 1.2 Doença de Alzheimer – Características clínicas                            | 3      |
| 1.3 Classificação da Doença de Alzheimer                                      | 5      |
| 1.4 Doença de Alzheimer – neuropatologia                                      | 6      |
| 1.5 Os mecanismos envolvidos na Doença de Alzheimer                           | 12     |
| 1.6 Factores genéticos na doença de Alzheimer                                 | 15     |
| 1.7 Metabolização de xenobióticos e citocromo P450                            | 19     |
| 1.7.1 A superfamília CYP450: Nomenclatura                                     | 21     |
| 1.7.2 CYP2D6  | 22     |
| <b>2 Amostras e Metodologia</b>   | 26     |
| 2.1 Selecção e caracterização dos doentes                                     | 27     |
| 2.2 Metodologia   | 27     |
| 2.2.1 Análise do gene CYP2D6  | 27     |
| 2.2.2 Amplificação genética por <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)        | 28     |
| 2.2.3 Estudo do rs1065852 do gene <i>CYP2D6</i>                               | 31     |
| 2.2.4 Electroforese de DNA em gel de Agarose                                  | 31     |
| 2.2.4.1 Electroforese para visualização dos fragmentos das amostras em estudo | 33     |
| 2.2.5 Registo imagiológico dos resultados                                     | 33     |
| 2.2.6 Purificação de produtos de PCR  | 33     |
| 2.2.7 PCR de sequenciação   | 34     |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 2.2.8    | Sequenciação automática                                    | 34 |
| 2.2.9    | Análise por RFLP   | 35 |
| 2.2.9.1  | Abordagem por RFLP aplicado ao polimorfismo em estudo      | 35 |
| 2.3      | Análise Estatística  | 36 |
| <b>3</b> | <b>Resultados</b>  | 37 |
| 3.1      | Resultados da sequenciação automática                      | 38 |
| 3.2      | Frequências alélicas para o SNP rs1065852                  | 38 |
| 3.2.1    | Género   | 40 |
| 3.2.2    | História Familiar  | 41 |
| 3.2.3    | Idade de início  | 42 |
| 3.2.4    | Depressão  | 44 |
| 3.2.5    | Agressão   | 45 |
| 3.2.6    | MMSE   | 46 |
| 3.2.7    | CDR  | 48 |
| 3.3      | Análise estatística  | 51 |
| <b>4</b> | <b>Discussão de resultados</b>                             | 52 |
| 4.1      | Amostragem de estudo e frequências alélicas                | 53 |
| 4.2      | Actividade metabólica de CYP2D6 – o polimorfismo em estudo | 54 |
| <b>5</b> | <b>Conclusões finais</b>                                   | 57 |
| <b>6</b> | <b>Referências bibliográficas</b>                          | 59 |

## **Objectivos**

Com o presente projecto pretende-se compreender de que modo um polimorfismo do gene *CYP2D6* pode influenciar as diferentes características apresentadas por um grupo de doentes com diagnóstico provável de Doença de Alzheimer (DA).

Como objectivo maior ambicionamos reforçar a importância farmacogenómica na DA, com dados científicos, tendo em conta que cada doente apesar de sofrer da mesma doença, é único no seu genótipo e as variantes genéticas associadas à metabolização de xenobióticos têm uma contribuição importante. Adicionalmente, estes dados poderão estar na base da aplicação de terapêuticas ajustadas a subgrupos genéticos, de forma a maximizar a sua eficácia.

## Sumário

A DA é o tipo de demência mais comum no idoso, sendo a terceira causa de mortalidade nesta faixa etária nos países desenvolvidos. É uma doença degenerativa que se vai instalando de forma insidiosa, causando um declínio gradual das funções cognitivas e psicomotoras, ligadas à percepção, à aprendizagem, à memória e ao raciocínio.

A *CYP2D6* é uma enzima pertencente à família das proteínas citocromo P450 sendo responsável pelo metabolismo de vários xenobióticos, incluindo fármacos como neurolépticos, antidepressivos, inibidores da recaptação selectiva de serotonina e  $\beta$ -bloqueadores. Geralmente, a maioria dos fármacos são metabolizados extensivamente. No entanto, cerca de 5 a 10% dos Caucasianos e 1 a 4% dos indivíduos da maioria dos grupos étnicos são considerados metabolizadores lentos com uma actividade enzimática reduzida, e, por esse motivo, correm o risco de sofrer intoxicação. Por outro lado, 1 a 7% dos Caucasianos e cerca de 20% da população do leste europeu são, por sua vez, metabolizadores ultra-rápidos, não atingindo por isso a concentração terapêutica da substância no plasma, sob o mesmo tratamento, não se obtendo desta forma o efeito desejado. Sabe-se hoje em dia que estes diferentes padrões de metabolização estão relacionados com polimorfismos nos genes *CYP2D6*. Por outro lado, foram descritos vários estudos que demonstram a influência destas variantes nas características de algumas patologias, como a esquizofrenia. Nesse sentido, e dada a heterogeneidade verificada nos doentes de Alzheimer, pretende-se com este trabalho testar se existe associação entre um polimorfismo (rs1065852) do gene *CYP2D6* que influencia o padrão de metabolização, numa população de doentes com DA, e as características clínicas.

Com esse objectivo, realizou-se o estudo genético por sequenciação e RFLP de 51 doentes diagnóstico provável de DA seguidos na consulta de demências dos Hospitais da Universidade de Coimbra.

Os nossos resultados mostraram que, apesar de se tratar de um estudo preliminar, o polimorfismo apresenta uma associação positiva com a idade de início da doença. Indivíduos portadores da variante associada a um padrão de metabolização mais lento apresentam a doença mais tardiamente.

### Palavras-chave

Farmacogenómica; Alzheimer; *CYP2D6*; Polimorfismo; rs1065852

# **1. Introdução**

## 1.1 Doença de Alzheimer - Epidemiologia

As situações de demência têm vindo a merecer grande atenção nos últimos tempos e são hoje em dia uma preocupação crescente de todos os profissionais de saúde. A incidência e prevalência destas situações têm vindo a aumentar, em grande parte devido a demências de causa degenerativa, constituindo uma carga social importante.

As demências constituem síndromes clínicas cuja principal característica é o aparecimento de um défice nas capacidades cognitivas e emocionais adquiridas, de tal modo grave ao ponto de interferir na vida diária dos seus portadores, levando a uma desintegração da personalidade. Esta situação tem grande impacto, não apenas na sua vida social e ocupacional, mas também na dos seus familiares. Ocorrem em todas as idades, embora incidam de forma crescente com o aumento da idade.

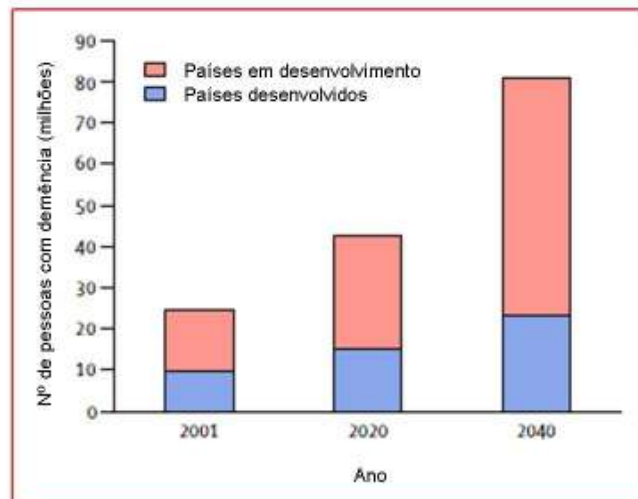
De acordo com o relatório divulgado pela Organização das Nações Unidas (ONU), em 2009, a população mundial era de 6 829 milhões. Actualmente, existem cerca de 759 milhões de idosos no mundo, o que, tendo em conta a população mundial, significa que, 1 em cada 9 pessoas tem idade igual ou superior a 60 anos (ONU, 2009).

Segundo a associação portuguesa de Psicogerontologia, o envelhecimento da população mundial vai aumentar de forma acentuada nos próximos vinte anos: “A nível mundial, a proporção de pessoas com mais de 60 anos vai triplicar durante este século, passando de 10% no ano 2000 para 32% em 2100. Na Europa Ocidental, quase metade da população (46%) terá mais de 60 anos no final do século, enquanto na China este grupo etário, que actualmente representa cerca de 10% da população, vai atingir os 42% no mesmo período” (<http://www.app.com.pt/envelhecimento-da-populacao-mundial-atinge-pico-em-2030>).

Através da análise dos números apresentados, é visível o problema planetário com que nos deparamos. A organização *Alzheimer's Disease International* (ADI) estima que actualmente existam 30 milhões de pessoas com demência no mundo, com 4,6 milhões de novos casos por dia (1 caso a cada 7 segundos).

Um estudo de revisão sobre a prevalência de demência em todas as regiões do mundo (Ferri et al., 2005) estima que o número de pessoas com demência duplica a cada 20 anos prevendo-se que haja 42 milhões de casos em 2020 e 81 milhões em 2040, (**Figura 1.1**) assumindo que não ocorrem alterações na mortalidade, na prevenção efectiva e nas estratégias terapêuticas.





**Figura 1.1-** Número de pessoas com demência nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (Adaptado de Ferri et al., 2005).

Em Portugal segundo dados da Associação *Alzheimer Europe*, o número de pessoas com demência ultrapassará os 153 mil. Considerando a contribuição de 50% - 60% da doença de Alzheimer nas demências no seu todo (Fratiglioni et al., 1991), estaríamos a considerar a existência de 64 mil pessoas; no entanto o número de doentes com a DA ultrapassa esse número rondando os 90 mil ([www.alzheimerportugal.org](http://www.alzheimerportugal.org)).

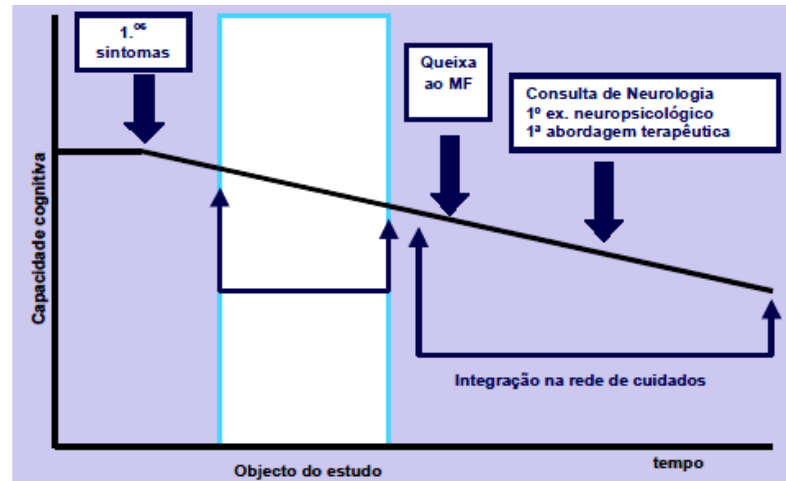
Quando o psiquiatra alemão Alois Alzheimer apresentou uma publicação que tinha como tema as características clínicas e patológicas que observara numa doente e cujo título citava: ‘*On a peculiar disease process of the cerebral cortex*’ (Alzheimer, 1907), referindo-se à patologia que posteriormente passou a ser designada por Doença de Alzheimer, certamente não imaginava a importância científica, económica e social que esta viria a ter nos nossos dias e provavelmente num futuro próximo.

## 1.2 Doença de Alzheimer – Características clínicas

Apesar da apresentação clínica da demência ser variável, dependendo da sua etiologia, os critérios para o diagnóstico são relativamente constantes.

O curso natural da DA está estabelecido e é conhecido (**Figura 1.2**). No entanto, as fases do processo não são lineares, uma vez que alguns quadros com défices

cognitivos ligeiros em fases iniciais da demência nem sempre são percebidos pela sociedade sendo frequentemente sub-diagnosticados no sistema de saúde (Cruz et al., 2004).



**Figura 1.2-** Representação da história natural da Demência de Alzheimer (Adaptado de Cruz et al., 2004).

Numa fase inicial, os sintomas são menos graves (fase “invisível” ou “silenciosa”) e é frequente haver períodos de incerteza e ansiedade, não só no doente, como também nos familiares (Wimo et al., 1999). A sua identificação é influenciada por vários factores relacionados com a etnia, cultura, religião, crenças sociais e educação. O reconhecimento da demência nas suas fases iniciais é um processo complexo e difícil para a família e até mesmo para os profissionais de saúde.

Mais tarde, com a progressão da demência para uma fase moderada ou severa existe uma deterioração da memória a longo prazo. O doente começa a sentir-se incapaz de recordar coisas tão simples como os nomes das pessoas que lhe são mais próximas, por exemplo, filhos. Nesta fase há também alterações frequentes de humor, do sentido de orientação e da coordenação motora, o que pode levar a quedas ou acidentes mais ou menos graves (Wimo et al., 1999). O diagnóstico torna-se então mais claro devido à evidência de perturbação do comportamento.

A escassez de dados que permitam um diagnóstico mais precoce reflecte-se de forma inevitável na detecção dos sintomas, retardando o diagnóstico e, conseqüentemente, a intervenção médica e prestação de cuidados de saúde, o que vai ter uma repercussão forte e negativa na qualidade de vida do doente e dos seus familiares.

### 1.3 Classificação da Doença de Alzheimer

Tendo em conta os sintomas manifestados pelo doente, a DA pode ser classificada em três fases:

**I- Ligeira:** nesta fase, os doentes apresentam mudanças de comportamento ligeiras, tais como uma tendência para a letargia e a perda de espontaneidade de reacção a estímulos, no entanto, estas tendem a passar despercebidas aos familiares mais próximos. Esta fase da doença foi também designada por MCI (*Mild Cognitive Impairment* - défice cognitivo ligeiro), mas nem todos os casos evoluem para DA. Nesta fase, não são observados os critérios compatíveis com demência.

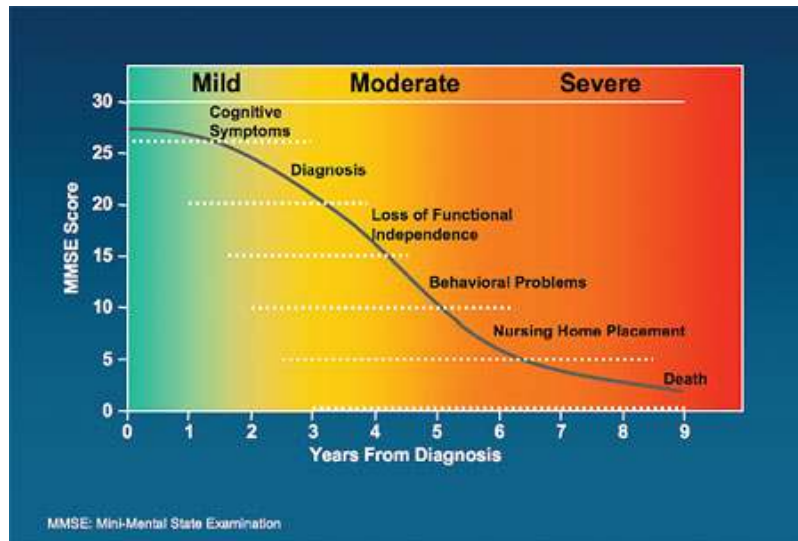
**II- Moderada:** durante esta fase da doença, o doente continua a ser capaz de realizar diversas tarefas de uma forma independente, como fazer a sua higiene diária, no entanto necessita de auxílio para outras tarefas mais complexas, como fazer compras ou gerir o dinheiro.

**III- Grave:** assim que começa a aproximar-se o último estadió da DA, o doente deixa de ser capaz de realizar as tarefas diárias mais simples sem supervisão. A linguagem torna-se desorganizada e pode ocorrer perda da capacidade linguística. Eventualmente, pode ocorrer a perda de outras capacidades, como a marcha e a deglutição, podendo levar à morte do indivíduo.

Para avaliar e classificar o estado cognitivo, podem usar-se vários testes, tais como o *Clinical Dementia Rating (CDR)* ou o *Mini-Mental State Examination (MMSE)*. Ambos incidem sobre vários domínios como a aritmética, memória, orientação, uso da linguagem e a sua compreensão. No entanto, os testes têm diferentes pontuações. No CDR, “0” é uma pontuação considerada normal, enquanto “1”, “2” e “3” são sinónimo de demência ligeira, moderada ou grave, respectivamente. No MMSE, implementado em 1975 por Folstein, qualquer pontuação acima de 24 é considerada normal, mas o valor é ajustado consoante a idade e o grau de escolaridade. Pontuações baixas ou muito baixas podem estar intimamente associadas a demência. Contudo, a presença de outras doenças mentais pode levar a pontuações anormais (Folstein et al., 1975).

À medida que a doença prossegue, os sintomas vão-se acentuando (podendo surgir outros sintomas) e o doente apresenta alterações cognitivas, que se traduzem por uma diminuição no MMSE. Quando a progressão da doença é tal que o doente já se encontra

no último estágio, os níveis de MMSE são muito baixos (**Figura 1.3**) (Feldman & Gracon, 1996).



**Figura 1.3** - Relação entre as diferentes fases da doença e os sintomas associados (Adaptado de Feldman & Gracon, 1996).

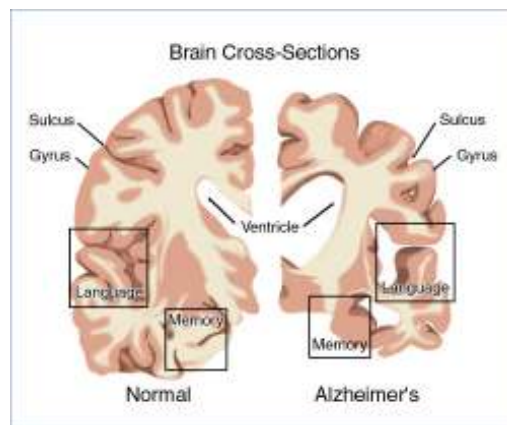
## 1.4 Doença de Alzheimer - neuropatologia

A DA é uma doença neurológica progressiva e neurodegenerativa, que se caracteriza pela perda gradual de neurónios em regiões específicas do cérebro. Os mecanismos subjacentes a este acontecimento ainda não estão completamente esclarecidos.

Como consequência dessa perda, a função cerebral é prejudicada logo numa fase inicial da doença, devido à ocorrência de disfunção sináptica, levando a perda de memória e, progressivamente de outras funções cognitivas (Walsh & Selkoe, 2004), acabando por determinar, numa fase posterior, a completa ausência de autonomia dos doentes, levando à morte em relativamente poucos anos após o diagnóstico, sendo variável.

A autópsia assume um papel fundamental pois é, hoje em dia, o único meio de obter um diagnóstico definitivo. Porém, um olhar superficial ao cérebro de um doente com DA não revela alterações que possam ser tidas em conta no diagnóstico pois podem estar relacionadas com o avanço da idade. No entanto, pode observar-se uma

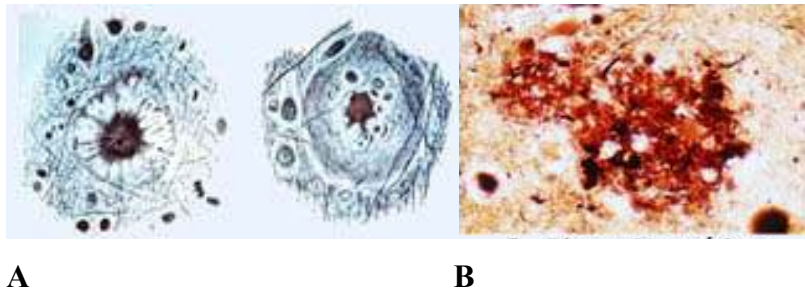
atrofia difusa e significativa do cérebro, no hipocampo, associada a uma dilatação selectiva do corno temporal adjacente do ventrículo lateral, que afecta essencialmente as funções da memória e da linguagem (**Figura 1.4**). Pode ser relevante sugerir ao neuropatologista que procure evidências microscópicas pós-mortem, essenciais no diagnóstico da DA. Deste modo, um exame histológico será fundamental para que os achados não sejam confundidos com a diminuição da função cognitiva que alguns idosos apresentam apesar de não sofrerem de DA (Perl, 2010).



**Figura 1.4** - Comparação entre o cérebro de uma pessoa normal e o cérebro de uma pessoa com AD. (Adaptado de: <http://www.ahaf.org/alzdis/about/BrainAlzheimer.htm>).

Entre os achados microscópicos mais característicos podem referir-se essencialmente dois de grande interesse: as placas senis e as tranças neurofibrilares.

As placas senis, são alterações essencialmente extracelulares de natureza proteica. Consistem em agregados de peptídeos amilóide  $\beta$  ( $A\beta$ ) (Master et al., 1985). Em cérebros saudáveis, esses agregados de proteínas são quebrados e eliminados. No entanto, em cérebros com DA esses fragmentos vão-se acumulando formando placas duras e insolúveis. Têm um aspecto esférico, medem cerca de 0,2 mm de diâmetro (**Figura 1.5 A**) e no centro há uma densa acumulação de  $\beta$  amilóide, rodeada por um anel constituído por processos neuronais anormais.



**Figura 1.5 - A -** Esquemática de placas senis

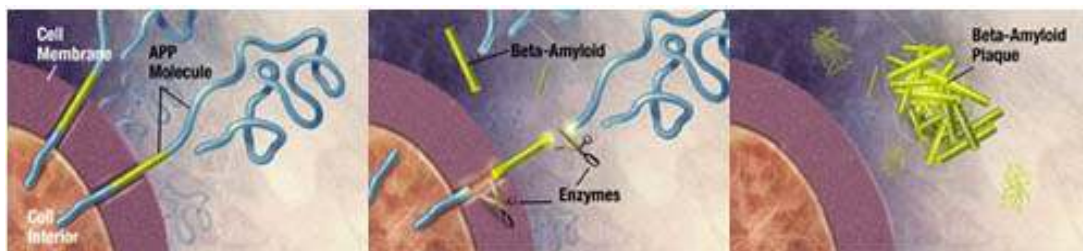
**B -** Placas senis visualizadas pela técnica de Bielschowsky

(Adaptado de: [http://www.alzheimermed.com.br/m3.asp?cod\\_pagina=1014](http://www.alzheimermed.com.br/m3.asp?cod_pagina=1014)).

Na periferia das placas senis, é frequente encontrar células da microglia e, menos frequentemente, astrócitos reativos. Permanece ainda em debate se estas células da microglia estarão envolvidas numa cascata patogénica neuroinflamatória ou se são apenas consequência da presença dos constituintes desta lesão (Perl, 2010).

Estas placas podem ser visualizadas pela técnica de Bielschowsky - impregnação por nitrato de Prata / 20% (**Figura 1.5 B**).

As placas senis encontram-se predominantemente no córtex cerebral. A análise bioquímica mostrou que a  $A\beta$  é derivada da proteína precursora da amilóide (APP) por processamento pós-tradução. A APP é uma glicoproteína trans-membranar altamente conservada que contém o peptídeo  $A\beta$ , e que sofre clivagem proteolítica pelas  $\alpha$ - e  $\lambda$ -secretases ou  $\beta$ - secretase (Mattson, 1997). De acordo com a hipótese amilóide, tem vindo a ser sugerido que esta acumulação de  $A\beta$  (**Figura 1.6**) é resultado de uma desregulação nas vias de produção/processamento o que leva à neurodegenerescência (Hardy & Selkoe, 2002).



**Figura 1.6 -** Esquema representativo da formação de placas de proteína beta-amilóide

(Adaptado de: [http://www.alzheimermed.com.br/m3.asp?cod\\_pagina=1014](http://www.alzheimermed.com.br/m3.asp?cod_pagina=1014)).

A proteína A $\beta$  é constituída por 28 aminoácidos do domínio externo e por 11 a 14 aminoácidos do domínio transmembranar adjacente. Como foi já referido, a APP pode ser processada de duas formas. A ordem pela qual as proteases quebram a APP determina se o peptídeo  $\beta$ -amilóide será ou não formado. Na primeira via de processamento pela  $\gamma$ -secretase, a proteína, após maturação no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, segue para a membrana plasmática, sofre clivagem no resíduo 16, libertando a grande porção hidrofílica do terminal amínico do precursor para o meio intracelular; dentro da célula é retido 1 fragmento com 10 kDa e não se forma A $\beta$  (Schenk et al., 1999).

Já na via da  $\beta$ -secretase, há clivagem proteolítica do terminal amínico da APP, obtendo-se 1 fragmento no qual o terminal carboxílico tem o domínio intacto de A $\beta$ . A  $\beta$ -secretase faz de seguida um corte proteolítico adicional no terminal carboxílico da A $\beta$  promovendo o aparecimento, acumulação e deposição da A $\beta$ . Podem existir várias enzimas  $\gamma$ -secretase com diferentes graus de selectividade para a produção de A $\beta_{40}$  ou A $\beta_{42}$ . A formação de uma ou de outra forma de A $\beta$  parece sofrer influência de duas outras proteínas associadas à membrana: as presenilinas 1 e 2 (PS1 e PS2). A forma A $\beta_{42}$  é a que parece contribuir mais para o desenvolvimento da DA (Kim et al., 2010; Selkoe, 2004).

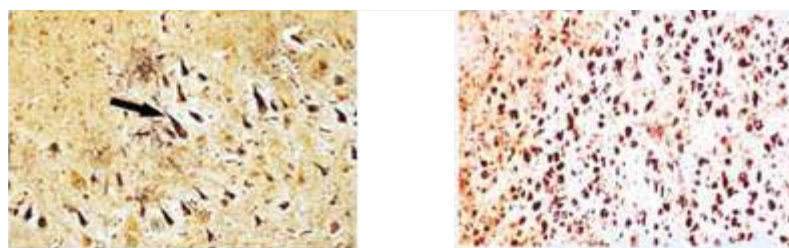
A porção exacta da APP que confere patogenicidade a DA ainda não está clara, porque tanto a forma fibrilar da APP encontrada em placas amilóides como os oligómeros de APP parecem ser a causa da neurodegenerescência *in vivo* e *in vitro*. A elucidação das vias moleculares responsáveis pela formação de A $\beta$  e, especialmente da APP, é essencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que visam baixar os níveis de APP na AD (Verdile et al., 2004), embora já existam inúmeros estudos que demonstram alguns dos mecanismos envolvidos na toxicidade de A $\beta$ . Fármacos que possuem como alvo a actividade da  $\gamma$ -secretase evidenciam um decréscimo na produção da A $\beta$ . No entanto, o bloqueio da actividade da  $\gamma$ -secretase também está associado com uma variedade de efeitos colaterais que limitam o seu uso terapêutico (Kim et al., 2010; Selkoe, 2004).

A acumulação de A $\beta$  depende do balanço entre a sua formação e a sua eliminação. A A $\beta$  solúvel pode ser removida do cérebro, por exemplo através de degradação enzimática ou por um receptor que medeia a sua eliminação.

A deposição de A $\beta$  na forma de placas de amilóide pode activar a microglia e os astrócitos iniciando um processo inflamatório. As células da glia activas libertam

factores neurotóxicos como citocinas, factores de complemento, proteínas que intervêm na fase aguda, prostoglandinas e espécies reactivas de oxigénio (ROS) e nitrogénio. Os neurónios danificados podem libertar ainda factores pro-inflamatórios que levam à activação da glia e a sua proliferação. Inicia-se então um ciclo vicioso que desencadeia um processo neuroinflamatório crónico (Pascale et al., 2004). Alguns investigadores acreditam que este depósito de amilóide é tóxico para os neurónios adjacentes, enquanto outros admitem que esse depósito resulta de um efeito secundário resultante da morte neuronal. O número de placas por campo microscópio está relacionado com o grau de perda intelectual. Ainda que alguns autores defendam a teoria de que as placas senis possam ser encontradas em cérebros de pessoas idosas saudáveis como resultado do processo natural do envelhecimento é possível que, quantitativamente, estas representem a fase assintomática da DA.

Outros dos achados importantes em doentes com DA são os agregados neurofibrilares. Foram descritos originalmente por Alois Alzheimer na sua doente August D. o que deu origem e base neuropatológica para a doença de Alzheimer (Alzheimer, 1907). Estes agregados resultam de alterações intracelulares, no citoplasma dos neurónios, e encontram-se geralmente no córtex cerebral, sendo normalmente bastante numerosos e comuns nas estruturas do lobo temporal como o hipocampo e amígdala (**Figura 1.7**). Nos neurónios piramidais do córtex cerebral apresentam-se frequentemente sob a forma de “chama de vela” enquanto que, nos outros neurónios têm forma oval ou esférica.

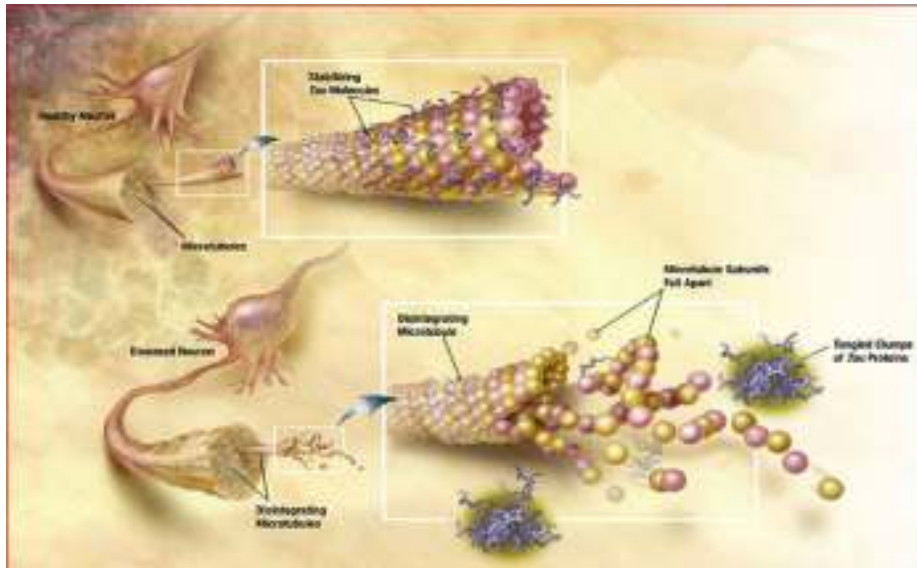


**Figura 1.7** - Numerosos agregados neurofibrilares no hipocampo (à esquerda) e na amígdala (à direita) (Adaptado de: [http://www.alzheimermed.com.br/m3.asp?cod\\_pagina=1014](http://www.alzheimermed.com.br/m3.asp?cod_pagina=1014)).

Os agregados neurofibrilares são formados essencialmente pela proteína *tau*, cuja função é estabilizar os microtúbulos dos axónios, estruturas responsáveis pela formação e manutenção dos contactos interneuronais. Estas funções ficam modificadas quando ocorre alteração da proteína *tau* pela adição anormal de fosfato por fosforilação (**Figura**

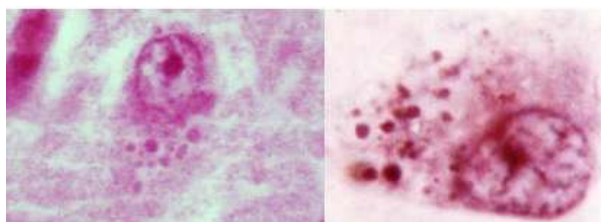


1.8). A proteína *tau* hiperfosforilada é, deste modo, o componente básico dos agregados neurofibrilhares.



**Figura 1.8** - Diagrama da desintegração dos microtubulos e da agregação da proteína *tau* na DA (Adaptado de: <http://www.nia.nih.gov/Alzheimers/> - ADEAR: "Alzheimer's Disease Education and Referral Centre, a service of the National Institute on Aging.").

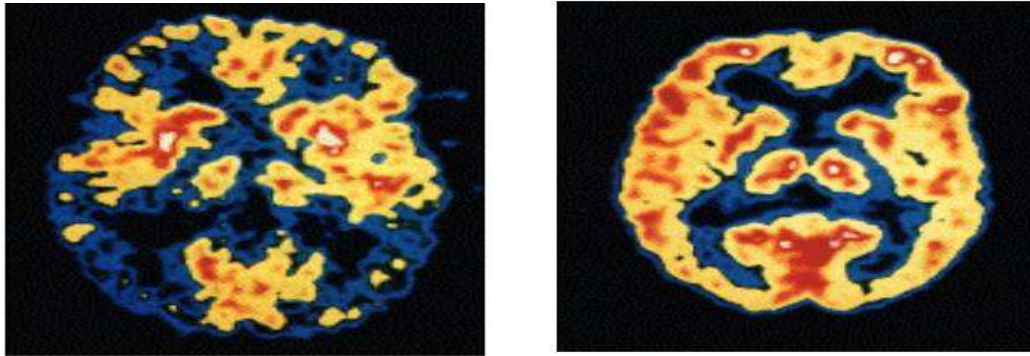
Para além das características referidas podem também estar presentes os “Corpos de Hirano” e a “Degenerescência Granulovacuolar de Simchowicz” (**Figura 1.9**) principalmente no hipocampo.



**Figura 1.9** - Degenerescência Granulovacuolar de Simchowicz (Adaptado de [http://www.Alzheimermed.com.br/m3.asp?cod\\_pagina=1014](http://www.Alzheimermed.com.br/m3.asp?cod_pagina=1014)).

Também o peso do cérebro, inferior a 1Kg, pode ser, em alguns casos, indicador da doença. Estes achados são observados na biópsia de doentes com DA, cujo diagnóstico apenas pode ser efectuado *post-mortem*, aquando da autópsia. No entanto, para o diagnóstico de DA são avaliadas as alterações anatómicas, cognitivas e histológicas. Uma avaliação anatomofisiológica pode ser realizada por meio de exame

neuroimagiológicos, estruturais e funcionais. São obtidas imagens estruturais por meio de Tomografia Computadorizada, Tomografia por Emissão de Positrões (PET) (**Figura 1.10**) ou Ressonância Magnética, sendo esta última de maior precisão.



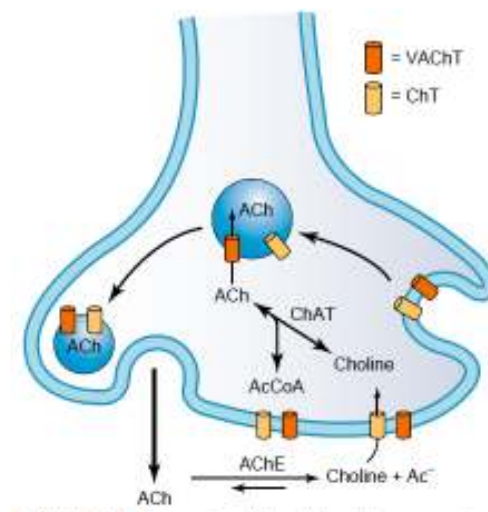
**Figura 1.10** – Imagens de cérebros obtidos por PET. São visíveis as diferenças de actividade entre um cérebro com AD (à esquerda) e um cérebro normal (à direita). O azul e o preto correspondem as áreas inactivas (Adaptado de Perry et al., 2005).

## 1.5 Os mecanismos envolvidos na doença de Alzheimer

Os mecanismos exactos que estão na base da patogenicidade da DA ainda não se encontram perfeitamente definidos; no entanto, várias hipóteses têm sido apontadas como as mais prováveis para explicar as alterações patológicas observadas (Pereira et al., 2005).

Uma das hipóteses mais estudada está relacionada com os neurónios colinérgicos. Pesquisas efectuadas demonstram que os défices cognitivos relacionados com a doença estão principalmente relacionados com a degenerescência de neurónios colinérgicos no córtex e no hipocampo, resultando em alteração da transmissão colinérgica. Esta perda é responsável pelos sintomas clássicos da doença, como a perda de memória, declínio cognitivo e redução nas capacidades de aprendizagem. Hoje em dia, sabe-se que a acetilcolina (ACh), neurotransmissor que intervém nos processos da memória, sofre uma redução no cérebro de doentes com DA. Sendo a acetilcolinesterase

(AChE) a responsável pela hidrólise da Ach, as primeiras estratégias de tratamento para a DA usaram a sua inibição como alvo terapêutico (**Figura 1.11**).



**Figura 1.11** - Hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase (Adaptado de Siegel, 2006).

Legenda: ACh – acetilcolina; AchE – Acetilcolinesterase; ChT – Proteína transportadora de Colina; ChAT – Colina acetil transferase; VAcHT – Vesícula transportadora de acetilcolina.

Várias evidências mostraram que inibidores da AchE podem ser usados no tratamento e interferir na progressão da doença através da reposição da função colinérgica já que permite elevar os níveis de Ach na fenda sináptica, o que leva a uma melhoria nos sintomas em alguns doentes, no entanto não leva à cura e não altera o resultado final da doença (Hardy, 2002).

Das teorias mais recentes podem referir-se as baseadas nos efeitos da agregação e degradação das proteínas *tau* e  $A\beta$ .

No que diz respeito à proteína *tau*, a sua agregação e hiperfosforilação ocorre em diversas doenças neurodegenerativas, das quais a DA não é exceção, afectando a estabilidade dos microtubulos e sua polimerização devido a alterações conformacionais (Iqbal et al., 2005). A *tau* hiperfosforilada forma agregados que comprometem o transporte axonal e levam à neurotoxicidade, que é uma das causas principais da patologia e dos sintomas observados nas doenças neurodegenerativas (Parihar, 2004).

Relativamente à proteína  $A\beta$ , pensa-se que será uma molécula chave na patogénese da DA e levou a formulação da hipótese da cascata amilóide. O excesso de produção da  $A\beta$  leva a formação de agregados, já referidos anteriormente, que levam à

neurodegenerescência e em último caso, podem desencadear uma série de eventos que podem levar à demência (Verdile et al., 2004).

Outros dos sistemas mais amplamente estudados afectados na DA, estão envolvidos com a disfunção mitocondrial e stresse oxidativo (Grazina et al., 2006). Tem vindo a ser demonstrado que a degenerescência mitocondrial ocorre numa fase precoce da doença (Hirai et al., 2001). Além disso, enzimas chave no metabolismo energético da mitocôndria, especialmente as citocromo C oxidases (Castellani et al., 2002) têm demonstrado ser fortemente afectadas na DA (Blass, 2001; Eckert et al., 2003).

Diversos estudos publicados referem a existência de uma relação sinérgica entre o processamento proteolítico de A $\beta$  e o prejuízo no metabolismo energético (Pereira et al., 2005).

O mecanismo pelo qual a A $\beta$  induz uma disfunção mitocondrial parece envolver a produção de ROS, destacando o facto de a maioria dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial ser sensível quer à A $\beta$ , quer às ROS (Arias et al., 2002; Cardoso et al., 2004).

Devido ao facto de a mitocôndria ser o local onde a produção de radicais livres é maior nas células, elas são o alvo principal de danos oxidativos e consequente disfunção (Sullivan & Brown, 2005). Desta forma, anomalias no DNA mitocondrial podem ser a causa principal na produção de ROS na DA (Migliore et al., 2005) devido a erros no funcionamento das subunidades da cadeia respiratória (Grazina et al., 2006).

O stresse oxidativo pode estar directamente envolvido no processamento anormal da APP. Foi demonstrado, num estudo com ratinhos transgénicos, que a acumulação de A $\beta$  é maior em cérebros em estado oxidativo (Apelt et al., 2004). Além disso, os peptídeos A $\beta$  têm surgido como fonte de stresse oxidativo na DA (Pereira et al., 2005), e tem vindo a ser demonstrado que a A $\beta$  inibe a actividade da cadeia respiratória mitocondrial e induz um aumento na produção de ROS (Mark et al., 1997; Casley et al., 2002).

Num estudo publicado em 2005, Praticò propôs duas hipóteses possíveis para o envolvimento do stresse oxidativo na DA. A primeira refere que a degenerescência neuronal é consequência de uma resposta ao stresse oxidativo nas placas senis e nas tranças neurofibrilares e não apenas a causa destas lesões. Já na segunda é sugerido que o stresse oxidativo é um evento precoce responsável pelo desencadeamento da formação de placas senis e tranças neurofibrilares, o que desencadeia mais reacções oxidativas que levam a um processo de auto-destruição.

No entanto, a questão de que o stresse oxidativo é um componente precoce da DA ou uma etapa final comum no processo neurodegenerativo não está claro (Grazina et al., 2006).

Outras vias que podem estar envolvidas na DA incluem também iões metálicos e alterações de homeostase do cálcio. Foi demonstrado que o ferro, o cobre e o zinco têm a capacidade para ligar A $\beta$  acelerando a sua agregação e aumentando a toxicidade, possivelmente pelo aumento do stresse oxidativo (Castellani et al., 2004; Mattson 2004a, 2004b; Moreira et al., 2000; Rogers & Lahiri, 2004).

A acumulação de metais activos com capacidade redox, como o ferro e o cobre, pode contribuir para a formação de ROS, responsáveis pelo stresse oxidativo observado na DA (Pereira et al., 2005).

Acredita-se que uma alteração na homeostase do Cálcio desempenha um papel importante na disfunção e neurodegenerescência que ocorre na DA (LaFerla, 2002; Mattson & Chan, 2003).

Apesar dos mecanismos envolvidos na DA não estarem completamente esclarecidos, é consensual que se trata de uma doença multifactorial, complexa, com uma componente genética relevante.

## **1.6 Factores genéticos na doença de Alzheimer**

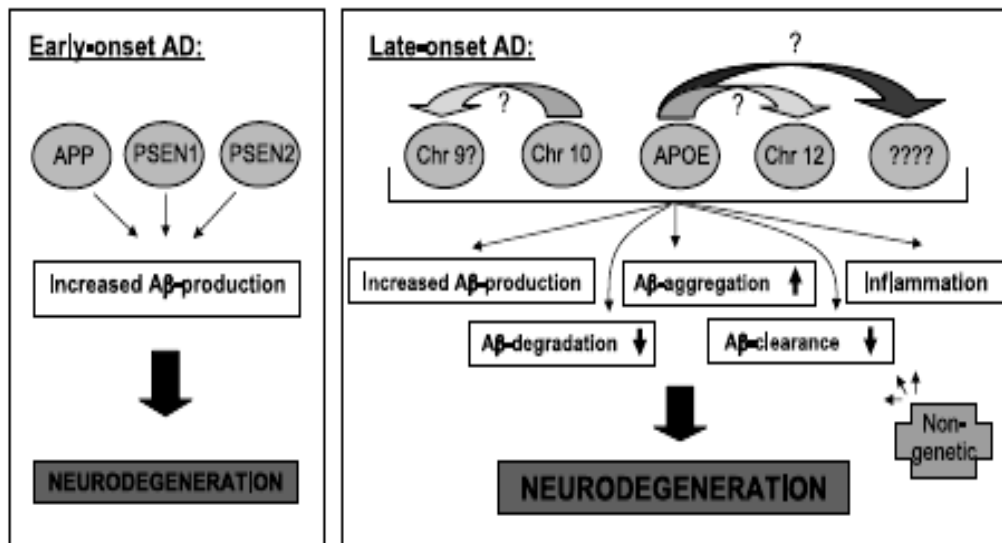
Apesar da DA surgir mais frequentemente em idades mais avançadas, existem também formas precoces da doença, que aparecem maioritariamente antes dos 55 anos de idade, habitualmente com hereditariedade autossómica dominante.

Assim sendo, a DA pode classificar-se em duas formas principais:

1 - Familiar, geralmente com início precoce (EOFAD), representando cerca de 5-10% dos casos de Alzheimer e é causada por anomalias genéticas em pelo menos três genes (*APP*, *PS1* e *PS2*).

2 - Esporádica, mais frequentemente de início tardio (LOAD). Representa a maior parte dos casos (90-95%). Apesar dos inúmeros esforços que têm sido desenvolvidos para identificar a causa genética da LOAD, até à data, há apenas um

único gene (*APOE*) para o qual foi demonstrado que há uma variante genética que aumenta o risco de desenvolver LOAD (Bertram et al., 2002) (**Figura 1.12**).



**Figura 1.12** - Genes envolvidos na DA familiar e na DA esporádica. À esquerda a EOFAD, demonstra que alterações nos genes da *APP*, *PSEN1* e *PSEN2* levam ao aumento da produção de Aβ que leva a neurodegenerescência e consequentemente a DA. À direita, a LOAD, em que a interacção entre os diversos genes e a influência de factores não-genéticos leva a activação de diversos mecanismos patogénicos que conduzem a neurodegenerescência (Adaptado de Bertram et al., 2002).

As mutações relacionadas com a DA de início precoce foram descobertas no século XX, quando os investigadores procuravam identificar possíveis genes com segregação mendeliana em grandes famílias cuja característica era a presença de vários membros afectados com Alzheimer nas diferentes gerações.

A associação entre a doença de Alzheimer de início precoce e mutações génicas foi descrita para os genes *APP*, *PS1*, *PS2*, que codificam, respectivamente, Proteína precursora da amilóide, Presenilina 1 e Presenilina 2.

As proteínas PS1 e PS2 apresentam uma forma serpenteada e contém domínios que atravessam a membrana múltiplas vezes. Possuem 6 a 9 domínios transmembranares. Tanto a PS1 como a PS2 sofrem clivagem endoproteolítica originando 2 fragmentos solúveis. Pensa-se que no caso da DA, tanto a PS1 como a PS2 sofrem uma clivagem endoproteolítica alternativa e os produtos resultantes dessa clivagem são resistentes aos

detergentes e têm baixa velocidade de degradação, estando relacionados com a apoptose (Lydia et al., 1997).

Determinadas mutações nos genes que codificam APP, PS1 e PS2 levam a um aumento da produção/libertação e secreção de A $\beta$ , o componente primário das placas de amiloide no cérebro.

Foram também descritos casos de DA com mutações no gene *MAPT*, que codifica a proteína *tau* associada aos microtúbulos, que está habitualmente envolvido na Demência fronto temporal.

Uma vez que a Doença de Alzheimer, especialmente de início precoce, é uma patologia com grande influência genética, o estudo dos genes relacionados com a fisiopatologia da doença é imprescindível, gerando expectativas no que diz respeito à identificação precoce de indivíduos com elevado risco de desenvolver a doença.

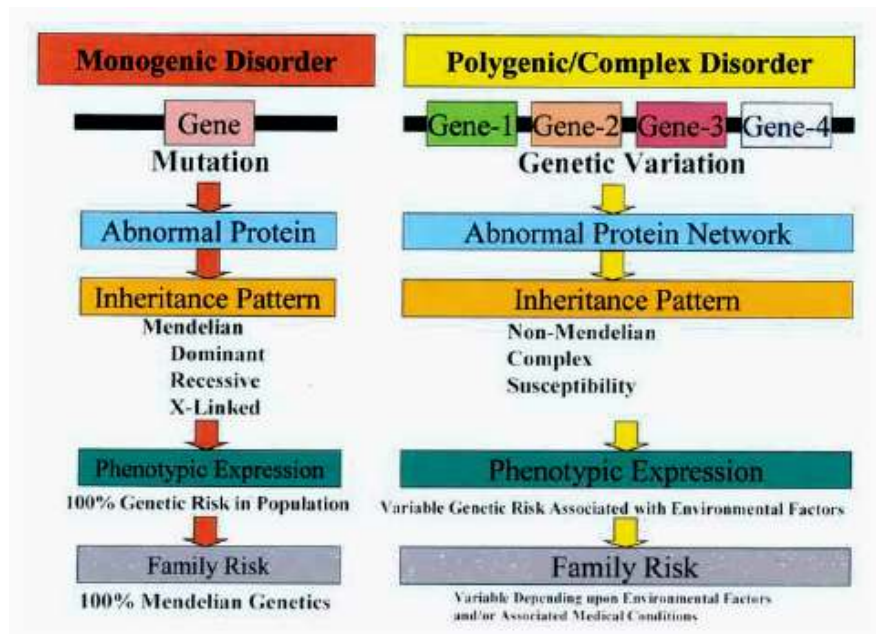
Já no que diz respeito à DA esporádica, o factor de risco genético reconhecido é uma variante no gene que codifica a apolipoproteína E, *APO-E*. Este gene está localizado no braço longo do cromossoma 19 e a proteína resultante participa no armazenamento, transporte e metabolismo do colesterol.

Em 1993, Pericak-Vance *et al.* estudaram um polimorfismo comum do *APO-E* e verificaram que estava associado ao aumento de risco para a DA, sugerindo então um envolvimento funcional da ApoE na doença. Enquanto o alelo  $\epsilon 4$  aumenta o risco de desenvolver DA pensa-se que o alelo  $\epsilon 2$  tem um efeito protector porque se verificou a sua maior frequência em indivíduos centenários, revelando que pode ter um papel na longevidade e no envelhecimento saudável.

Apesar da associação ligação entre o alelo  $\epsilon 4$  do gene *APO-E* e a DA estar provada, não é específica porque a presença deste alelo não é necessária nem suficiente para causar a doença. O alelo  $\epsilon 4$  altera o risco genético de desenvolver a doença e actua diminuindo a idade de manifestação da doença, sendo que os indivíduos homocigóticos manifestam a doença mais precocemente que os indivíduos com apenas uma cópia. No entanto, é consensual na comunidade médica de que a genotipagem do *APO-E* não pode ser o único meio para diagnosticar a DA (Lambert et al., 2007).

Em doenças denominadas monogénicas, as mutações num único gene alteram a função da proteína correspondente e levam à doença. No entanto, a DA, assim como a maioria das doenças, é poligénica, ou seja, resulta da interacção de inúmeros genes, podendo incluir influências ambientais na sua expressão. Assim, a alteração de apenas

um gene pode não ser prejudicial, mas combinada com variações de outros genes pode contribuir para o fenótipo da doença (**Figura 1.13**).



**Figura 1.13** – Paralelismo entre o desenvolvimento de doenças monogênicas e poligênicas (Adaptado de Cacabelos et al., 2002).

Assim, mais do que influências de genes isolados, é necessário investigar de que modo interagem entre si, na formação de um perfil genético do indivíduo. Além disso, cada perfil genético interage com factores do ambiente de forma diferente e desconhecida. Deste modo, em algumas condições, as variações genéticas podem ser suficientes para induzir a expressão fenotípica da doença, enquanto que noutras circunstâncias é necessária a interação dos factores ambientais com os genes afectados para ocorrer expressão do fenótipo da doença. No caso da DA de início precoce, a história familiar é o principal factor de risco. No entanto, a idade e o estilo de vida também influenciam a manifestação da doença, principalmente nos casos de DA esporádica (Bertram et al., 2002).

Diariamente o nosso organismo é exposto a inúmeras substâncias exógenas que são metabolizadas por sistemas enzimáticos endógenos, codificados por genes altamente polimórficos, com influência na metabolização e no risco para doença e/ou eficácia terapêutica.



## 1.7 Metabolização de xenobióticos e citocromo P450

Entende-se por xenobióticos todos os compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico, ou que não fazem parte da constituição habitual do corpo humano, sendo no entanto capazes de aceder ao seu interior. São compostos de natureza química muito variada, podendo ser de origem natural, sintética ou até mesmo originados pela própria actividade humana. Incluem-se neste grupo de compostos os fármacos, cosméticos, aditivos alimentares, pesticidas, produtos de uso domésticos ou derivados da indústria química, entre muitos outros.

O acesso ao organismo por estes compostos pode ocorrer por diferentes vias, desde a ingestão, inalação ou até mesmo através da pele.

Como não são utilizados como nutrientes necessários ao organismo não seguem o mesmo destino que estes e não são portanto incorporados nas vias bioquímicas do metabolismo nem são degradados através destas. A sua composição é normalmente de natureza lipofílica podendo, por esse motivo, atravessar facilmente as membranas biológicas, acedendo ao interior das células, o que vai dificultar a sua excreção. O organismo desenvolveu um sistema metabólico enzimático alternativo não integrado no metabolismo energético, de modo a permitir a neutralização e eliminação destes compostos. Este mecanismo permite a catalização e transformação dos xenobióticos em moléculas mais polares, mais hidrossolúveis, o que facilita a sua excreção. As enzimas constituintes deste sistema são de importância fundamental para a sobrevivência do organismo, pois caso não existissem, estes compostos tenderiam a acumular-se, alterando o equilíbrio celular e comprometendo a vida.

O conjunto destes processos enzimáticos designa-se por reacções de biotransformação, catalizadas por uma família de proteínas designadas por citocromo P450 (CYP450). Esta metabolização ocorre essencialmente em duas fases. Numa primeira fase (fase I) os xenobióticos são modificados através de reacções de oxidação, redução ou hidrólise e convertidos em produtos polares, formando na maioria das vezes metabolitos menos activos ou inactivos. Na fase II, os metabolitos formados conjugam-se com moléculas de carácter polar. Os conjugados são normalmente inactivos, não causando prejuízo para o organismo e podendo ser eliminados maioritariamente pela urina.



Existem outro tipo de factores, externos, tais como os ambientais (Clarke, 1998) que podem causar a indução ou inibição enzimática. No que diz respeito à indução enzimática, a metabolização é acelerada por substâncias exógenas, que estimulam a síntese das enzimas CYP450 enzimática tais como hormonas, insecticidas e barbitúricos. Pelo contrário, na inibição enzimática, a metabolização é reduzida por substâncias exógenas que inibem a síntese das enzimas ou competem com os substratos das enzimas responsáveis pela metabolização. O álcool tem também efeitos sobre a metabolização, uma vez que a ingestão aguda diminui a metabolização de fármacos por competição.

As CYP450 possuem uma ampla especificidade uma vez que existem várias isoformas, tendo-se adaptado cada uma a determinado grupo de compostos. A semelhança na sequência de aminoácidos entre as diferentes CYPsP450 é relativamente baixa, chegando a ser menor que 20% em alguns casos (Werck-Reichhart et al., 2001). Estudos de cristalização têm permitido comprovar que existe uma elevada conservação na topografia e estrutura tridimensional das CYPs450 (Graham et al., 1999).

As CYP450 podem classificar-se em quatro classes em função de como cedem os seus electrões desde o NADPH até ao centro catalítico da enzima. As proteínas de classe I utilizam uma reductase que contém FAD e uma ferrosulfoproteína (ferridoxina). As de classe II requerem apenas uma reductase de citocromo P450 que contem FAD/FMN para a transferência de electrões. As de classe III são autosuficientes e não necessitam de um dador de electrões e as de classe IV recebem os electrões directamente do NADPH (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).

Para além das suas funções biossintéticas, as proteínas de classe I participam em processos de metabolização de xenobióticos tanto em plantas como animais. São as responsáveis pelo metabolismo de fármacos e estão envolvidos nos processos de destoxificação (Honkakoski & Negishi, 2000).

### **1.7.1 A superfamília CYP450: Nomenclatura**

As CYP450 são uma família constituída por elevado número de membros, que se encontram organizados por sua vez em mais de 20 subfamílias.

Em 1987 estabeleceram-se princípios para um sistema de nomenclatura e classificação que ainda se utiliza actualmente, o qual obedece a critérios filogenéticos e baseia-se na identidade da sequência dos aminoácidos nas cadeias polipeptídicas das diferentes enzimas (Daniel et al., 1987). Segundo estes critérios, as enzimas deste sistema identificam-se com as siglas CYP, seguido de um número que designa a família, uma letra que identifica a subfamília e um outro número que diz respeito ao gene. Numa mesma família, são agrupadas as enzimas com uma sequência de aminoácidos com uma semelhança maior que 40%. As CYPs450 formam uma superfamília de proteínas hémicas que se podem encontrar em diversas espécies desde as bactérias, até aos mamíferos, sendo alguns comuns a várias espécies e outros característicos de uma determinada espécie.

Quando foi feita a primeira classificação dos membros desta superfamília, em 1987, foram descritos apenas 30 genes diferentes que se agruparam em 30 famílias (Daniel et al., 1987). Em pouco mais de duas décadas, este número tem aumentado significativamente, sendo conhecidos hoje em dia aproximadamente 2000 genes, incluídos em 200 famílias diferentes.

As enzimas CYP450 participam no metabolismo dos xenobióticos e também na síntese de alguns composto endógenos, tendo-se especializado consoante a função que desempenham (Nelson, 1999).

Inicialmente pensou-se que estas enzimas se localizavam apenas no fígado, no entanto, mais tarde, vários estudos científicos vieram comprovar que existem em quase todo o organismo (Ding et al., 2003) no entanto, o fígado é, sem dúvida, o órgão onde mais se expressam, considerando-se por isso o órgão principal da metabolização do xenobióticos.

As enzimas responsáveis pela transformação de xenobióticos no Ser Humano e na maioria dos mamíferos pertencem às famílias CYP1, CYP2 e CYP3.

### **1.7.2 CYP2D6**

Para o presente trabalho, interessa conhecer a família CYP2. É a família constituída por um maior número de membros que se encontram organizados em mais de 20 subfamílias.

A subfamília CYP2D é onde se insere a enzima CYP2D6, cujo gene é alvo do presente estudo. Este gene é certamente o mais conhecido devido às variações de sequência que apresenta e ao impacto na metabolização de fármacos. Estas variações de sequência ocorrem na população geral de uma forma relativamente estável, sendo encontradas com uma frequência equivalente ou superior a 1% e são denominadas polimorfismos genéticos (Evans et al., 1999).

As formas mais comuns de polimorfismos genéticos são os SNP's (*Single Nucleotide Polymorphisms*) deleções e substituições de base única.

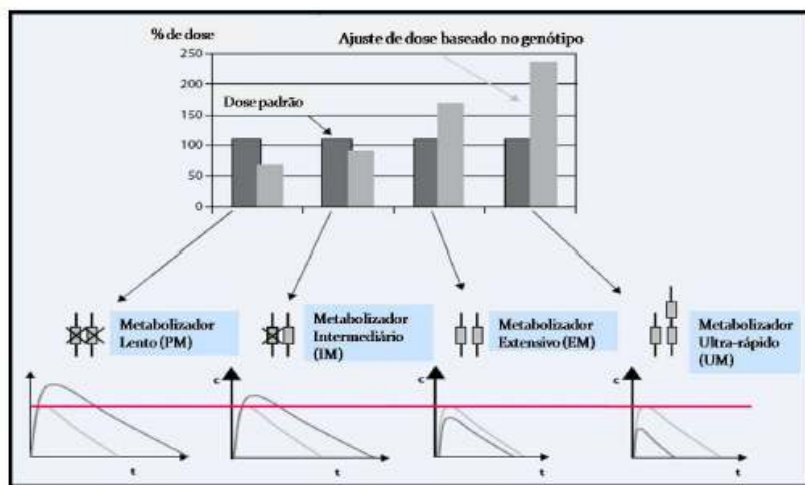
O genoma humano possui cerca de 30.000 genes, com um total de 3,12 bilhões de nucleotídeos, os quais apresentam mais de dois milhões de polimorfismos ocorrendo com frequência de 1 a cada 1.250 pares de bases (Venter et al., 2001).

Actualmente para o *CYP2D6* conhecem-se cerca de 80 variantes alélicas com várias subvariantes, que normalmente afectam a expressão da proteína e consequentemente a sua actividade (Human Cytochrome P450 (CYP) *Allele Nomenclature Committee*).

Deste modo, sabe-se que o perfil metabólico de cada indivíduo pode sofrer modificações devido aos polimorfismos. Habitualmente referem-se 3 fenótipos de metabolização, consoante a velocidade de metabolização de determinado xenobiótico em cada indivíduo. Podem distinguir-se os metabolizadores lentos, (PMs – poor metabolizers), metabolizadores extensivos (EMs – extensive metabolizers) e metabolizadores ultra-rápidos (UMs – ultrarapid metabolizers), havendo estudos recentes que referem também a existência de um quarto padrão de metabolização, os metabolizadores intermediários (IMs – Intermediate metabolizers) (Rogers et al., 2002).

Metabolizadores lentos são então os indivíduos com uma maior tendência para efeitos adversos ou tóxicos perante a utilização de um determinado fármaco. Isto deve-se ao facto de, este tipo de metabolizadores, em geral, serem indivíduos com diminuição ou ausência da enzima metabolizadora, o que pode ocorrer devido a uma deleção do gene ou alguma instabilidade do RNA mensageiro. Consequentemente, a terapêutica pode apresentar efeitos colaterais. Os metabolizadores extensivos são os que apresentam um metabolismo dito “normal”, nos quais é esperado que a resposta ao medicamento seja observada em doses padrão, sendo o mais comum na população. No que respeita aos metabolizadores ultrarrápidos, estes podem apresentar concentrações plasmáticas reduzidas para uma resposta terapêutica. O fenótipo destes metabolizadores pode ser devido a um aumento na produção da enzima metabolizadora normalmente associado a

uma ou múltiplas duplicações do gene que codifica a enzima, podendo a terapêutica não produzir o efeito desejado (**Figura 1.15**).



**Figura 1.15** - Esquema de dose e resposta terapêutica baseada no genótipo de *CYP2D6*. Verifica-se que PMs apresentam uma elevada concentração plasmática em relação ao normal, enquanto que UMs apresentam uma concentração diminuída, não atingindo o nível terapêutico (linha rosa). A dose baseada nos genótipos (barra clara no gráfico) também varia em relação à dose padrão (barra escura no gráfico) (Adaptado de Kirchheiner et al., 2006).

Os polimorfismos no *CYP2D6*, assim como a maioria dos polimorfismos, exibem diferentes frequências de acordo com a etnia. Na população caucasiana, fenotipicamente 3-5% são metabolizadores ultrarrápidos, 70-80% são metabolizadores extensivos, 10-17% são considerados metabolizadores intermediários e 5-10% apresentam fenótipo de metabolização lento (Sachse et al., 1997).

Já por exemplo, no que diz respeito à população chinesa, é ainda menos comum a existência de indivíduos metabolizadores pobres, cerca de 1% (Wang, 1993), enquanto entre os afro-americanos existe uma percentagem entre os 0% e 19% de metabolizadores lentos (Bradford, 2002).

De acordo com o exposto, a genotipagem do *CYP2D6* antes do início do tratamento com determinados fármacos, poderia fornecer dados importantes e permitir a identificação de indivíduos metabolizadores ultra-rápidos e lentos, levando a um ajuste da terapêutica nesses indivíduos. Este factor é particularmente relevante, já que, um tratamento eficaz para uma sub-população de indivíduos pode não ser adequado para os restantes membros da população.

Actualmente, é possível, realizar uma monitorização para confirmar se a concentração de determinado medicamento no plasma está acima ou abaixo do limiar terapêutico, minimizando, deste modo, o tempo que decorre antes das medidas correctivas poderem ser implementadas nos doentes.

Com o presente estudo pretende-se então perceber de que modo um polimorfismo específico do gene *CYP2D6* (rs1065852) pode estar associado às características clínicas de doentes com diagnóstico provável de AD.

O polimorfismo rs1065852 identifica a forma alélica *CYP2D6\*10*, uma das variantes mais importantes do *CYP2D6* (Zhou, 2009) cuja alteração da proteína se dá na posição 34, de uma prolina por uma serina, perto do terminal NH<sub>2</sub> da proteína, que é altamente conservada. Esta alteração apresenta normalmente uma diminuição significativa da actividade enzimática, devida ao decréscimo da estabilidade da proteína, o que vai levar a uma menor afinidade no reconhecimento do substrato pela enzima.

Prevê-se que, indivíduos com esta variante, apresentem um padrão de metabolismo lento o que pode levar, por vezes, a uma possível toxicidade com determinados fármacos.

O *CYP2D6\*10* é um dos alelos identificados na população Japonesa como codificante de enzimas mutantes com uma actividade de apenas 7-35% da proteína do *wild-type* (Sakuyama et al., 2008).

Pretendemos com este estudo encontrar uma associação entre uma das formas alélicas e as características clínicas dos doentes de Alzheimer, no sentido de compreender a influência dos padrões de metabolização na etiopatogenia da doença.

Este trabalho insere-se no âmbito da medicina legal, uma vez que a doença de Alzheimer, é a terceira causa de morte nos países desenvolvidos, sendo que, em Portugal, de 1999 para 2000, se registou um acréscimo superior a 24%, a nível nacional, dos óbitos pela doença de Alzheimer. Estimativas realizadas em 2001 apontavam para um aumento de 40% nos anos decorrentes (APFADA- Associação portuguesa de familiares e amigos de doentes de Alzheimer, in <http://saude.sapo.pt> de 29 do Julho de 2001).

A doença de Alzheimer tem tido particular relevo no conjunto das causas de morte originadas por doenças do sistema nervoso em Portugal.

Muitos desses doentes não estão diagnosticados, sendo a mortalidade a única fonte que permite estimar, indirectamente, o número de doentes de Alzheimer.

## **2. Amostras e Metodologia**



## 2.1 Selecção e caracterização dos doentes

Para a realização do presente trabalho usou-se DNA obtido a partir do sangue periférico de 51 doentes, 32 do sexo feminino e 19 do sexo masculino, tendo idades compreendidas entre os 53 e os 86 anos, sendo a média de idade de 70 anos. A média de idade de início da doença situa-se entre os 35 e os 84 anos, sendo a média de 66 anos. Todos os doentes foram seguidos na Consulta de Demências do Serviço de Neurologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, com diagnóstico provável de DA, de acordo com critérios padronizados (American Psychiatric Association, 1994; McKhann et al., 1984).

Os doentes apresentavam uma história de pelo menos um ano de declínio cognitivo confirmado por avaliação neurológica. Foi confirmada uma história familiar em 37 doentes, sendo positiva em 15. No que diz respeito à depressão foi possível ser avaliada em 41 doentes, e identificada em 15. A agressão também foi determinada em 32 doentes, tendo sido positiva em 4. A média dos valores de MMSE foi de  $13 \pm 8,2$  (0 – 27). No que diz respeito ao CDR, 16 doentes tinham valor de “1”, 18 “2” e 11 “3”.

O sangue colhido foi identificado e mantido a 4°C para extracção de DNA.

## 2.2 Metodologia

### 2.2.1 Análise do gene *CYP2D6*

A sequência do gene foi obtida nas bases de dados (p.e NCBI) e os *primers* foram desenhados recorrendo ao *software Primer3®* (Rozen & Skaletsky, 2000) para as posições 42522355 e 42528845. Usaram-se também os primers descritos por Llerena et al., em 2005.

### 2.2.2 Amplificação genética por *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

A PCR é uma técnica criada por Kary Mullis no ano de 1983 e que actualmente se tornou comum e imprescindível nas investigações laboratoriais e pesquisas médicas. Esta técnica valeu ao seu criador um Prémio Nobel em 1993.

Esta reacção tem uma importância fundamental quando a quantidade de DNA disponível para determinado estudo é reduzida, pois através do seu uso é possível amplificar regiões específicas de DNA de modo a obterem-se múltiplas cadeias de DNA a partir de uma única cadeia.

O método da PCR é hoje em dia comum na genética e biologia molecular, tendo trazido um enorme progresso a áreas como o diagnóstico de doenças, medicina forense entre muitas outras para além da Investigação em Biomédica.

Este método é muito sensível e por esse motivo deve ser realizado com o máximo de cuidado a fim de evitar contaminações e resultados falsos.

Para a sua realização é necessário (Coen et al., 1997):

- a) DNA Molde que contém a região do DNA a amplificar;
- b) uma DNA Polimerase;
- c) *Primers* que são constituídos por sequências de oligonucleótidos (20 a 30 bases) e são complementares à cadeia de DNA de modo a poderem ligar-se a esta e delimitar a zona pretendida;
- d) Desoxinucleótidos de Trifosfato (dNTPs), que são nucleótidos na forma livre que se obtêm a partir de uma mistura de cada um dos 4 nucleótidos (dCTP, dGTP, dATP, dTTP), que são depois adicionados ao *primer* para formar uma nova cadeia.
- e) Tampão, que tem como função proporcionar o meio adequado para o funcionamento da enzima (pH=8).
- f) Outros reagentes tal como  $Mg^{2+}$  ou DMSO que têm como função otimizar as condições da reacção, uma vez que influenciam a sua especificidade. O  $Mg^{2+}$  aumenta substancialmente a estabilidade da enzima e da cadeia de DNA enquanto que o DMSO aumenta a capacidade de ligação dos *primers* à cadeia molde porque diminui a interacção *primer-primer* e *primer-molde* (Fairchild et al., 2002).

Após juntar todos os constituintes necessários, realiza-se o programa de PCR no termociclador, que consiste em séries de 20 a 35 ciclos passando cada ciclo por 3 fases com diferentes temperaturas:

➤ *Desnaturação*: esta fase ocorre por volta dos 95°C e tem como objectivo a desnaturação das cadeias de DNA de modo a obterem-se cadeias simples. As elevadas temperaturas permitem a clivagem das ligações de hidrogénio entre as bases das cadeias.

➤ *Annealing*: nesta fase a temperatura é muito importante porque ocorre o reconhecimento e a ligação correcta dos *primers* às sequências complementares de DNA. É fundamental ter em conta a temperatura de *melting* dos *primers* que normalmente é cerca de 50-65°C. Para calcular esta temperatura recorre-se a uma fórmula matemática:

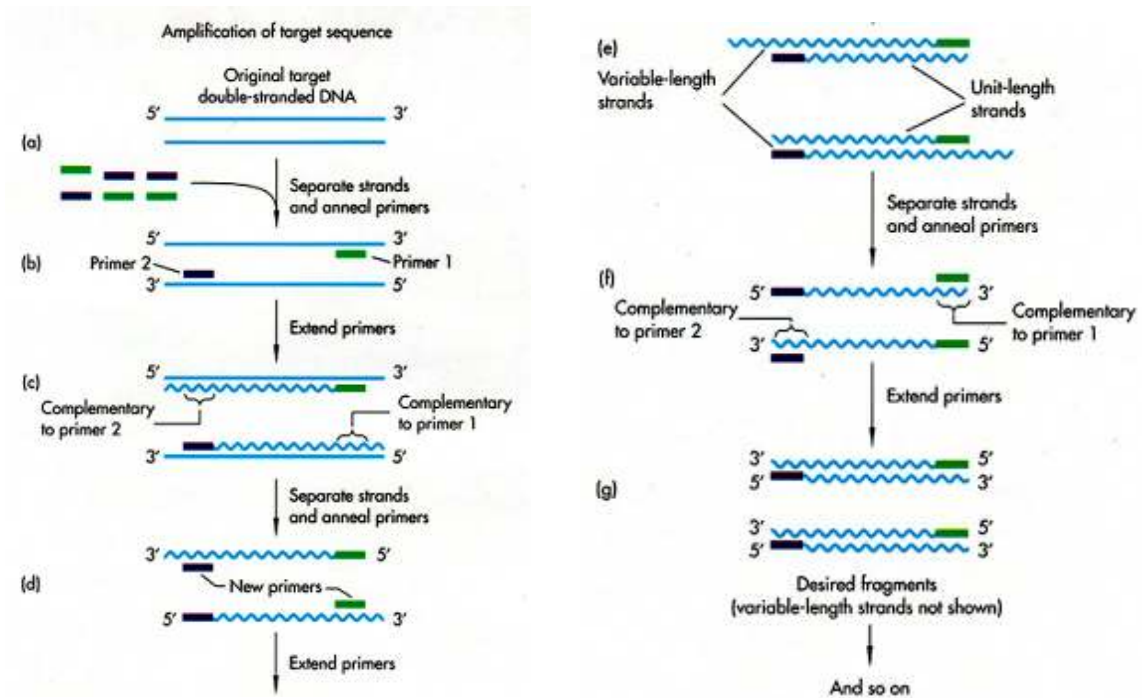
$$T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$$

Tal acontece porque a adenina e a timina ligam-se apenas por 2 pontes de hidrogénio enquanto a citosina e a guanina se ligam por 3 pontes de hidrogénio e por isso formam ligações mais fortes sendo necessárias temperaturas mais elevadas para quebrar essas ligações. Logo, quanto maior o número de Citosinas e Guaninas de um primer maior será a sua temperatura de *melting*.

➤ *Extensão*: durante esta fase a DNA Polimerase através da adição de dNPTs sintetiza uma nova cadeia de DNA complementar a cadeia molde. As novas cadeias são sempre formadas doo sentido 5' para o 3'.

➤ *Extensão ou Elongação final*: Esta fase é realizada após o último ciclo de PCR e ocorre a 70-74°C durante 5 a 15 minutos de modo a que nenhuma cadeia simples de DNA fique por alongar

Após cada ciclo de PCR a quantidade de DNA duplica, ou seja após “n” ciclos teremos 2<sup>n</sup> cópias (**Figura 2.1**).



**Figura 2.1** - Esquemas representativos dos diferentes passos do método de PCR (Adaptado de Griffiths et al., 2005).

Apesar de ser uma técnica com uma grande percentagem de sucesso, há inúmeros factores que devem ser tidos em conta de modo a obtermos o máximo de eficiência e especificidade. Deste modo, é fundamental que:

- exista complementaridade dos *primers* à sequência que se pretende amplificar, que deve ser total e não apenas parcial. Devem ser constituídos apenas por 35-55% de CG porque leva a formação de estruturas secundárias, e estes devem situar-se mais na zona inicial evitando a zona final;
- todo o material usado desde pontas até aos tubos esteja esterilizado e seja específico para o PCR, não devendo ser usado para quaisquer outras aplicações;
- se evite o armazenamento ou a manipulação dos produtos pós-amplificação próximo dos reagentes de PCR de modo a evitar a contaminação;
- os reagentes e equipamentos tais como tampão, água destilada, pontas de pipeta e tubos de PCR estejam autoclavados;

- as luvas sejam mudadas frequentemente, especialmente quando se entra ou se deixa o laboratório de PCR, ao manusear amostras concentradas de DNA ou quando ocorrem salpicos;
- um ou mais controlos de reagentes negativos contendo água destilada em vez do DNA template sejam incluídos de modo a ter-se a certeza que não houve contaminação.

### **2.2.3 Estudo do rs1065852 do gene *CYP2D6***

Para amplificação da região a estudar, usaram-se os *primers* acima mencionados, com uma mistura de reacção, contendo 200µM de dNTPs e 0,4U de Taq polimerase, num programa de PCR com 30 ciclos (temperatura de desnaturação 98°, *annealing* a 60-66° e extensão a 72°).

Para confirmar a presença de produtos amplificados efectua-se uma electroforese.

### **2.2.4 Electroforese de DNA em gel de agarose**

A electroforese é um processo que permite separar e identificar rápida e eficazmente, moléculas de DNA. Essa separação é feita com base na aplicação de um campo eléctrico na tina. A ideia base é que os iões e moléculas carregados negativamente deslocam-se para o ânodo enquanto os iões e moléculas carregados positivamente deslocam-se para o cátodo. Quanto maior a voltagem aplicada mais rapidamente as moléculas se movem. No entanto a velocidade de migração das moléculas também depende de factores como o peso molecular, carga, forma das moléculas, pH, temperatura entre outros. Por exemplo o DNA circular migra mais rapidamente que o DNA linear porque o DNA circular apresenta raios hidrodinâmicos

que lhe permite atravessar mais facilmente a matriz do gel, as moléculas mais leves migram mais rapidamente que as moléculas mais pesadas (Crowther, 1995).

Como o DNA linear de dupla cadeia atravessa a matriz a uma taxa inversamente proporcional ao logaritmo do seu peso molecular, ao comparar o fragmento de interesse com um marcador de peso molecular conhecido pode estimar-se o peso molecular do fragmento.

A agarose é uma das substâncias mais utilizadas para fazer o gel e é constituída por um polissacarídeo de cadeia longa que é obtido a partir de uma alga. O tamanho dos poros de agarose é determinado pela concentração do gel (**Tabela 2.1**) e pode ser manipulado para garantir uma separação mais eficaz, por exemplo quanto menor for a diferença de tamanhos entre os fragmentos de DNA mais concentrado terá de ser o gel de modo a conseguir uma boa separação dos fragmentos (Crowther, 1995).

As amostras são colocadas nos poços do gel, é aplicada uma corrente eléctrica para que ocorra a migração dos fragmentos e a sua separação na electroforese.

**Tabela 2.1** – Relação entre a concentração do gel de agarose e o tamanho dos fragmentos que são separados na electroforese (Fonte: Fairchild et al., 2002).

| <b>Percentagem de agarose</b> | <b>Tamanho dos fragmentos de DNA Separados (pb)</b> |
|-------------------------------|---|
| <b>0,3</b>                    | <b>1000-30000</b>                                   |
| <b>0,7</b>                    | <b>800-12000</b>                                    |
| <b>1</b>                      | <b>500-10000</b>                                    |
| <b>1,2</b>                    | <b>400-7000</b>                                     |
| <b>1,3</b>                    | <b>300-3000</b>                                     |
| <b>1,4</b>                    | <b>250-3000</b>                                     |
| <b>1,5</b>                    | <b>200-3000</b>                                     |
| <b>2</b>                      | <b>50-2000</b>                                      |

### **2.2.4.1 Electroforese para visualização dos fragmentos das amostras em estudo**

Neste trabalho, como o fragmento inicial possui um tamanho de 6491 pb usou-se um gel a 0,7%. Em tampão TBE 1x, contendo 1mg/ml de brometo de etídeo.

A função do brometo de etídeo é intercalar-se entre as bases de DNA e quando o complexo Brometo de Etídeo - DNA é irradiado com luz U.V. (260—360 nm) emite fluorescência laranja permitindo visualizar os fragmentos de DNA. É importante realçar que o brometo de etídeo é mutagénico sendo necessária uma especial atenção na sua manipulação manutenção.

Usaram-se 5µl de produto de PCR e marcador de peso molecular para comparação do tamanho dos fragmentos de DNA.

### **2.2.5 Registo imagiológico dos resultados**

Após realizada a electroforese os resultados são observados sob radiação ultravioleta e regista-se em fotografia.

### **2.2.6 Purificação de produtos d PCR**

Esta abordagem tem como objectivo eliminar *primers* em excesso e produtos inespecíficos que se formam durante a reacção de PCR, de forma a evitar interferências nos procedimentos seguintes para análise de sequenciação.

Existem diversos métodos, mas no presente trabalho utiliza-se *ExoSAP-IT*®, que é uma combinação de duas enzimas, a *Exonuclease I* e a *Shrimp Alkaline Phosphatase*, que se encontram num tampão especialmente formulado para este efeito, removendo *primers* e nucleótidos em excesso.

Os produtos de PCR tratados ficam prontos para serem utilizados em aplicações que requerem DNA livre de excesso de *primers* e nucleótidos.

### 2.2.7 PCR de sequenciação

Após a purificação efectua-se uma PCR de sequenciação com 3,2 pmol de *primer* e 5µm de mistura de dNTPs e enzima, usando um programa de PCR pré-estabelecido pelo fabricante (temperatura de desnaturação 96°C, *annealing* 50° e extensão a 60°C).

Após a reacção de sequenciação, as amostras foram novamente purificadas e colocadas no sequenciador automático ABI 3130 (*APPLIED BIOSYSTEMS*).

### 2.2.8 Sequenciação automática

Procedeu-se à sua análise por sequenciação automática, tendo como base o princípio descrito em 1977 por Sanger. É um processo que permite obter a ordem dos nucleótidos de uma determinada sequência. O método consiste em identificar, de forma contínua e sequencialmente, o último nucleótido incorporado na extremidade de alongamento da cadeia. Os produtos da reacção contêm uma “sinalização” que permite detectá-los na etapa de análise. De uma forma geral, o processo é realizado a partir de uma cadeia simples de DNA que servirá de molde para gerar a outra metade complementar da dupla hélice.

Neste método para além dos dNTP são incorporados ddNTP (terminadores) marcados com fluorocromos, onde na posição 3' da desoxirribose um grupo OH é substituído por um H. Isto leva à impossibilidade da formação de uma ligação fosfodiéster e continuação da reacção de polimerização que termina cada vez que é incorporado um ddNTP marcado.



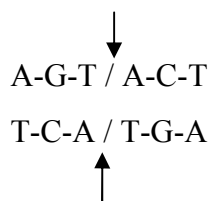
No final obtém-se um gráfico de sequenciação a que se chama electroferograma. As sequências foram analisadas com *SeqScape v2.1 (APPLIED BIOSYSTEMS)*.

### 2.2.9 Análise por RFLP

Recorrendo ao uso de enzimas de restrição é possível reconhecer alterações na sequência de DNA. Este tipo de enzimas têm especificidade, uma vez que reconhecem e clivam sequências constituídas por 4 a 6 nucleótidos. A presença de um local de restrição é sinónimo de um alelo enquanto a ausência do mesmo local de restrição significa a presença de outro alelo.

#### 2.2.9.1 Abordagem por RFLP aplicado ao polimorfismo em estudo

Para o polimorfismo em causa, rs1065852, 100C>T, usou-se a enzima *Sca I* que reconhece a seguinte sequência:



Ao produto de PCR, obtido com os *primers* descritos em Llerena et al, 2005, adicionou-se a enzima (0,5U) de restrição de acordo com as instruções do fabricante e incubou-se a 37°.

Para visualizar os fragmentos de DNA é necessário realizar uma nova electroforese.

Conforme descrito anteriormente. Existem três genótipos possíveis para a referida variante, de acordo com a presença/ausência do local de restrição.

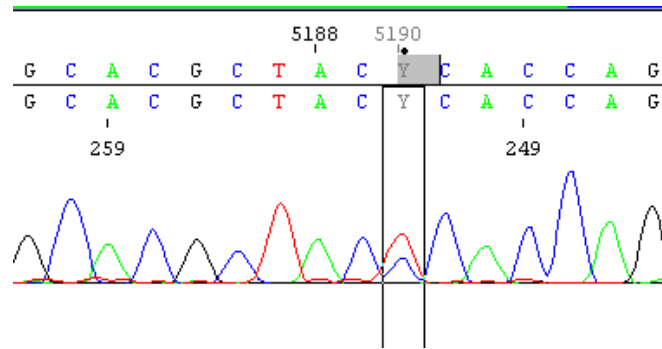
### **2.3 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada recorrendo à funcionalidade do Excel que permite a execução de gráficos e os dados foram tratados com o programa Prism v3.00 para Windows, GraphPad Software (Motulsky, 1999). Os resultados foram analisados por testes de  $X^2$  ou exacto de Fisher, usando tabelas de contingência. As diferenças na distribuição de frequências entre grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## **3. Resultados**

### 3.1 Resultados da sequenciação automática

Os resultados da análise de sequenciação (Secção 2.2.8) encontram-se ilustrados na **Figura 3.1**.



**Figura 3.1** - Electroferograma de uma amostra heterozigótica CT para o polimorfismo 100C>T.

### 3.2 Frequências alélicas e genóticas para o SNP rs1065852

O presente trabalho permitiu estabelecer várias relações entre diversas características clínicas dos doentes em estudo.

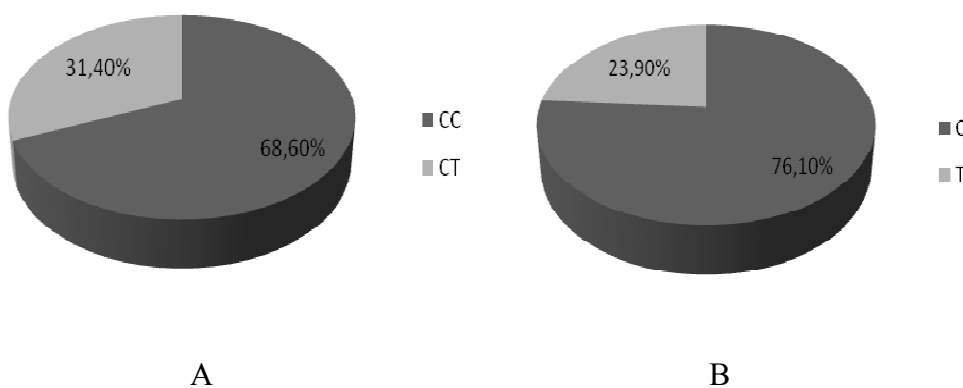
A determinação das frequências genóticas e alélicas do SNP rs1065852 incluindo as relativas à idade de início da doença e ao sexo dos indivíduos encontra-se descrita na **Tabela 3.1**.

**Tabela 3.1** - Distribuição dos indivíduos com DA por genótipos e alelos característicos do polimorfismo 100C>T.

|                              | Genótipo   |            |           | Alelo      |            |
|------------------------------|------------|------------|-----------|------------|------------|
|                              | CC         | CT         | TT        | C          | T          |
| Indivíduos com AD (n=51)     | 0,686 (35) | 0,314 (16) | 0,000 (0) | 0,800 (86) | 0,200 (16) |
| Indivíduos com EOD (n=15)    | 0,933 (14) | 0,067(1)   | 0,000 (0) | 0,967 (29) | 0,009 (1)  |
| Indivíduos com LOD (n=30)    | 0,567 (17) | 0,433 (13) | 0,000 (0) | 0,783 (47) | 0,217 (13) |
| Indivíduos Femininos (n=32)  | 0,656 (21) | 0,344 (11) | 0,000 (0) | 0,828 (53) | 0,172 (11) |
| Indivíduos Masculinos (n=19) | 0,737 (14) | 0,263 (5)  | 0,000 (0) | 0,868 (33) | 0,132 (5)  |

Legenda: EOD – demência de início precoce; LOD – demência de início tardio

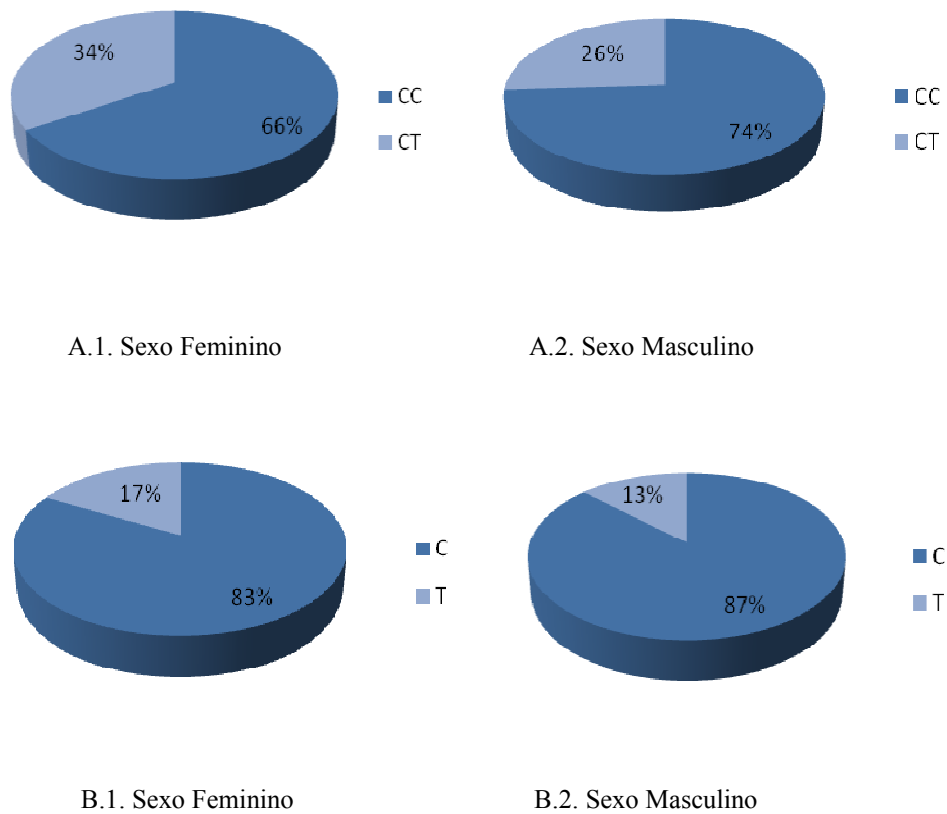
Na figura 3.2 encontra-se a distribuição das frequências dos genótipos e alelos do SNP rs1065852 nas amostras analisadas, verificando-se que a maioria dos doentes são homocigóticos CC (68,60%) (**Figura 3.2 A**), não se tendo encontrado indivíduos com genótipo TT. A população de estudo encontra-se em Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.



**Figura 3.2** – Distribuição de frequências genotípicas (A) e alélicas (B) para o polimorfismo 100C>T nos doentes estudados.

### 3.2.1 Género

Tendo em conta o estudo da distribuição dos genótipos e alelos de acordo com o género dos indivíduos em estudo, verificou-se que, em termos de distribuição dos genótipos por sexos que o genótipos CC se encontra numa percentagem maior que o genótipo CT quer em indivíduos do sexo feminino como em indivíduos do sexo masculino. O mesmo facto ocorre para o alelo C em relação ao alelo T.



**Figura 3.3** - Distribuição dos genótipos (A) e alelos (B) de acordo com o sexo dos indivíduos.

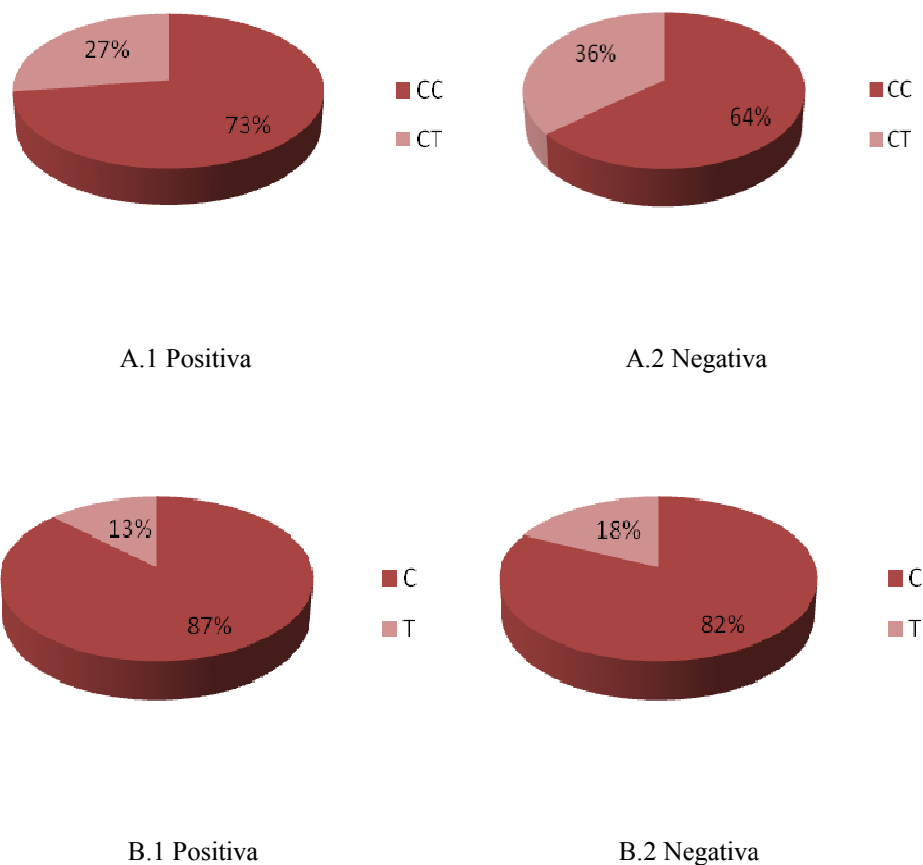
As diferenças na distribuição de frequências, tanto de genótipos, como de alelos, não são estatisticamente significativas.

### 3.2.2 História Familiar

O registo da história clínica de cada doente permitiu classificar os doentes tendo em conta a sua história familiar positiva ou negativa.

Com base no estudo da distribuição dos genótipos de acordo com a história clínica dos indivíduos em estudo, verificou-se que existe uma maior percentagem de indivíduos genótipo CC quer para uma história familiar positiva quer para a história familiar negativa.

O mesmo acontece com os alelos, em que o alelo C existe em maior percentagem quer em indivíduos com história familiar positiva quer em indivíduos com história familiar negativa.



**Figura 3.4** - Distribuição dos genótipos (A) e alelos (B) consoante a história familiar.

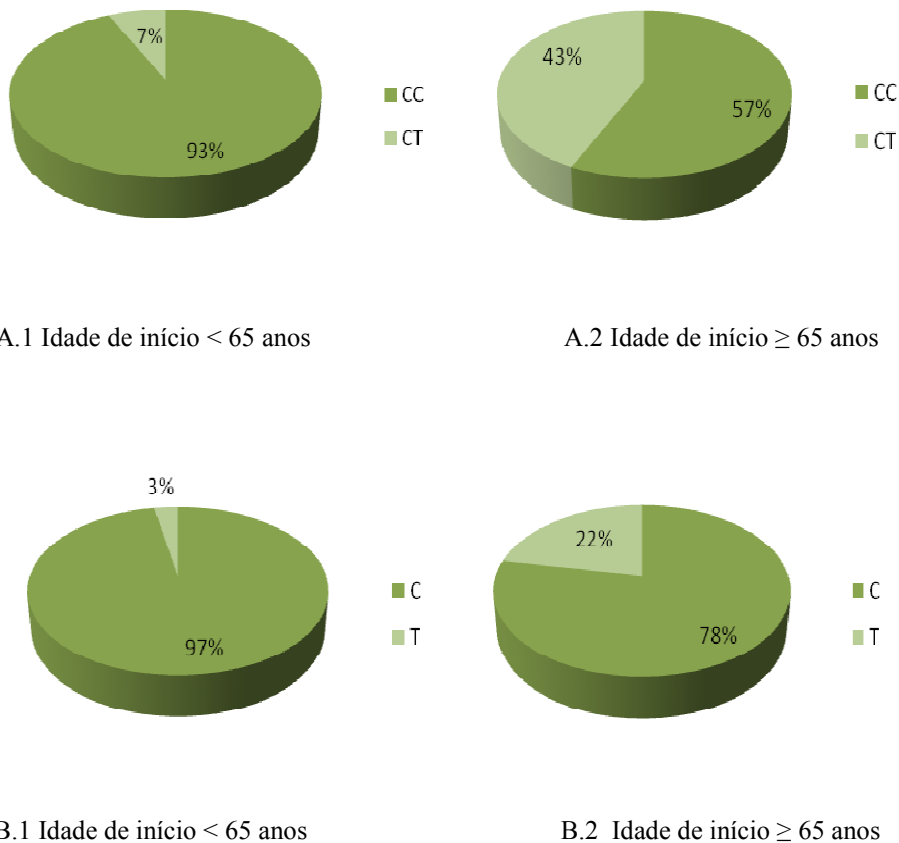
As diferenças na distribuição de frequências, tanto de genótipos, como de alelos, não são estatisticamente significativas.

### 3.2.3 Idade de início

No que diz respeito à idade de início agruparam-se os doentes com início da doença antes ou depois dos 65 anos de idade.

Verifica-se que no grupo populacional que apresenta a doença antes dos 65 anos, existe uma percentagem muito maior de indivíduos com genótipo CC. O mesmo acontece para os indivíduos que apresentam a doença aos 65 anos ou mais tarde, no entanto de forma menos acentuada (**Figura 3.5 A**).

Ao analisarmos os alelos verificamos que, também aqui a percentagem de indivíduos com o alelo C é maior quer para a idade de início da doença anterior ou posterior aos 65 anos (**Figura 3.5 B**).

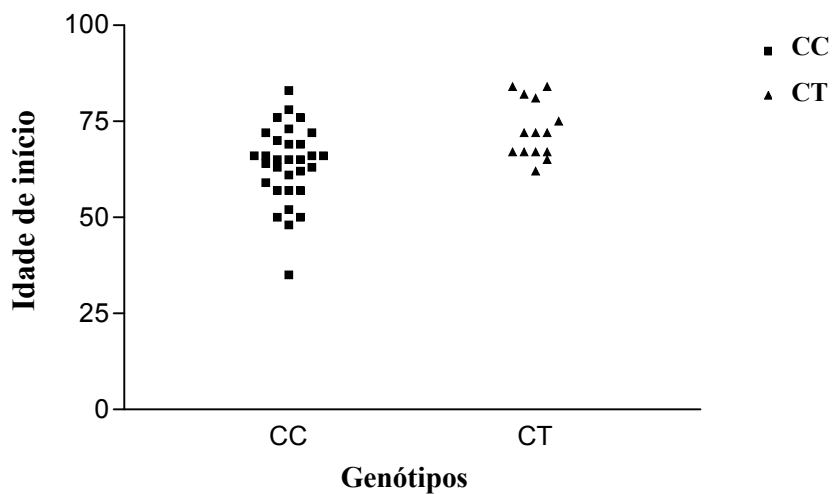


**Figura 3.5** - Distribuição dos genótipos (A) e alelos (B) consoante a idade de início da doença.



As diferenças na distribuição de frequências de acordo com a idade de início da doença, tanto de genótipos ( $p=0,0164$ ), como de alelos ( $p=0,0296$ ), para a idade de início, são estatisticamente significativas.

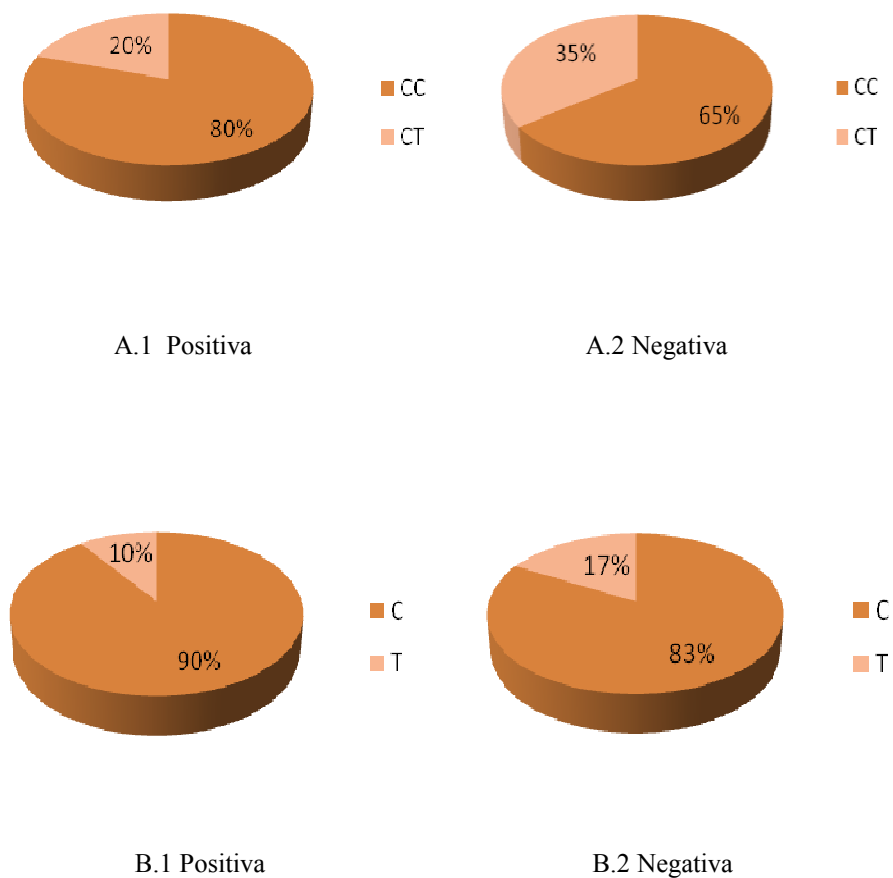
É possível ainda afirmar que, através do gráfico de dispersão (**Figura 3.6**), de uma forma geral, a maior percentagem de indivíduos com genótipo CT se situa acima dos 60 anos, enquanto que para o genótipo CC, existem indivíduos que manifestam a doença com idade inferior a 50 anos.



**Figura 3.6** - Relação da idade de início da doença com os genótipos.

### 3.2.4 Depressão

No que diz respeito à depressão os doentes foram agrupados consoante a presença ou ausência de depressão. Desta forma verifica-se, que existe uma percentagem maior de indivíduos com genótipo CC quer com depressão, quer sem depressão (**Figura 3.7 A**). O mesmo acontece, de forma mais salientada, também para os alelos, onde podemos verificar (**Figura 3.7 B**) que a frequência do alelo C é maior nos dois grupos.

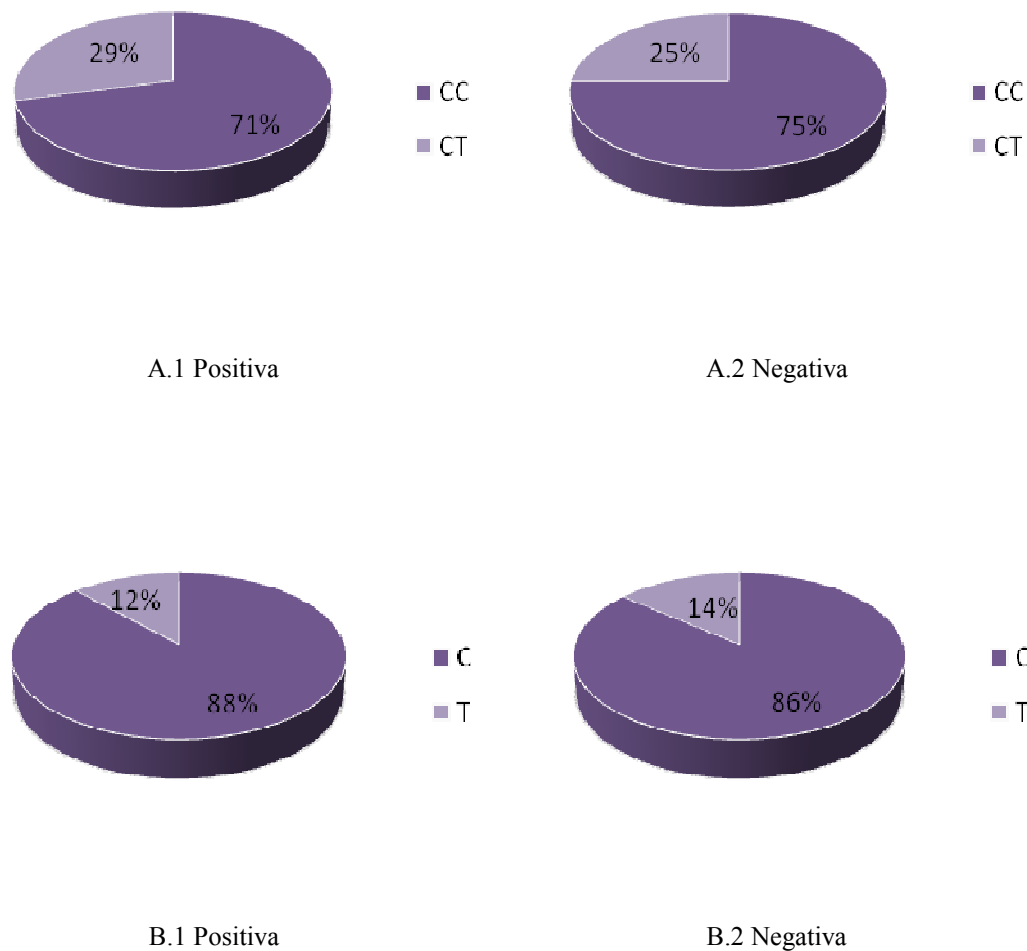


**Figura 3.7** - Distribuição dos genótipos (A) e alelos (B) consoante a presença ou ausência de depressão.

As diferenças na distribuição de frequências, tanto de genótipos ( $p=0,4799$ ), como de alelos ( $p=0,5210$ ), para a depressão não são estatisticamente significativas.

### 3.2.5 Agressão

Os resultados obtidos são semelhantes aos da análise de depressão, uma vez que, também aqui é maior a frequência de indivíduos com genótipo CC em ambos os grupos (Figura 3.8 A).

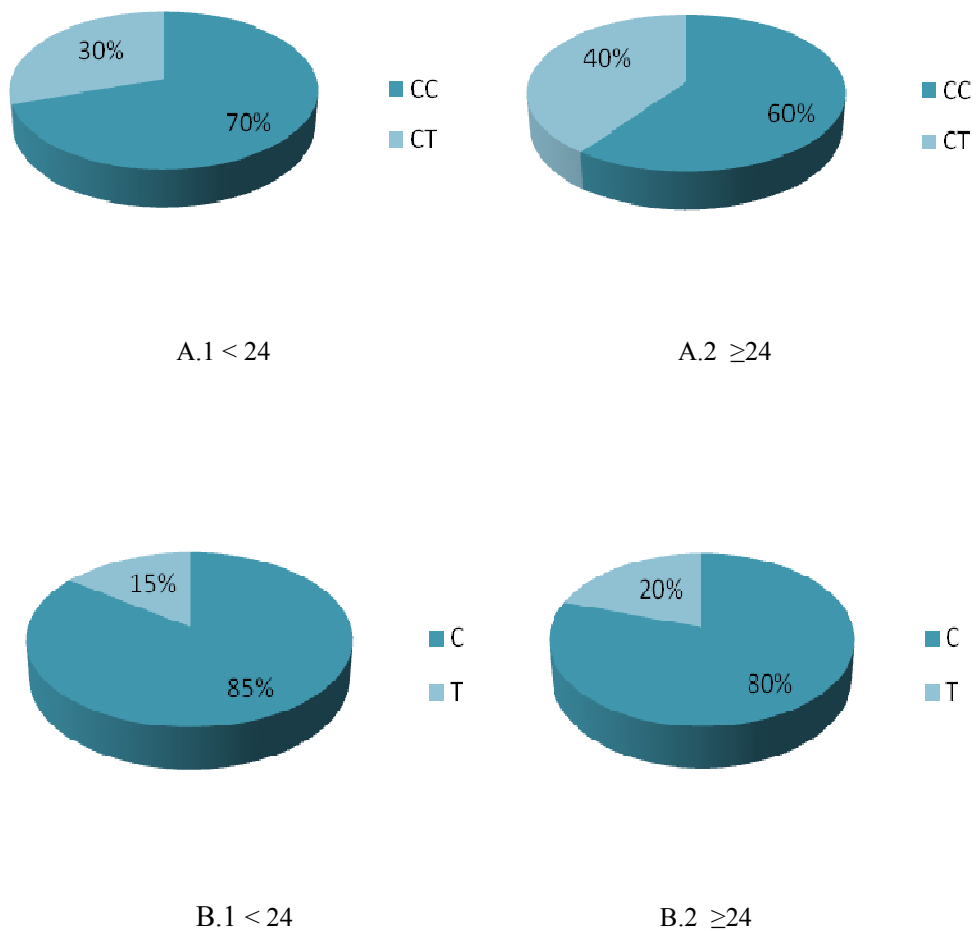


**Figura 3.8** - Distribuição dos genótipos (A) e alelos (B) consoante agressão positiva ou negativa.

As diferenças na distribuição de frequências, tanto de genótipos ( $p=1$ ), como de alelos ( $p=1$ ), para a agressão não são estatisticamente significativas.

### 3.2.6 MMSE

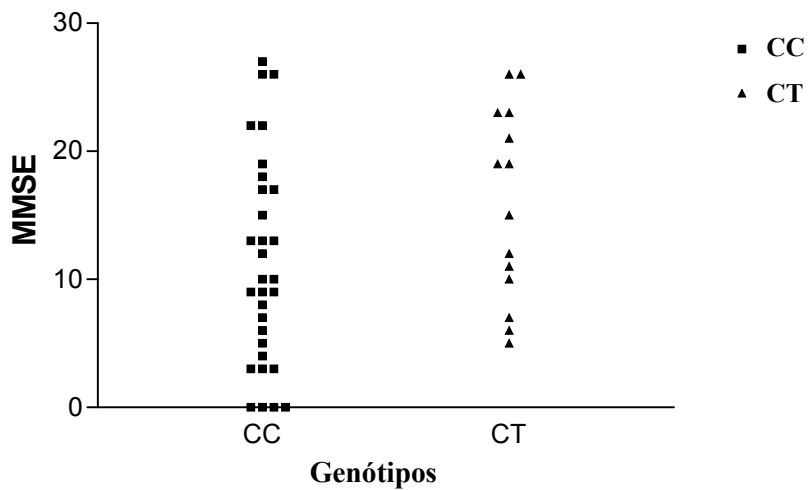
Relativamente ao MMSE, os indivíduos foram organizados também em dois grupos. Num grupo situam-se os indivíduos com valores de MMSE  $<24$  que num outro grupo os indivíduos com valores de MMSE  $\geq 24$ . Observa-se, através dos gráficos (**Figura 3.9 A**), a existência de uma maior percentagem de indivíduos com genótipo CC em ambos os grupos. O mesmo acontece no que diz respeito ao alelos, onde o alelo C é predominante (**Figura 3.9 B**).



**Figura 3.9** - Distribuição dos genótipos (A) e alelos (B) para MMSE  $< 24$  e  $\geq 24$ .

As diferenças na distribuição de frequências, de acordo com a pontuação no MMSE, tanto de genótipos ( $p=0,6394$ ), como de alelos ( $p=0,6513$ ), não são estatisticamente significativas.

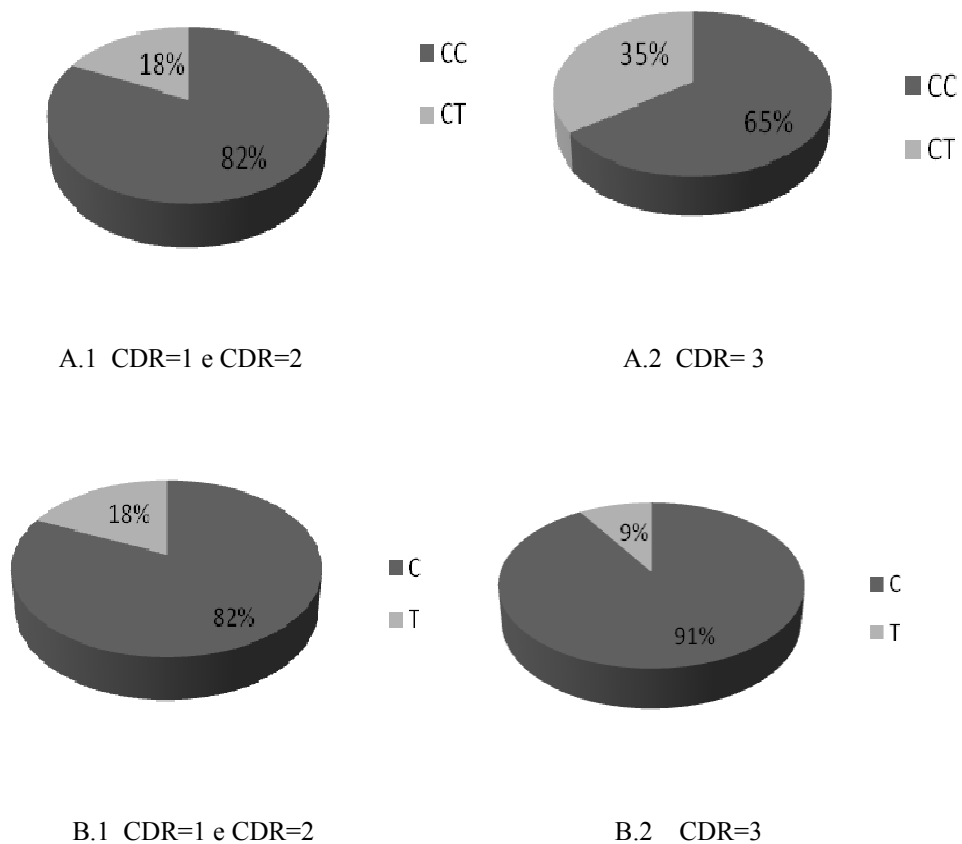
Ao observarmos o gráfico de dispersão (**Figura 3.10**), verifica-se que existem valores bastante baixos para o genótipo CC, o que não acontece para o genótipo CT. No entanto a distribuição é relativamente uniforme para ambos os genótipos.



**Figura 3.10** - Relação do MMSE com os genótipos.

### 3.2.7 CDR

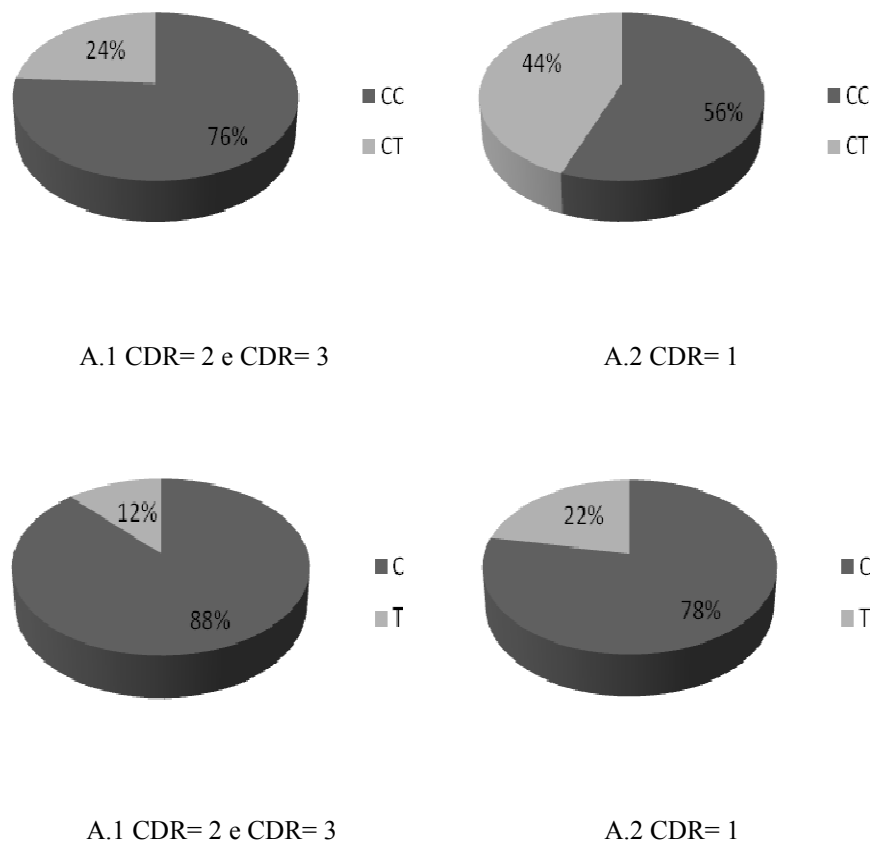
No que diz respeito aos valores de CDR, fizeram-se dois tipos de comparações. Numa primeira compararam-se os valores mais baixos 1 e 2 (demência ligeira e moderada) com o valor mais alto, 3 (demência grave). Em ambos os grupos, verifica-se que existe maior frequência do genótipo CC (**Figura 3.11 A**). O mesmo ocorre para o alelo C (**Figura 3.11 B**).



**Figura 3.11** - Distribuição dos genótipos (A) e dos alelos (B) para valores de CDR: 1 e 2 vs 3.

Para este critério, as diferenças na distribuição de frequências, tanto de genótipos ( $p=0,4578$ ), como de alelos ( $p=0,5035$ ), não são estatisticamente significativas.

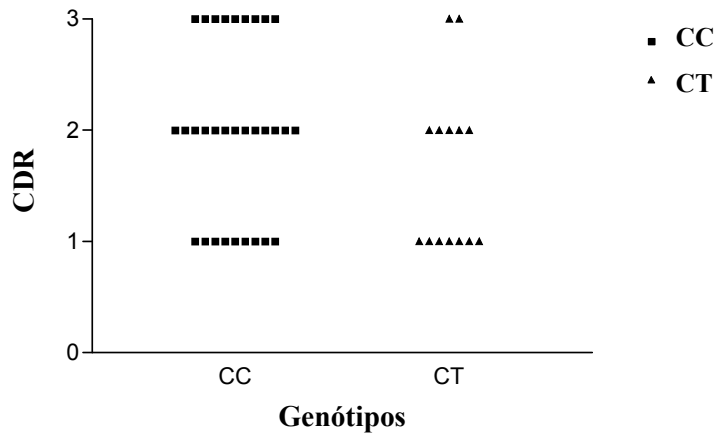
Por outro lado, pretendemos comparar valores de CDR mais altos com o valor mais baixo, ou seja, um grupo com valores de CDR 2 e 3 (demência moderada e grave, respectivamente) e um com valor 1 (demência ligeira). Observa-se que, tal como na comparação anterior, também aqui os indivíduos com genótipo CC são predominantes em ambos os grupos, ainda que de forma mais acentuada no grupo de CDR=2 e CDR=3. O mesmo se verifica para os alelos, onde mais uma vez indivíduos portadores do alelo C são preponderantes.



**Figura 3.12** - Distribuição dos genótipos (A) e dos alelos (B) para valores de CDR: 2 e 3 vs 1.

Também para esta comparação, as diferenças na distribuição de frequências, tanto de genótipos ( $p=0,1973$ ), como de alelos ( $p=0,2380$ ), não são estatisticamente significativas.

No que diz respeito ao gráfico de dispersão (**Figura 3.13**), numa primeira observação verifica-se que existem menos indivíduos com genótipo CT incluídos no grupo com CDR=3, sendo semelhante para ambos os genótipos, para os restantes valores de CDR.



**Figura 3.13** - Relação do CDR com os genótipos.



### 3.3 Análise estatística

O resumo da análise estatística aos resultados obtidos encontra-se descrito na tabela 3.2.

**Tabela 3.2** - Resultados da análise estatística para o polimorfismo 100C>T.

|                          | <b>Polimorfismo 100C&gt;T</b> |              |
|--------------------------|-------------------------------|--------------|
|                          | <b>Genótipo</b>               | <b>Alelo</b> |
| <b>Sexo</b>              | p= 0,7560                     | p= 0,7795    |
| <b>Idade de início</b>   | p= 0,0164                     | p= 0,0296    |
| <b>História familiar</b> | p= 0,7235                     | p= 0,7511    |
| <b>Depressão</b>         | p= 0,4799                     | p= 0,5210    |
| <b>Agressão</b>          | p= 1,0000                     | p= 1,0000    |
| <b>MMSE</b>              | p= 0,6394                     | p= 0,6513    |
| <b>CDR 1,2 vs 3</b>      | p= 0,4578                     | p= 0,5035    |
| <b>CDR 2,3 vs 1</b>      | p= 0,1973                     | p= 0,2380    |

\*p<0,05

## **4. Discussão de resultados**

#### 4.1 Amostragem de estudo e Frequências do alélicas

No presente estudo foram examinadas amostras de 51 doentes diagnosticados com DA provável.

Na amostra, foram encontrados 16 indivíduos heterozigóticos CT, sendo os restantes homozigóticos CC. O grupo de amostras em estudo não continha qualquer homozigótico TT. Os resultados foram confirmados por dois métodos diferentes.

O facto de não termos encontrado indivíduos homozigóticos TT pode dever-se, entre outros factores, ao facto de a população em estudo ter uma dimensão relativamente pequena.

O *CYP2D6* é, como já foi referido anteriormente, um gene altamente polimórfico e as suas frequências alélicas são bastante diferentes quer dentro de uma mesma população, quer entre diferentes grupos étnicos (Sistonen et al., 2007).

Podemos observar através da tabela 4.1, que o alelo em estudo tem uma frequência bastante baixa em quase todas as populações, sendo no Sul da Índia o local que parece apresentar uma frequência maior.

**Tabela 4.1** - Frequência do alelo *CYP2D6\*10* em diferentes populações.

| <b>População</b>          | <b>Frequência em % do alelo*10</b> | <b>Referência</b>      |
|---------------------------|------------------------------------|------------------------|
| <b>África Subsaariana</b> | 4,3                                | Sistonen et al., 2007  |
| <b>Médio Oriente</b>      | 0,7                                | Sistonen et al., 2007  |
| <b>Sul da Índia</b>       | 10,2                               | Naveen et al., 2006    |
| <b>Ásia Central</b>       | 3,8                                | Sistonen et al., 2007  |
| <b>Europa</b>             | 2,9                                | Sistonen et al., 2007  |
| <b>França e Alemanha</b>  | 2,9                                | Sistonen et al., 2009  |
| <b>Espanha</b>            | 1,9                                | Menoyo et al., 2006    |
| <b>América Central</b>    | 5,6                                | Sistonen et al., 2009  |
| <b>Brasil</b>             | 2,1                                | Kohlausch et al., 2008 |

Um outro estudo menos recente, de 1993, realizado por Wang e colaboradores, referia já que o alelo *CYP2D6\*10* ocorre numa frequência relativamente baixa, de cerca de 2-5%, em populações caucasianas e afro-americanas.

Na população portuguesa foi efectuado um estudo acerca da frequência de alguns alelos de *CYP2D6*: \*3, \*4, \*5 e \*6 (Correia, 2009), no entanto, não refere o alelo em estudo \*10.

Podemos sugerir, a partir dos estudos efectuados, que o facto de o alelo ser relativamente raro na população, pode ser também uma das razões pelas quais, não foram encontrados homozigóticos TT na população em estudo no presente trabalho.

## **4.2 Actividade metabólica de *CYP2D6* – o polimorfismo em estudo**

Cada alelo de *CYP2D6* tem a sua actividade enzimática determinada por estudos realizados *in vitro* e/ou *in vivo*. Tendo em conta os estudos realizados, o polimorfismo em estudo, rs1065852, que provoca a alteração 100 C>T, no alelo *CYP2D6*\*10, leva a uma actividade diminuída da enzima.

Um estudo efectuado para o metoprolol (usado para tratar a hipertensão e para alívio da angina de peito), indica que sujeitos homozigóticos \*10/\*10, requerem uma dosagem mais baixa quando comparados com heterozigóticos para obter a mesma eficácia terapêutica; desta forma, os homozigóticos têm maior risco de desenvolver efeitos adversos a doses padrão (Huang et al., 1999; Yue et al., 1998).

Vários estudos recentes relacionados com o tratamento de cancro da mama, têm demonstrado que o genótipo de *CYP2D6* tem um grande impacto nas concentrações plasmáticas do endoxifen, metabolito activo do tamoxifen (Goetz et al., 2007), já que doentes com genótipo *CYP2D6*\*10/\*10 mantêm níveis muito baixos de endoxifen, levando a uma duração mais curta do tratamento (Lim et al., 2007).

Um outro estudo semelhante, realizado por Xu et al. (2008), refere que o genótipo *CYP2D6*\*10 afecta a eficácia do tratamento com tamoxifen em mulheres chinesas; mulheres com genótipo T/T parecem ter uma evolução clínica pior quando recebem tratamento com tamoxifen.

Num estudo realizado por Lee et al. (2004), foi referido o caso de um doente que apresentava um genótipo *CYP2D6*\*5/*CYP2D6*\*10, que resulta num fenótipo IM. Para este doente, o tratamento com doses padronizadas, durante um mês, levou a que fosse

atingido um nível plasmático tóxico, provocando vários efeitos secundários. Após a genotipagem, a dose do medicamento foi reduzida, tendo o doente registado uma melhoria no seu estado clínico e uma diminuição dos efeitos secundários.

De acordo com Wang et al. (2006) o alelo *CYP2D6\*10* parece ser relativamente frequente na população Chinesa (51 a 70%). No seu estudo, acerca do controlo da dor pós-operatória, com Tramadol, demonstrou que alelos de *CYP2D6* podem estar associados a uma diferença de alívio da dor pós-operatória na população chinesa. Os resultados do estudo demonstraram que os indivíduos saudáveis portadores de um alelo *CYP2D6\*10* têm uma semi-vida significativamente maior no plasma após uma única dose, quando comparados com indivíduos portadores do *wild type*, o que sugere que a substituição de aminoácido, P34S, leva a uma redução na velocidade de depuração do tramadol. Portanto este estudo demonstrou que polimorfismo *CYP2D6\*10* tem um impacto significativo sobre a eficácia no controlo da dor pós-operatória com tramadol.

Yagihashi, em 2009, concluiu que o polimorfismo *CYP2D6\*10* exerce também influências significativas na farmacocinética da risperidona, em pacientes com esquizofrenia.

Tendo em conta estes estudos e outros semelhantes, sabe-se actualmente que, os referidos polimorfismos genético de *CYP2D6* podem influenciar a concentração plasmática de uma ampla variedade de fármacos, metabolizados pelas CYP450, ao nível hepático, incluindo os fármacos utilizados no tratamento da DA.

Ainda que se trate de um trabalho preliminar e com as limitações inerentes, consideramos que o presente estudo é relevante, na medida em que é original, pelo facto de, tanto quanto é do nosso conhecimento, não existirem referências na literatura a estudos para este polimorfismo e o seu impacto na doença de Alzheimer.

Com base no presente estudo, e tendo em conta os fenótipos de metabolização existentes, pode afirmar-se que, metabolizadores mais lentos, podem produzir metabolitos com relevância no aparecimento da DA, uma vez que portadores deste alelo apresentam a forma mais tardia da doença.

A análise estatística realizada no presente estudo, para as diversas características demonstrou que não existem diferenças significativas na distribuição de frequências genotípicas e alélicas, excepto para a idade de início.

Os nossos resultados mostram que os indivíduos com o genótipo CT são mais frequentes no grupo de idade de início tardio da DA, revelando que o alelo T está associado ao aparecimento da DA numa idade mais avançada. Deste modo, o alelo T

poderá ser benéfico para os seus portadores, estando associado a um risco inferior para a doença.

Assim, tendo por base o nosso estudo e outros referidos, acreditamos que uma análise do genótipo de *CYP2D6\*10* pode vir a ser útil na identificação de doentes que são mais susceptíveis de beneficiar com um tratamento específico. No entanto, são necessários mais estudos, com amostragens maiores, para confirmar todos os resultados e esta hipótese.

## **5. Conclusões finais**

O objectivo deste trabalho era investigar a associação entre o SNP rs1065852, ou 100C>T, com algumas características de doentes com DA. Com este propósito, analisou-se o genótipo do referido polimorfismo.

Apesar do estudo pretender ser o mais completo possível, apresenta algumas limitações. É importante salientar que o estudo engloba apenas 51 doentes.

A distribuição das frequências genótípicas e alélicas não revelou diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito ao sexo, história familiar, depressão, agressão, MMSE e CDR dos doentes estudados. Quanto à idade de início da doença, verificou-se que os doentes com DA que são portadores do alelo T manifestaram a doença mais tardiamente. Deste modo, estes doentes, com a actividade da enzima reduzida, parecem ter um factor protector para a doença. Tal facto pode ter importância aquando do tratamento da doença.

As diferenças quanto às respostas terapêuticas entre os indivíduos geralmente estão associadas a polimorfismos genéticos presentes em genes que afectam a farmacocinética ou a farmacodinâmica, podendo levar, por um lado, a uma eficácia diferente no tratamento mas por outro a toxicidade.

Acreditamos que a genotipagem da *CYP2D6* dos doentes, antes do início do tratamento da doença de Alzheimer, poderá identificar o tipo de metabolização do indivíduo, avaliando a eficácia terapêutica dependendo do genótipo. Assim sendo, encontrar um conjunto de marcadores genéticos de grande relevância clínica pode ser um passo fundamental antes de serem tomadas decisões terapêuticas, de forma a maximizar a eficácia.

Apesar de a farmacogenética ser um campo de pesquisa ainda em desenvolvimento, pode trazer inúmeros benefícios. Desta forma, estudos como o que apresentamos são uma contribuição importante.

Só desta forma se poderá abrir caminho para uma terapia ajustada e por isso mais eficaz. Ou seja, se for conhecido o genótipo do doente quando este chega ao clínico, pode ser tratado segundo as características genéticas que apresenta permitindo que tenha um tratamento ajustado e orientado para as suas necessidades.

Por outro lado os resultados obtidos no presente estudo sugerem que um padrão de metabolização lento, relativamente à exposição a xenobióticos, representa um factor protector relativamente à idade de início da Doença de Alzheimer.



## **6. Referências bibliográficas**

- American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, ed 4th. Washington, APA, 1994.
- Apelt J, Bigl M, Wunderlich P, Schliebs R. (2004) Agingrelated increase in oxidative stress correlates with developmental pattern of beta-secretase activity and beta-amyloid plaque formation in transgenic Tg2576 mice with Alzheimerlike pathology. *Int J Dev Neurosci* 22: 475–484.
- Arias C, Montiel T, Quiroz-Baez R, Massieu L. (2002) beta-Amyloid neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus in vivo and in isolated nerve terminals: implications for Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 176: 163–174.
- Bertram L. (2002) The Genetics of Alzheimer's Disease, *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 89 (3rd series).
- Blass J. (2001) Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia? *J Neurosci Res* 66: 851–856.
- Bradford L. (2002) *CYP2D6* allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics* 3: 229-43.
- Cacabelos R. (2002) Pharmacogenomics in Alzheimer's Disease, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 59-84.
- Cardoso S, Santana I, Swerdlow RH, Oliveira CR. (2004) Mitochondria dysfunction of Alzheimer's disease cybrids enhances A $\beta$  toxicity. *J Neurochem* 89: 1417–1426.
- Casley CS, Canevari L, Land JM, Clark JB, Sharpe MA. (2002) Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J Neurochem* 80: 91–100.
- Castellani R, Hirai K, Aliev G, Drew KL, Nunomura A, Takeda A, Cash AD, Obrenovich ME, Perry G, Smith MA. (2002) Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 70: 357–360.
- Castellani RJ, Honda K, Zhu X, Cash AD, Nunomura A, Perry G, Smith MA. (2004) Contribution of redox-active iron and copper to oxidative damage in Alzheimer disease. *Ageing Res Rev* 3: 319–326.
- Clarke S. (1998) In vitro assessment of human cytochrome P-450. *Xenobiotica* 28: 1167-1202.
- Coen DM, Kramer MF, Dorit RL, Ohara O, Hwang CB-C, Beverley SM, Mueller PR, Wold B, Garrity PA, Finney M, Nisson PE, Rashtchian A, Liang P, Pardee AB. (1997) The Polymerase Chain Reaction, in: *Current Protocols in Molecular*

- Biology. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds), John Wiley & Sons 15: 15.0.1-15.8.8.
- Correia C, Santos P, Coutinho A, Vicente A. (2009) Characterization of pharmacogenetically relevant CYP2D6 and ABCB1 gene polymorphisms in a Portuguese population sample. *Cell Biochem Funct* 27: 251–255.
- Couch FJ, Lingle WL, et al. (2007) The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 101: 113–121.
- Crowther J. (1995) *Methods in Molecular Biology- ELISA: Theory and Practice*, Human Press, Volume 42.
- Cruz V, Pais J, Teixeira A, Nunes B. (2004) Sintomas iniciais de demência de Alzheimer, a percepção dos familiares. *Acta Med Port* 17: 43-444.
- Daniel W et al. (1987) The P450 Gene Superfamily: Recommended Nomenclature. *DNA* Volume 6, Number I, Mary Ann Liebert, Inc., Publishers: 1-11.
- Ding X, Kaminsky L. (2003) Human extrahepatic cytochromes P-450: Function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 149-173.
- Eckert A, Keil U, Marques CA, Bonert A, Frey C, Schussel K, Muller WE. (2003) Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* 66: 1627–1634.
- Evans W, Relling M. (1999) Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286(5439): 487-91.
- Fairchild A, Lee M, Maurer J. (2002) *PCR Basics*, Chapter 1.
- Feldman H, Gracon S. (1996) Alzheimer's disease: symptomatic drugs under development. In *Clinical Diagnosis and Management of Alzheimer's Disease* (ed. S. Gauthier), 239-259.
- Ferri C et al. (2005) Alzheimer's Disease International, Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366: 2112–17.
- Folstein M., Folstein S., McHugh P. (1975) "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatric Res.* 12(3): 189-98.
- Fratiglioni L, Grut M, Forsell Y et al. (1991) Prevalence of Alzheimer's disease and other dementias in an elderly urban population: Relationship with age, sex and education. *Neurology* 41: 1886-1892.

- Goetz MP, Knox SK, Suman VJ, Rae JM, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, Reynolds C. (2007) The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *101*(1): 113-2.
- Graham S, Peterson J. (1999) How similar are P-450s and what can their differences teach us. *Arch Biochem Biochem Biophys* 369: 24-29.
- Grazina et al. (2006) Genetic basis of Alzheimer's dementia: role of mtDNA Mutations. *Genes, Brain and Behavior* 5 (Suppl. 2): 92–107.
- Griffiths. (2005). Introduction to genetic analysis. 8th Edition, W. H. Freeman. New York and Basingstoke.
- Hardy J, Selkoe D, (2002) The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road of therapeutics, *Science* 297: 353-356.
- Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak SL, Harris PL, Jones PK, Petersen RB, Perry G, Smith MA. (2001) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21: 3017–3023.
- Honkakoski P & Negishi M. (2000) Regulation of cytochrome P-450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J* 347: 321-37.
- Huang J, Chuang SK, Cheng CL, Lai ML (1999) Pharmacokinetics of metoprolol enantiomers in Chinese subjects of major CYP2D6 genotypes. *Clin Pharmacol Ther* 65: 402–407.
- Iqbal K, Alonso AC, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H. & Grundke-Iqbal I. (2005) *Tau* pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739: 198–210.
- Kim J, Lee HJ, Lee KW. (2010). Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 112: 1415-1430.
- Kirchheiner J, Seeringer A, Brockmoller J. (2006) State of the art of pharmacogenetic diagnostics in drug therapy. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 49 (10): 995-1003.
- Kotlyar M & Carson SW. (1999) Effects of obesity on the cytochrome P-450 enzyme system. *Int J Clin Pharmacol* 37: 8-19.
- LaFerla FM. (2002) Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 3: 862–872.

- Lambert, Jean-Charles, Amouyel, Philippe, (2007) Genetic heterogeneity of Alzheimer's disease: Complexity and advances, *Psychoneuroendocrinology* 32: 62–70.
- Lee HC & Wei YH. (1997) Role of mitochondria in human aging. *J Biomed Sci* 4: 319–326.
- Lim HS, Ju LH, Seok LK, Sook LE, Jang IJ, Ro J. (2007) Clinical implications of *CYP2D6* genotypes predictive of tamoxifen pharmacokinetics in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 25: 3837–3845.
- Llerena et al. (2005) Development of a PCR-based strategy for *CYP2D6* genotyping including gene multiplication of worldwide potential use. *BioTechniques* 39: 571-574.
- Lydia et al. (1997) Processing of presenilin 1 in brains of patients with Alzheimer's disease and controls, *Genetics of Nervous System Disease*.
- Ma M, Woo M, McLeod H. (2002) Genetic basis of drug metabolism. *Am J Health Syst Pharm* 59: 206 1-2069.
- Mark RJ, Lovell MA, Markesbery WR, Uchida K & Mattson MP. (1997) A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta-peptide. *J Neurochem* 68: 255–264.
- Masters C, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins R, Beyreuther K. (1985) Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *The EMBO Journal*, vol. 4 n° 11: 2757 – 2763.
- Mattson MP & Chan SL. (2003) Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium* 34: 385–397.
- Mattson MP. (1997) Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 77: 1081–1132.
- Mattson MP. (2004a) Metal-catalyzed disruption of membrane protein and lipid signaling in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1012: 37–50.
- Mattson MP. (2004b) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430: 631–639.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease. Report of the NINCDS-ARDA work

- group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* 34: 939–944.
- Meibohm B, Beierle I, Derendorf H. (2002) How importante are gender differences in pharmacokinetics? *Clin Pharmacokine* 41: 329-342.
- Menoyo A, Elisabeth del Rio, Montserrat B. (2006) Characterization of variant alleles of cytochrome CYP2D6 in a Spanish population. *Cell biochemistry and function* 24: 381–385.
- Moreira P, Pereira C, Santos MS & Oliveira C. (2000) Effect of zinc ions on the cytotoxicity induced by the amyloid betapeptide. *Antioxid Redox Signal* 2, 317–325.
- Nelson D. (1999) Cytochrome P-450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys* 369: 1-10.
- Parihar M, Hemnani, Taruna. (2004) Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions, *Journal of Clinical Neuroscience*, Volume 11, Issue 5: 456-467.
- Pascale N et al. (2004) Synaptic Targeting by Alzheimer's-Related Amyloid  $\beta$  Oligomers. *The Journal of Neuroscience* 24(45): 10191–10200.
- Pelkonen O & Breimer DD. (1994) Role of environmental factors in the pharmacokinetics of drugs: considerations with respect to animal models, P-450 enzymes, and probe drugs. In: Welling PG, Balant LP editors. *Handbook of experimental pharmacology*, vol 110. Heildelberg: Springer-Verlag: 289-322.
- Pereira C, Agostinho P, Moreira PI, Cardoso SM & Oliveira CR. (2005) Alzheimer's disease-associated neurotoxic mechanisms and neuroprotective strategies. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4: 383–403.
- Pericak-Vance M et al. (1993) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Volume 90, Issue 5: 1977-1981.
- Perl D. (2010) *Neuropathology of Alzheimer's Disease*. *Mount Sinai Journal of Medicine* 77: 32-42.
- Perry G, Smith M. (2005) *Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative diseases*. University of Ohio Case Western Reserve University Cleveland, Ohio, TND.

- Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat (2009). World Population Prospects: The 2008 Revision. Highlights. New York. United Nations.
- Praticò D. (2005) Peripheral biomarkers of oxidative damage in Alzheimer's disease: the road ahead. *Neurobiol Aging* 26: 581–583.
- Rogers JF, Nafziger NA, Bertino JS Jr. (2002) Pharmacogenetics affects dosing, efficacy, and toxicity of cytochrome P450-metabolized drugs. *Am J Med* 15; 113(9):746-50.
- Rogers JT & Lahiri DK. (2004) Metal and inflammatory targets for Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets* 5: 535–551.
- Rozen S, Skaletsky H. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers, in: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (Krawetz S, Misener S, eds), Totowa, NJ, Humana Press, 2000, pp 365-386, [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).
- Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, et al. (1997) Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 60: 284-95.
- Sakuyama K, Sasaki T, Ujiiie S, et al. (2008) Functional characterization of 17 CYP2D6 allelic variants (CYP2D6.2, 10, 14A-B, 18, 27, 36, 39, 47-51, 53-55, and 57). *Drug Metab Dispos* 36: 2460-7.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 (12): 5463-5467.
- Schenk D. et al. (1999) Immunization with amyloid- $\beta$  attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse, *Nature* 400: 173-177.
- Selkoe DJ. (2004) Alzheimer disease: Mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann Intern Med* 140: 627-638.
- Selkoe DJ. (2004). Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. American College of Physicians American Physiological Society *Ann Intern Med* 140: 627–638.
- Shu-Feng Zhou. (2009) Polymorphism of Human Cytochrome P450 2D6 and Its Clinical Significance, Part I. *Clin Pharmacokinet* 48 (11): 689-723.
- Siegel. *Basic Neurochemistry - Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 7<sup>th</sup> Edition. Academic, 2006.

- Sistonen J, Sajantila A, Lao O, Corander J, Barbujani G, Fuselli S. (2007) *CYP2D6* worldwide genetic variation shows high frequency of altered activity variants and no continental structure. *Pharmacogenet Genomics* 17 (2): 93-101.
- Sullivan PG & Brown MR. (2005) Mitochondrial aging and dysfunction in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29: 407-410.
- Venter J, Adams M, Myers E, Li P, Mural R, Sutton G et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291(5507): 1304-51.
- Verdile, Giuseppe et al. (2004) The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught, *Pharmacological Research* 397-409.
- Walsh DM & Selkoe DJ. (2004a) Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44: 181-193.
- Walsh DM. & Selkoe DJ. (2004b) Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein Pept Lett* 11: 213-228.
- Wang G, Zhang H, He F, Fang X. (2006) Effect of the *CYP2D6\*10* C188T polymorphism on postoperative tramadol analgesia in a Chinese population. *Eur J Clin Pharmacol* 62: 927-931.
- Wang S, Huang J, Lai M et al. (1993) Molecular basis of genetic variation in debrisoquin hydroxylation in Chinese subjects: polymorphism in RFLP and DNA sequence of *CYP2D6*. *Clin Pharmacol Ther* 53: 410-8.
- Werck-Reichhart D, Feyereisen R, (2001) Cytochromes P-450: a success story. *Gen Biol* 1: 1-8.
- Wimo A, Winblad B, Grafstrom M. (1999) The social consequences for families with Alzheimer's disease patients: potential impact of new drug treatment. *Int J Geriatr Psychiatry* 14: 338-47.
- Xu et al. (2008) Association between *CYP2D6* \*10 genotype and survival of breast cancer patients receiving tamoxifen treatment. *Annals of Oncology* 19: 1423-1429, doi:10.1093/annonc/mdn155.
- Yue QY, Zhong ZH, Tybring G, Dale'n P, Dahl ML, Bertilsson L, and Sjöqvist F (1998) Pharmacokinetics of nortriptyline and its 10-hydroxy metabolite in Chinese subjects of different *CYP2D6* genotypes. *Clin Pharmacol Ther* 64: 384-390.