



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA / RENORBIO

RAFAELLA PAPALINO LOPES MAGNAGO

**ASPECTOS CLÍNICOS E GENÉTICOS EM UMA
POPULAÇÃO DE IDOSOS PORTADORES DE
ALTERAÇÕES COGNITIVAS**

VITÓRIA
2018

RAFAELLA PAPALINO LOPES MAGNAGO

**ASPECTOS CLÍNICOS E GENÉTICOS EM UMA
POPULAÇÃO DE IDOSOS PORTADORES DE
ALTERAÇÕES COGNITIVAS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ian Victor Silva.

VITÓRIA
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)
Bibliotecário: Rafael Lima de Carvalho – CRB-6 MG-002926/O

M196a Magnago, Rafaella Papalino Lopes, 1980 -
Aspectos clínicos e genéticos em uma população de idosos portadores
de alterações cognitivas / Rafaella Papalino Lopes Magnago - 2018.
108 f. : il.

Orientador: Ian Victor Silva.
Coorientador: Fernando Luiz Herkenhoff Vieira.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Demência. 2. Apoproteína(a). 3. Estrogênios. 4. Doença de Alzheimer.
I. Silva, Ian Victor. II. Vieira, Fernando Luiz Herkenhoff. III. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

ASPECTOS CLÍNICOS E GENÉTICOS EM UMA POPULAÇÃO DE IDOSOS PORTADORES DE ALTERAÇÕES COGNITIVAS

Rafaella Papalino Lopes Magnago

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (RENORBIO) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de conhecimento Saúde.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ian Victor Silva
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Prof. Dr. Fernando Luiz Herkenhoff Vieira
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Prof. Dr. Valério Garrone Barauna
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Profa. Dra. Luciene Cristina Gastalho Campos
Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À UFES, por oportunizar o desenvolvimento deste estudo.

Ao Prof. Dr. Ian Victor Silva pelo apoio e oportunidade que me proporcionou ao me orientar neste trabalho.

Aos colegas de doutorado, em especial a doutoranda Bruna Brun e Dra. Nayara Tessarolo pelo apoio, na fase angustiante dos experimentos de biologia molécula e ao Prof. Dr. Valério Garrone Barauna, pelo apoio incondicional, contribuindo com sua experiência, que foi fundamental para realização dos experimentos biomoleculares juntamente com seus alunos que gentilmente cederam-nos o seu laboratório, para fins experimentais.

À amiga e mentora Dra. Neuza Gomes Félix Rochette pelos conselhos e correções durante o processo de criação desta tese e à colaboradora Luciene Bessone Oliveira, responsável técnica pelo laboratório de histotécnica do departamento de morfologia da UFES, que sempre gentilmente me recebia para preparação de material durante a realização dos experimentos iniciais.

Ao LABIOM – UFES, na pessoa do Prof. Dr. Alexandre Martins, pelo acolhimento do projeto e a sessão de espaço e maquinário para a realização dos experimentos biomoleculares.

À minha família, em especial a minha avó já falecida, que foi portadora da doença de Alzheimer e grande inspiração para minha formação acadêmico-profissional.

À Minha mãe, apoiadora incondicional dos meus estudos, meus filhos e marido que entenderam meus momentos de ausência.

À prefeitura municipal de Vila Velha e Vitória que cederam campo e disponibilidade de seus funcionários para esta pesquisa

A todos os pacientes idosos que voluntariamente confiaram e participaram desta pesquisa, beneficiando uma nova geração de conhecimento.

A todos os colegas do Curso de Pós-Graduação, pela atenção, união e companheirismo, durante todo o tempo em que estivemos juntos.

RESUMO

O envelhecimento é um fenômeno mundial já estabelecido na América do Norte, Europa e em franco crescimento em países em ascensão econômica como o Brasil, Índia e China. A doença de Alzheimer é o tipo de demência mais prevalente, cerca de 60% das demências são do tipo Alzheimer, o desenvolvimento deste estudo em busca de elucidar sua patogênese das demências levou os dados da doença de Alzheimer como base de discussão. O presente trabalho, teve como objetivo reconhecer dados epidemiológicos e biológicos diretamente ligados à demência. Realizou-se a busca na comunidade da grande Vitória, de idosos portadores ou não de perda cognitiva. A população foi dividida em dois grupos, controle (GC) e caso (SHAZ), de acordo com análise de dois testes preditivos de demência (MEEM e CDR). A partir de então, foram analisados dados clínicos, buscando a prevalência de doenças crônicas, o lipidograma de exames recentes dos indivíduos, um exame físico de índices preditivos de obesidade como peso, percentual de gordura, IMC, perímetria, força de preensão manual e medida de capacidade funcional. Junto feita coleta de sangue para análises de DNA e presença de polimorfismos dos genes ApoE, ERS1 para receptor de estrogênio α e PON1 (*rs622* e *rs705379*). Os resultados obtidos sugeriram que doenças crônicas como a dislipidemia e hipertensão são fatores de risco no desenvolvimento de demência, bem como a idade. O IMC pode ser considerado abaixo do padrão para correlacionar com a doença. Já a capacidade funcional é dependente direta do fator cognição e a atividade física pode retardar o aparecimento da doença. A presença de fatores genéticos ligados a fatores ambientais existem e precisam ser ainda melhor elucidados. O alelo E3 e E4 da ApoE são alelos diretamente relacionados com a doença e sugere-se que sejam dependentes do fator idade e possíveis marcadores de vulnerabilidade. A sinergia entre o alelo E4 de ApoE com os polimorfismos de ER α (PP, pp) e PON 1 (*rs622-AA1* e *rs705379-AG2* e GG2) podem ser sugeridos como biomarcadores, aumentando entre 3,2 a 5 vezes mais as chances de desenvolvimento da mesma, coexistindo múltiplos fatores que tem importância na patogênese desta doença cada vez mais prevalente na população idosa mundial.

Palavras-chave: Demência, Doença de Alzheimer, Funcionalidade, Apoproteína E, Receptor de Estrogênio e Paroxosanase I.

ABSTRACT

Aging is a global phenomenon already established in North America, Europe and in steady growth in countries in economic growth such as Brazil India and China. In Brazil, the changes occur in a radical and accelerated way. Alzheimer's disease is the most prevalent type of dementia, about 60% of dementias are Alzheimer's, the development of studies seeking to elucidate its pathogenesis has gained wide attention. The present study aimed to recognize epidemiological and biological data directly linked to dementia to prospect for updated forms of diagnosis not only by clinical signs that are more accessible and less invasive to the population. A search was made in the community of the great victory, of elderly people with or without cognitive loss. The population was divided into two groups, control (GC) and case (SHAZ), according to analysis of two predictive dementia tests (MMSE and CDR). From then on, clinical data were analyzed, searching for the prevalence of chronic diseases, the lipidogram of recent examinations of the individuals, a physical examination of predictive indexes of obesity as weight, percentage of fat, BMI, perimetry, of functional capacity, together with blood collection for DNA analysis and presence of polymorphisms of the genes ApoE, ERS1 for estrogen receptor α and PON1 (*rs622* and *rs705379*). The results suggest that chronic diseases such as dyslipidemia and hypertension are risk factors in the development of dementia as well as age. The weight and the patterns of evaluation of obesity may have relation with the pathogenesis, however in this work, its interrelation is not clear. BMI can be considered substandard to correlate with disease. Functional capacity is dependent on the cognition factor and physical activity may delay the onset of the disease. The presence of genetic factors, linked to environmental factors exist and need to be further elucidated. The ApoE E3 and E4 alleles are alleles directly related to the disease and are suggested to be age dependent and biomarkers of vulnerability. The synergism between the ApoE E4 allele with ERS1 polymorphisms (PP, pp) and PON 1 (*rs622-AA1* and *rs 705379-AG2* and *GG2*) may be suggested as biomarkers, increasing between 3.2 and 5 times the odds of its development, coexisting multiple factors that have importance in the pathogenesis of this disease more and more prevalent in the elderly population worldwide.

Key words: Dementia, Alzheimer's Disease, Functionality, Apoprotein E, Estrogen Receptor and Paroxosanase I.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIVD	Atividade Instrumental de Vida Diária
ApoA1	Apolipoproteína A1
ApoE	Apolipoproteína E
ApoE4	Apolipoproteína E alelo 4
APP	Proteína Precursora Amilóide
AVC	Acidente vascular cerebral
AVI	Anos vividos com incapacidade
CDR	Avaliação Clínica da Demência
DA	Doença de Alzheimer
DAIT	Doença de Alzheimer de Início Tardio
DAIP	Doença de Alzheimer de Início Precoce
DP	Doença de Parkinson
DV	Demência Vascular
DVC	Doença cardiovascular
ENF	Emaranhados neurofibrilares
EPM	Erro padrão da media
ERs	Receptor de Estrogênio
ER α	Receptor de Estrogênio α
ER β	Receptor de Estrogênio β
ESR1	Receptor de Estrogênio 1
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HR	Hazard ratio
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
ILPI	Instituição de Longa Permanência para Idosos

LDL	Lipoproteína de densidade baixa
MEEM	Mini Exame do Estado Mental
PPA	Proteína precursora amilóide
RCQ	Relação Cintura Quadril
SHAZ	Sangue Humano Alzheimer /Grupo Caso
SNC	Sistema Nervoso Central
TER	Terapia de reposição de estrogênio
β A	Proteína beta-amilóide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Placas e Emaranhados Neurofibrilares no Córtex Cerebral em pacientes com Doença de Alzheimer-----	21
Figura 2 - Apresentação das Isoformas da ApoE-----	27
Figura 3 - Distribuição e ações das isoformas de ApoE relacionados a prevalência de DA-----	28
Figura 4 - O papel proposto da PON1 em doenças neurovasculares-----	34
Figura 5 - O papel da PON1 em doenças neurodegenerativas-----	35
Figura 6 - Gel de agarose contendo DNA genômico-----	39
Figura 7 - Produto de PCR amplificado para fragmentos de ApoE-----	41
Figura 8 - Produto de PCR amplificado para fragmentos de ERS1-----	42
Figura 9 - Gradiente de temperatura para <i>PON rs662</i> em gel de agarose-----	44
Figura 10 - Gradiente de temperatura para <i>PON rs705379</i> em gel de agarose-----	45
Figura 11 - Comparação das variáveis Peso e Peso Magro-----	53
Figura 12 - Comparação das variáveis percentual de gordura total e excedente-----	54
Figura 13 - Comparação do nível cognitivo, grau de comprometimento e funcionalidade-----	63
Figura 14 - Comparação da Força de Preenção Direita e Esquerda-----	58
Figura 15 - Comparação do Índice de Massa Corpórea (IMC)-----	59
Figura 16 - Níveis de Colesterol Total-----	60
Figura 17 - Níveis de Triglicérides-----	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição de Renda da População Estudada-----22

Gráfico 2 - Gráfico *PON* rs662 (A>G): Gráfico da fluorescência normalizada pela temperatura-----44

Gráfico 3 - Gráfico do Teste no HRM para *PON* rs705379 (A>G): Gráfico da fluorescência normalizada pela temperatura-----45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers ApoE, Sense e Anti Sense-----	50
Tabela 2 - Padrões de bandas específicas de digestão para o fragmento de 244 pb amplificado a partir do gene da Apolipoproteína E (ApoE)-----	51
Tabela 3 - Primers da região do íntron 1 do ERS1 contendo os SNPs Pvull e XbaI utilizados neste estudo-----	52
Tabela 4 - Padrões de bandas específicas de digestão para o fragmento de 119 pb amplificado a partir do gene ERS1: Sítio de restrição reconhecido pelas enzimas-----	53
Tabela 5 - Primers PON1(<i>rs622</i> e <i>rs705349</i>)-----	56
Tabela 6 - Apresentação Sociodemográfica da População Estudada-----	59
Tabela 7 - Apresentação Clínica da População Estudada-----	61
Tabela 8 - Correlação entre MEEM, CDR E AIVD com antropometria-----	62
Tabela 9 - Correlação entre MEEM, CDR E AIVD com perimetria em centímetros-----	64
Tabela 10- Correlação entre MEEM, CDR e AIVD com preditores de obesidade, risco cardiovascular e apreensão-----	66
Tabela 11 - Correlação entre MEEM, CDR E AIVD com parâmetros bioquímicos do lipidograma-----	67
Tabela 12 - Regressão logística com variáveis demográficas e doenças crônicas-----	76
Tabela 13 - Descrição das proporções dos genes entre gêneros-----	79
Tabela 14 - Distribuição dos alelos da ApoE entre os sexos nos grupos caso e controle-----	90
Tabela 15 - Distribuição dos Genótipos de ERS1 e PON1 entre os sexos nos grupos caso e controle-----	91
Tabela 16 - Frequências e porcentagens presentes em cada grau de evolução da doença, indicado pela variável CDR-----	92
Tabela 17 - Teste de associação entre os genes e os grupos-----	93
Tabela 18 - Teste de associação entre os genes e os grupos, separados pela variável Sexo-----	94
Tabela 19 - Modelo de regressão binária para análise de interação entre genótipos-----	95

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO-----	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA-----	19
2.1	<i>Distúrbios Cognitivos em Idosos e a Doença de Alzheimer</i> -----	19
2.2	<i>Fatores de risco para o desenvolvimento de demências baseado nos achados descritos para Doença de Alzheimer Fatores de Risco da Doença de Alzheimer</i> -----	22
2.3	<i>Presença de Distúrbios Cognitivos associados a Funcionalidade do Indivíduo Idoso</i> ----	24
2.4	<i>Aspectos Genéticos Associados a Patogênese das Demências baseado nos achados descritos para Doença de Alzheimer</i> -----	25
2.4.1	<i>A Apoproteína E (ApoE) e a Doença de Alzheimer</i> -----	26
2.4.2	<i>A Doença de Alzheimer e a Presença de Polimorfismo no Gene ERS1</i> -----	29
2.4.3	<i>O Risco Cardiovascular, a Enzima Paraoxonase 1 e a Demência do tipo Alzheimer</i> -----	31
3.	OBJETIVOS-----	36
4.	MATERIAIS E MÉTODOS-----	37
4.1.	<i>Aprovação do Projeto de Pesquisa</i> -----	37
4.2.	<i>População Estudada</i> -----	37
4.3.	<i>Etapas e Divisões dos Grupos Experimentais</i> -----	37
4.4.	<i>Análises Biomolecular</i> -----	38
4.7.1	<i>Extração do DNA genômico</i> -----	39
4.7.2	<i>Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP)</i> -----	40
4.7.2.1	<i>Apolipoprotéina E (ApoE)</i> -----	40
4.7.2.2	<i>Análise dos polimorfismos do ERS1 ligados ao Receptor de Estrogênio Alfa (REα)</i> -----	42
4.7.2.3	<i>Paraoxonase do tipo 1 - PON 1</i> -----	43
5.	<i>Análise Estatística</i> -----	46
6.	RESULTADOS (CAPITULO 1: Abordagem dos Aspectos Clínicos, Avaliação Física e Funcional de Idosos Portadores de Alteração Cognitiva)-----	48
6.1.	<i>Caracterização da Amostra</i> -----	48
6.2.	<i>Correlação entre Variáveis Clínicas, Déficit Cognitivo e Funcionalidade</i> -----	51
6.3.	<i>Análise Antropométrica, índices preditores de Obesidade, risco cardiovascular e teste de força muscular</i> -----	54
6.4.	<i>Análise de Colesterol total e triglicérides</i> -----	59
6.5.	<i>Análise da Função Cognitiva e Nível de Independência Funcional</i> -----	62
6.6.	<i>Modelo de regressão logística para os dados Clínicos</i> -----	64

RESULTADOS(CAPITULO 2: ASPECTOS GENÉTICOS EM UMA POPULAÇÃO DE IDOSOS PORTADORES DE ALTERAÇÕES COGNITIVAS)-----65

6.7	<i>Proporção dos Alelos balizadores de ApoE e genótipos ERS1 e PON1 entre os gêneros</i>	66
6.8	<i>Frequências dos Alelos balizadores de ApoE e genótipos ERS1 e PON1 entre os gêneros e grupos</i>	67
6.9	<i>Prevalência dos Alelos balizadores de ApoE e genótipos ERS1 e PON1 nos diferentes graus de evolução da doença segundo a CDR</i>	69
6.10	<i>Associação da presença dos Alelos balizadores de ApoE e genótipos ERS1 e PON1 com a presença de alteração cognitiva</i>	70
6.11	<i>Associação da presença dos Alelos balizadores de ApoE e genótipos ERS1 e PON1 com a presença de alteração cognitiva, segundo gênero e apresentação da razão de chances</i>	71
6.12	<i>Relação da presença dos Alelos balizadores de ApoE e genótipos ERS1 e PON1 com as variáveis contínuas AIVD, força de preensão e IMC</i>	73
6.13	<i>Sinergias entre a presença dos alelos balizadores de ApoE e genótipos ERS1 e PON1 e a razão de chances de expressar demência</i>	73
7.	<i>DISCUSSÃO</i>	73
8.	<i>CONCLUSÃO</i>	91
9.	<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	92
10.	<i>COMPROVANTE DE PRODUÇÃO CIÊNTÍFICA</i>	
11.	<i>ANEXO</i>	

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um fenômeno mundial já estabelecido na América do Norte, Europa e em franco crescimento em países em ascensão econômica como o Brasil, Rússia, Indonésia, Índia e China. As projeções indicam que em 2050 “a população brasileira será de 253 milhões de habitantes, a quinta maior população do planeta, abaixo apenas da Índia, China, EUA e Indonésia”. Terão se passado menos de 40 anos entre 2005, quando a taxa de fecundidade total do país atingiu 2,1 filhos por mulher (nível para se alcançar um crescimento demográfico sustentado nulo) e o período de crescimento verdadeiramente nulo da população brasileira. Segundo a ONU, em 2015 a população mundial de idosos com mais de 60 anos atingiu mais de 12,3%. No Brasil, no mesmo ano, esta parcela é similar com 11,7% do contingente populacional e inferior a apontada pelo IBGE de 14,3%.

O envelhecimento, a urbanização, as mudanças sociais e econômicas e a globalização impactaram o modo de viver dos brasileiros. Como consequência, tem crescido a prevalência das doenças crônicas, o que fortalece neste momento a transição epidemiológica do Brasil. Dentre as condições crônicas-degenerativas que afligem esta “nova” população, destaca-se a hipertensão arterial, o diabetes mellitus, a osteoporose, a obesidade, a aterosclerose e as demências, em particular a doença de Alzheimer tendo sido esta amplamente discutida (BARRETO e DUARTE, 2012).

Em termos mundiais, sabe-se que as demências estão entre as enfermidades que mais afetam os idosos. Demência ou transtorno neurocognitivo maior, se caracteriza pelo declínio progressivo em múltiplos domínios cognitivos, comprometendo as atividades sociais e ocupacionais do indivíduo acometido. Dados (2003) mostram que a demência senil contribuiu com 11,2% dos Anos Vividos com Incapacidade (AVI) em pessoas acima de 60 anos de idade. Este valor é superior ao encontrado em outras doenças comuns nesta faixa etária, tais como o Acidente Vascular Cerebral (AVC), que correspondeu a 9,5% dos AVI), as doenças musculoesqueléticas (8,9% dos AVI), as doenças cardiovasculares (5,0% dos AVI) e todas as formas de câncer (2,4% dos AVIs) (estimativas da OMS - Organização Mundial da Saúde) (WHO, 2003). Cumpre ressaltar que, dentre os tipos de demência, a Doença de Alzheimer (DA) é a mais prevalente e importante.

Visto que a DA é o tipo de demência mais prevalente, cerca de 60%, o desenvolvimento de estudos em busca de elucidar sua patogênese. Os dados de referência para esta pesquisa, portanto também se basearam nas discussões sobre a patogênese da DA.

O declínio cognitivo interfere na realização de atividades sociais e ocupacionais, evoluindo para a perda das capacidades funcionais (cuidado diário pessoal, incluindo comer ou usar o banheiro) e da autonomia da população idosa com a evolução do estágio da enfermidade. A associação mundial de Alzheimer identifica os sete estágios da doença de Alzheimer, descritas assim:

Fase 1: Sem redução: Não há relatos por parte do idoso de perda de memória. Uma entrevista com um profissional médico não mostra qualquer evidência de sintomas.

Fase 2: Muito leve declínio: O idoso aponta ter lapsos de memória esquecendo palavras familiares ou a localização de objetos do cotidiano. No entanto os sintomas não podem ser detectados durante um exame médico ou por amigos, familiares ou colegas de trabalho.

Fase 3: queda leve: amigos, familiares ou colegas de trabalho começam a notar dificuldades. Durante uma entrevista clínica detalhada, os médicos podem ser capazes de detectar problemas na memória ou concentração.

Fase 4: declínio moderado (estágio leve ou precoce): Neste ponto, uma entrevista clínica cuidadosa deve ser capaz de detectar claros problemas, tais como o esquecimento de acontecimentos recentes.

Fase 5: declínio moderadamente grave (moderada ou meados de-estágio): lacunas na memória e pensamento são perceptíveis, e os idosos começam a precisar de ajuda com o dia-a-dia.

Fase 6: declínio grave (moderadamente grave ou meados de-estágio): Memória continua a piorar, alterações de personalidade podem ter lugar e os idosos precisam de ajuda extensiva com atividades diárias.

Fase 7: declínio muito grave (estágio grave ou final): No estágio final da doença, os indivíduos perdem a capacidade de responder ao seu ambiente, para manter uma conversa e, eventualmente, para controlar o movimento. Podem ainda dizer palavras ou frases. Nesta fase, os indivíduos precisam de ajuda com grande parte de seu cuidado diário pessoal, incluindo comer ou usar o banheiro. Eles também podem perder a capacidade de sorrir, de se sentar sem apoio e para manter a cabeça erguida adotam postura flexora de seus membros e tronco e a deglutição é prejudicada.

A preservação da autonomia e da independência é, hoje, considerada um aspecto fundamental na avaliação de saúde de idosos, sendo marcador de longevidade. A perda cognitiva trás inumeros problemas de ordem funcional e social, dentre eles a desocialiação, o déficit funcional, que gera uma série de incapacidades, tanto física como psicossociais para gerir sua própria vida, também gera reclusão social, inaptidão para o trabalho laboral e isso desencadeia um custo financeiro excessivo para os cofres públicos (GUTIERREZ BAO *et al*, 2014).

O diagnóstico clínico da doença de Alzheimer e de outras demências, que cursam com intensa perda cognitiva, se baseia na observação do quadro clínico. Na prática clínica, muitos transtornos neurocognitivos apresentam semelhanças ou sobreposição de sintomas, dificultando o diagnóstico clínico diferencial. Nesse cenário, estudos genéticos e bioquímicos tornam-se importantes para a descoberta de marcadores que auxiliem o diagnóstico diferencial entre as demências. A presença de biomarcadores, baseado em alterações genéticas, compreendem um dos campos mais promissores para o desenvolvimento do diagnóstico precoce das demências, e estudos tem envolvido a interação de polimorfismos nas explicações de sua causa. Os SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) são a forma mais frequente de variação na sequência de DNA encontrada no genoma humano (TAILON-MILLER *et al.*, 1999) e podem ser definidos como regiões pontuais do DNA, onde a base nucleotídica seja variável na população. Os SNPs vêm ganhando grande popularidade nos últimos anos como um importante marcador utilizado nas pesquisas de doenças genéticas complexas. De acordo com modelos teóricos, se forem estudados os genótipos de um grupo de indivíduos portadores de uma determinada doença e os genótipos de um grupo controle, será observado que certos genótipos estarão consistentemente associados com aqueles indivíduos afetados, indicando um possível gene candidato para a doença em questão (BOCCARDI. M, *et al.*2017).

Pensando nestes fatores e no grande avanço nos quadros de perda cognitiva e demências instaladas e no apoio genético para validação de teorias e processos terapêuticos como resultado final, esta tese vem unir os fatores clínicos usualmente observados para diagnosticar a DA, índices preditivos de outras doenças crônico-degenerativas comuns, como obesidade, arteriosclerose e HAS e a análise genética. Como ainda não há consenso entre as relações dos genes, realmente causadores do processo demencial, houve então a escolha nesta tese, por explorar três frentes teóricas que são discutidas nos debates sobre fatores causadores de demência. Há teorias envolvendo genes ligados as microangiopatias e a formação de placas de gordura e tecido fibroso nas paredes internas das artérias. Há, também, hipóteses de mutações em genes ligados a produção e funcionamento hormonal feminino e ainda resultados ligados aos polimorfismos do gene ApoE, sendo este, o mais amplamente discutido e sedimentado de resultados LAWS *et al.*, 2003. Por este fato, foi escolhido estudar os polimorfismos vistos no gene da ApoE e chama-los de “genes balizadores de resultados”, a fim de discutir sua influência no processo doença, bem como sua sinergia com outros genes citados nas outras frentes teóricas sugerindo serem considerados dados preditivos de perdas cognitivas, que se detectados e bem acompanhados precocemente, auxiliarão em um processo diagnóstico mais assertivo e um melhor prognóstico para a doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Distúrbios Cognitivos em Idosos e a Doença de Alzheimer

O envelhecimento é caracterizado por mudanças fisiológicas, bioquímicas e declínio das funções motoras e cognitivas (TROPIERE, 2012). Devido a essas alterações, a capacidade de realizar atividades diárias torna-se limitada, propiciando uma dependência funcional, afetando na qualidade de vida desses idosos (PRINCE, 2013).

A Organização Mundial de Saúde assegura que a qualidade de vida é “a percepção do indivíduo sobre sua posição na vida, dentro do contexto de cultura e sistema de valores nos quais o indivíduo vive, isso em relação as suas metas, expectativas e padrões sociais” (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

De acordo com a Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, a demência pode ser definida como o comprometimento adquirido da memória associado a um prejuízo em pelo menos uma das outras funções cognitivas da linguagem, gnóscias, praxias ou funções executivas, que interferem na capacidade funcional, desempenho social ou profissional do indivíduo (RAMOS 2009).

Durante o processo de envelhecimento, 15% das pessoas desenvolvem inicialmente incapacidade cognitiva progressiva. Desse total, mais ou menos 5% das pessoas acima de 65 anos e 20% acima de 80 desenvolvem demência de grau moderado a grave. Portanto, todas as iniciativas de promoção de saúde, de assistência e de reabilitação em saúde devem ter como meta aprimorar, manter ou recuperar a capacidade funcional do indivíduo pelo maior tempo possível, valorizar a autonomia e a independência física e mental, excedendo um simples diagnóstico e tratamento de doenças específicas (ASSIS *et al.*, 2017).

Essas alterações cognitivas podem se agravar ao longo do tempo e são divididas em fases. A mais precoce é o Declínio Cognitivo Leve. A perda de memória é o sintoma mais citado e que muitas vezes não é valorizado pelos médicos, pois são comuns na população idosa e devido a isso, podem estar associadas ao próprio envelhecimento (TRAYKOV *et al.*, 2007; DEARY *et al.*, 2009). Ocorre o esquecimento de nomes próprios e de locais, inicialmente, mas ainda há o convívio social. Progressivamente essa dificuldade de memória se agrava, tornando o idoso incapaz de realizar suas tarefas diárias (REISBERG *et*

al., 1982).

Na segunda fase, o Declínio Cognitivo Moderado, o paciente perde sua autonomia, sente dificuldade de contar sua história pessoal e a capacidade de aprendizagem declina, contudo ainda reconhece rostos e locais familiares (REISBERG *et al.*, 1982).

Declínio cognitivo Grave divide-se em três fases clínicas. No início do estado demencial, a pessoa fica desorientada em tempo e espaço, apresenta apraxias graves, dificultando realizar tarefas, como vestir-se. No estado de demência média, perde sua autonomia completamente. Fica incapaz de se alimentar e se torna incontinente. A memória e a inteligência declinam gravemente. A personalidade muda e o paciente apresenta quadros de ilusões, obsessões, ansiedades e alterações de humor. E a demência profunda, que o paciente perde a capacidade da fala, e o comportamento torna-se incoerente (DEARY *et al.*, 2009).

Existem diferentes tipos de demências, tais como, as demências infecciosas (Complexo Aids-demência, Neurosífilis, Encefalite herpética, Neurocisticercose, Alcoolismo, Síndrome de WernickeKorsakoff, Doença de Creutzfeldt-Jakob), as demências reversíveis como Hidrocefalia de pressão normal, Pelagra, Deficiência de vitamina B12, Hipotireoidismo e depressão que são causas raras de demência. O tratamento adequado pode reverter o declínio cognitivo e por isso o diagnóstico tem papel fundamental e de grande relevância nesses quadros demenciais.

Outra categoria são as demências irreversíveis (Doença de Alzheimer, demência vascular, mista, por corpúsculos de Lewy, frontotemporal e Doença de Huntington) que apresenta início insidioso e declínio progressivo, com maior índice entre a população em todo o mundo (GALLUCCI *et al.*, 2005).

Segundo achados literários e discussões clínicas, a população idosa apresenta duas formas mais frequente de demência: a doença de Alzheimer (DA) responsável por 60% dos casos e a demência vascular (DV) (LOGIUDICE; HERRERA *et al.*, 2002).

A DA é clinicamente diagnosticada através de observações que incluem a perda de memória, o declínio cognitivo e os déficits nas habilidades motoras dos indivíduos afetados (WELSH *et al.*, 1992).

Estágios tardios da doença são caracterizados por demência e paranoia. Entretanto, o diagnóstico definitivo da DA somente é obtido quando são identificadas estruturas histopatológicas presentes no parênquima cerebral que incluem depósitos fibrilares amiloidais localizados nas paredes dos vasos sanguíneos, associados a uma variedade de diferentes tipos de placas senis, acúmulo de filamentos anormais da proteína *Tau* e conseqüente formação deovelos neurofibrilares (ENF), perda neuronal e sináptica, ativação da glia e inflamação, a termo da autópsia no cérebro do paciente já falecido (SERENIKE 2008).

As placas senis são depósitos extracelulares compostos de um pequeno peptídeo conhecido como beta-amilóide (β A), que é formado pela clivagem da proteína precursora amilóide (PPA) e se acumula no tecido cerebral do acometido pela doença. Já os ENF são acúmulos intracelulares de proteína *Tau* que está ligada aos microtúbulos das células nervosas. A proteína *Tau* encontra-se hiperfosforilada na DA o que leva à formação de filamentos helicoidais pareados e, conseqüentemente, aos emaranhados (Figura 1) (GRUNDKE-IQBAL *et al.*, 1986a



Figura 1: Placas (plaques) e emaranhados neurofibrilares (tangles) no córtex cerebral em pacientes com Doença de Alzheimer. As placas são constituídas de depósitos de Beta Amilóide rodeadas por neuritos distróficos, astrócitos reativos e micróglia, enquanto o emaranhado é um agregado intracelular composto de uma forma hiperfosforilada da proteína *Tau* associada a microtúbulos. Os astrócitos reativos participam de vários mecanismos após lesões do Sistema Nervoso Central e Periférico, os quais incluem neuroproteção, brotamento neuronal, neurotransmissão e dor neuropática (BLENNOW, DE LEON & ZETTERBERG, 2006)

2.2 Fatores de risco para o desenvolvimento de demências baseado nos achados descritos para Doença de Alzheimer.

Estudos epidemiológicos têm sugerido um variado número de fatores que contribuem para o aparecimento desta doença (ARTIGA *et al.*, 1998a), os vários fatores discutidos possuem componentes ambientais e genéticos que frequentemente interagem para manifestar esta complexa doença. Os fatores de risco não genéticos para DA incluem idade, gênero, sedentarismo, obesidade, hipertensão da meia idade e diabetes mellitus (MITISURU *et al.*, 2014). A idade, contudo, ainda é o fator de risco de maior significância. Estima-se que aproximadamente 3% dos homens e mulheres entre 65 e 74 anos possuem a doença e que metade de todos os indivíduos com mais de 85 anos estejam em alguma fase da DA (KATZMAN, 1993). As mulheres são mais afetadas pela DA do que os homens e adicionalmente possuem um risco acumulativo aumentado para o aparecimento da doença ao longo da idade (ANDERSEN *et al.*, 1999; VON STRAUSS *et al.*, 1999).

O grau de escolaridade e a atividade cerebral contínua são fatores protetores, por razões ainda não tão bem elucidadas (QIU *et al.*, 2001; SNOWDON, OSTWALD, & KANE, 1989). Corroborando com tais informações, a análise de nossa amostra parece estar de acordo com os achados literários como mostra o gráfico 1, que expressa o nível de escolaridade destes indivíduos. A maioria apresenta apenas o ensino fundamental completo.

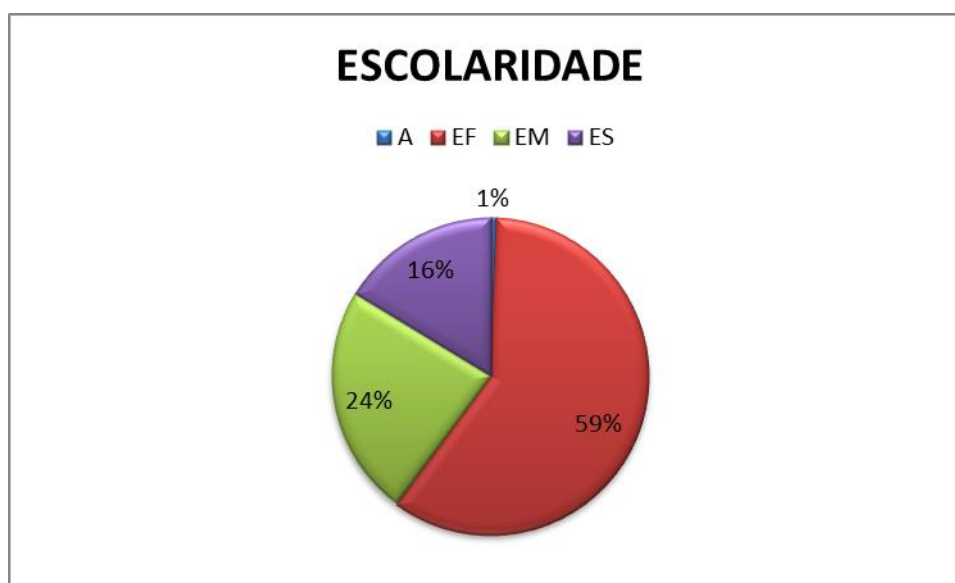


Gráfico 1: Mostra a escolaridade da população estudada onde **A** corresponde aos indivíduos analfabetos, **EF** aos indivíduos com ensino fundamental completo, **EM** aos indivíduos com ensino médio completo e **ES** aos indivíduos com ensino superior completo.

Estudos recentes (KIVIPELTO *et al.*, 2012; PAPPOLLA *et al.*, 2013) sugerem que o metabolismo do colesterol e triglicérides possuem um papel chave na Doença de Alzheimer. Este achado, no cérebro de pacientes com DA, sugere que a modulação dos níveis de colesterol pode ser importante na patogênese da Doença de Alzheimer (MITISURU *et al.*, 2014).

Uma meta-análise recente mostrou que a obesidade aumenta o risco de DA-hazard ratio (HR) 1,80, IC 95% 1,00-3,29; (BEYDOUN *et al.*, 2008). Além disso, observou-se que a obesidade na meia idade está associada a um risco aumentado de alguns tipos de déficit cognitivo.

Artigos relatam que a hipertensão na meia idade é um risco para DA (SKOOG *et al.*, 1996; LAUNER *et al.*, 2000). Isso também é apoiado por estudos clínicos recentes, que mostram que a terapia de redução da pressão arterial pode reduzir o risco de DA ou demência (LAUNER *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2010b).

Além de fatores ligados ao acúmulo de doenças crônicas e maus hábitos de vida, estudos tem demonstrado que fatores ligados à motricidade como capacidade de locomoção e a medida de força podem ser marcadores clínicos de instalação e progressão da doença.

Em um estudo de HOOGHIEMSTRA *et al.*, 2017, mostraram que a velocidade da marcha mais lenta e a medida de força manual, estavam relacionadas a uma pior atenção inicial, memória, velocidade de processamento da informação e fluência verbal. Outro estudo recente (CAMARGO *et al.*, 2016) mostrou que a caminhada lenta e a a perda de força manual foram associadas a um aumento de mais de 2,5 vezes no risco de DA.

A preensão manual também foi associada a um risco aumentado de acidente vascular cerebral (HR 1,74, IC 95%: 1,12-2,70 / SDU, $p = 0,01$) em pessoas ≥ 65 anos. Ambas as medidas foram associadas a menor volume total de cérebro e menor desempenho em testes de memória visual, linguagem, função executiva e função visuoperceptual. A marcha mais lenta também estava relacionada à memória verbal mais pobre e ao punho mais fraco para uma menor abstração. Isso reforça a importância de estudos que também estejam concentrados neste tipo de avaliação, quando é pensada a questão de padrão diagnóstico para demência.

2.3 Presença de Distúrbios Cognitivos associados a Funcionalidade do Indivíduo Idoso

A presença de comorbidades mobiliza o olhar para um processo de dependência física desta população, em atividades ditas básicas de vida diária (AVDs), como banhar-se, alimentar-se, vestir-se e locomover-se, bem como as instrumentais de vida diária (AIVDs) que dá condição ao indivíduo de gerir sua própria vida, como movimentar suas finanças, preparar sua própria refeição e medicar-se. A presença de doenças subclínicas e ou a manutenção de maus hábitos de vida, como sedentarismo, etilismo, tabagismo e má alimentação, podem comprometer gravemente um envelhecimento bem sucedido, levando a um declínio funcional importante (AZEREDO *et al.*, 2003).

Com o avanço da idade, a preocupação em ciência para saúde deve estar voltada à busca por um envelhecimento denominado de “bem sucedido”, ou seja, um indivíduo produtivo e economicamente viável com redução de suas limitações físicas e com garantia de participação social ativa (FUENTES *et al.*, 2014).

A perda cognitiva provoca dentre outros processos, um prejuízo progressivo da manutenção da independência funcional do indivíduo. Uma das principais manifestações clínicas já discutida anteriormente é a perda progressiva da memória, que leva a implicações funcionais no cotidiano do idoso. Inicialmente os problemas imperam nas atividades mais complexas, como as AIVDs e com o avançar da doença o idoso passa a apresentar dificuldades na realização das atividades básicas (AVDs) acentuando a necessidade de supervisão diária por familiares ou cuidadores. Por fim há perda da capacidade funcional total, onde há dependência de terceiros para a manutenção de seus cuidados e sobrevivência (HAJJAR *et al* 2016; HOOGYIEMSTRA *et al.*, 2017).

Em quadros demenciais como na doença de Alzheimer, as perdas funcionais ocorrem pela presença de alterações cognitivas, como a disfunção executiva e as apraxias, que interferem no planejamento e elaboração das atividades, no sequenciamento do movimento, na identificação de tarefas associadas e nas correções necessárias, bem como na execução motora propriamente dita da atividade.

Estes deficits são os que mais interferem na capacidade funcional do idoso doente. Além disso, as alterações comportamentais também interferem de forma substancial nas atividades funcionais, já que os idosos confusos apresentam delírios, alucinações visuais, agitações e agressividade ou ainda, um quadro de apatia e depressão que os impedem de engajar-se na realização da atividade funcional por falta de atenção, colaboração, de planejamento e de interesse (FATI *et al.*, 2002 ; BUCHTMAN *et al.*,2007).

2.4 Aspectos Genéticos Associados a Patogênese das Demências baseado nos achados descritos para Doença de Alzheimer.

Há tempos é reconhecido que as demências principalmente a do tipo Alzheimer (tipo de demência foco do embasamento teórico deste estudo), podem ocorrer com maior freqüência em algumas famílias. Esta observação, apesar de não excluir a importância dos fatores ambientais, constitui um dos primeiros indícios de que fatores genéticos pudessem ter influência no desenvolvimento da doença. Em contraste encontramos protocolos diagnósticos estritamente clínicos, com métodos usualmente utilizados para avaliação do risco baseado em fatores epidemiológicos tradicionais (testes de funcionalidade cognitiva, testes de funcionalidade motora, fumo, hipertensão, sedentarismo, obesidade, história familiar, diabetes etc.).

Pensando nas questões de envolvimento genético, o encontro de alterações de DNA, característicos de indivíduos portadores de demência, poderia fornecer marcadores biológicos importantes, que envolveria futuramente um cuidado prognóstico maior. O encontro de marcadores vem sendo o alvo de numerosos grupos internacionais e na pesquisa recente, a procura específica por mutações genéticas tem muitas vantagens e tem sido amplamente discutida no meio científico (LAWS *et al.*, 2003).

2.4.1 A Apoproteína E (ApoE) e a Doença de Alzheimer

A DA de início precoce foi associada, até o momento, a mutações em genes que codificam para a proteína precursora da b-amilóide (APP: *b-amyloid precursor protein*- 21q21.3), presenilina 1 (PSEN1: *presenilin 1*- 14q24.3) e presenilina 2 (PSEN2: *presenilin 2* - 1q31q42). As mutações nesses genes são responsáveis por aproximadamente 40% dos casos de DA com início precoce (TANZI e BERTRAN, 2001). Porém, a DA de início precoce foge do padrão da doença, em que cerca de 95% dos casos ocorrem com início tardio. Nestes casos, o espectro de mutações é distinto. Até o momento, apenas o alelo E4 do gene ApoE (19q13.2) mostrou uma associação consistente com a DA em vários estudos independentes.

A ApoE é uma glicoproteína com 317 aminoácidos e é uma das principais proteínas presentes no plasma humano, para onde é exportada após sua síntese no fígado (LIN *et al.*, 1986; ELSHOURBAGY *et al.*, 1985), além de ser a principal apolipoproteína encontrada no cérebro. No plasma, a ApoE é o principal componente das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e de um grupo de lipoproteínas de alta densidade (HDL), envolvida na redistribuição de triglicerídeos e colesterol em diferentes tecidos (MENSENKAMP *et al.*, 1999; ASHFORD *et al.*, 2004).

A identificação da variante E4 do gene ApoE, como o fator genético de risco mais comum para a DA de início tardio, sugere que o colesterol pode ter um papel direto na patogênese da doença. O alelo ApoE-E4 aumenta o acúmulo de placas senis em pacientes com AD, bem como em pessoas cognitivamente normais (REIMAN *et al.*, 2009; MORRIS *et al.*, 2010). A ApoE é um transportador de colesterol importante que suporta o transporte de lipídios e reparação de lesões no cérebro. O gene da apolipoproteína E (ApoE) humano está localizado dentro do loco RELB no braço longo do cromossomo 19 (19q13.2) (OLAISEN *et al.*, 1982; DAS *et al.*, 1985; PAIK *et al.*, 1985) possuindo 4 éxons (HAGBERG *et al.*, 2000) distribuídos ao longo de 6740 nucleotídeos no genoma humano. Retirando se os íntrons sobram penas 1156 pares de bases que compõem o mRNA que será transcrito, responsável pela tradução de 3 isoformas da proteína (OJOPI *et al.*, 2004).

Em humanos existem três alelos principais do gene ApoE, chamados de E2, E3 e E4. As isoformas proteicas produzidas por esses alelos diferem na composição de aminoácidos nas posições 112 e/ou 158 e, deste modo, tem-se E2 (ApoE2: Cys 112, Cys 158), E3 (ApoE3: Cys 112, Arg 158), a qual é a forma mais comum, e E4 (ApoE4: Arg 112, Arg 158).(figura 2)

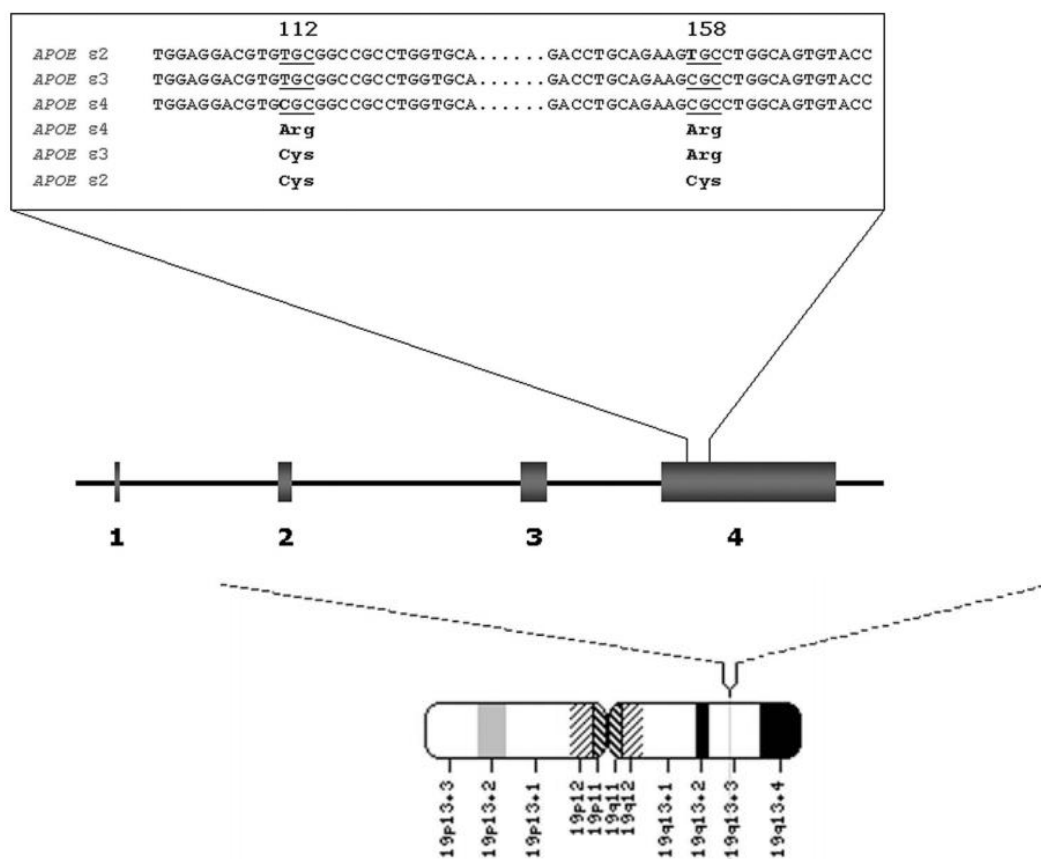


Figura 2. Apresentação das Isoformas da ApoE. Fonte: OJOPI et al., 2004.

Os alelos polimórficos ApoE são os principais determinantes genéticos do risco da doença de Alzheimer (DA) Segundo CARDOSO et al, 2012 os indivíduos que transportam o alelo E4 apresentam risco aumentado de DA comparado com aqueles que apresentam o alelo E3 mais comum, enquanto que o alelo E2 diminui o risco. A presença do alelo E4 de ApoE também está associada ao aumento do risco de angiopatia amiloide cerebral e declínio cognitivo relacionado à idade durante o envelhecimento normal. As lipoproteínas de ApoE ligam-se a vários receptores de superfície celular para libertar lípidios e também ao péptido de amilóide-β (Aβ) hidrofóbico, que se pensa para iniciar eventos tóxicos que levam a disfunção sináptica e neurodegeneração na DA. As isoformas de ApoE regulam diferencialmente a agregação e depuração de Aβ no cérebro, e têm funções distintas na regulação do transporte de lipídios cerebrais, metabolismo da glicose, sinalização neuronal, neuroinflamação e

função mitocondrial.

A versão E4 (encontrada 13,7% na população geral) é a que aumenta o risco em 20% para uma pessoa que tenha zero cópias de E4 a 91% de risco em uma pessoa com duas cópias ApoE4. Quanto mais copiado de E4, maior a probabilidade do desenvolvimento da doença de Alzheimer mais precocemente, sendo considerado risco absoluto (RODRIGUEZ et al.,2014) como mostra a figura 3.

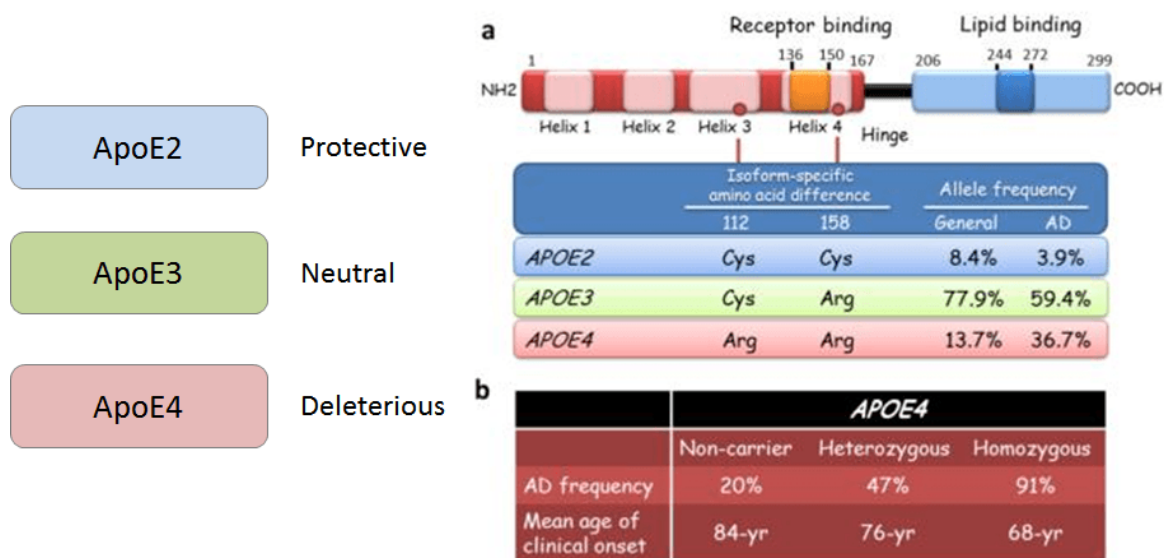


Figura 3. Distribuição e ações das isoformas de ApoE relacionados a prevalência de DA. Fonte: RODRIGUEZ et al.,2014.

Outro polimorfismo tem sido associado a ligado a doença de Alzheimer. Visto que a prevalência da doença é maior em mulheres, a pós-menopausa tem sido relacionada a distúrbios cognitivos e afetivos e ao aumento do risco de DA (BECKMANN *et al.*,1997 e HENDERSON *et al.*,1994).Curiosamente, a distribuição regional dos receptores de estrogênio (ERs) dentro do cérebro é surpreendentemente semelhante à geografia da patologia do cérebro de tipo Alzheimer (ALLERAND et al.,1992 e MC EWEN *et al.*,1999).

2.4.2 A Doença de Alzheimer e a Presença de Polimorfismo no Gene ERS1

Sabe-se que a incidência da doença aumenta rapidamente com o avanço da idade e que a DA afeta proporcionalmente mais as mulheres do que os homens (NITRINI, 1999). Postula-se que o declínio dos níveis de hormônios gonodais em mulheres pós-menopausa pode contribuir para a diferença observada entre os sexos. Na década de 90 foi anunciado que a terapia de reposição de estrogênio (TER) aplicada às mulheres pós-menopausa poderia amenizar os sintomas cognitivos da DA, desta forma prevenindo a doença (PAGANINI-HILL & HENDERSON, 1996; BALDERESCHI *et al.*, 1998). A grande parte dos estudos epidemiológicos sobre TER até então desenvolvidos indicam que a TER é capaz de melhorar as funções cognitivas neste grupo de mulheres e diminuir a incidência da DA. Entretanto, um estudo tem sugerido que a TER pode aumentar a prevalência desta doença (SHUMAKER *et al.*, 2003).

Apesar de que a contribuição da TER no desempenho cognitivo e na patogênese da DA em mulheres não estar ainda clara, os modelos animais promovem um meio de se examinar os efeitos básicos do estrogênio nas funções cerebrais. De fato, um número de modelos animais utilizando diferentes metodologias tem demonstrado que o estrogênio modula a morfologia neuronal no hipocampo, uma região cerebral importante para certas formas de memória e também o local de extensivo dano neural na DA (WOOLLEY *et al.*, 1990; TORAN-ALLERAND, SINGH & SETALO, 1999). O estrogênio também aumenta as funções sinápticas no hipocampo e modula diversos sistemas neurotransmissores (LUINE, KHYLCHEVSKAYA, & MCEWEN, 1975).

Em uma gama variada de estudos, principalmente conduzidos com ratos e camundongos jovens e de meia idade, nos quais o estado de menopausa fora mimetizado por ovariectomia, o tratamento com estrogênio melhorou algumas formas de aprendizado e memória – mais especificamente trabalhos com memória espacial (DANIEL *et al.*, 1997; BIMONTE & DENENBERG, 1999; MILLER *et al.*, 1999; DANIEL & DOHANICH, 2001). Além do mais, o tratamento com estrogênio parece ser efetivo no aumento do aprendizado e da memória também em murinos fêmeas com idade avançada (FRICK, FERNANDEZ & BULINSKI, 2002).

Entretanto, alguns outros estudos não têm demonstrado o efeito observado anteriormente relacionado ao tratamento com administração de estrogênio (FUGGER *et al.*, 1998). Apesar da terapia com estrogênio não estar bem estabelecido para o tratamento da DA, ele parece ser capaz de retardar os eventos patológicos durante o estágio tardio desta doença. Um possível mecanismo postulado seria a inibição do acúmulo de β A (JAFFE *et al.*, 1994).

O estrogênio poderia exercer um importante efeito neuroprotetor que é dependente da ativação do receptor de estrogênio nuclear alfa e beta (J CUI *et al.*, 2013). As respostas celulares a hormonas, incluindo o estrogênio, são mediadas por receptores que iniciam eventos celulares após ligação da hormona (PROSSNITZ *et al.*, 2008). Os efeitos biológicos do estrogênio são mediados por três receptores de estrogênio: o receptor de estrogênio alfa (ER α) o receptor de estrogênio beta (ER β) e o receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPR30).

O gene que codifica a expressão destes receptores é o ERS1 e está localizado no braço longo do cromossoma 6, locus 25.1, estendendo-se mais de 140 kilobases, dividido em oito exões (PONGLIKITMONGKOL *et al.*, 1988). O cDNA do receptor de estrogênio é constituído por uma sequência de 1,785 nucleótidos que codifica uma proteína de 595 aminoácidos com um peso molecular de 66,182kD (SHAO e BROWN, 2004). Os polimorfismos de genes associados ao estrogênio, especialmente o receptor de estrogênio 1 (ESR1) polimorfismos de um único nucleotídeo ou SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) são relacionados ao aumento do risco de DA. O gene ESR1 codificante para receptor de estrogênio alfa e está localizado no cromossomo 6q25.1. PvuII (rs2234693, C> T) e XbaI (rs9340799, A> G) são os polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição mais estudados no gene ESR1(WANG. 2014).

Estes polimorfismos são comumente designados pelos nomes das enzimas de restrição que os detectaram, PvuII e XbaI, ou pelos números de referência ID *rs2234693* e *rs9340799*. O polimorfismo PvuII é determinado por uma substituição do nucleótido timina por citosina (T \rightarrow C) e o polimorfismo XbaI por uma substituição do nucleótido de adenina por guanina (A \rightarrow G) (YOON *et al.*, 2010).

Deste modo o genótipo TT e AA representam o genótipo wild-type para o polimorfismo PvuII e XbaI, respectivamente, e CC e GG representam o genótipo variante dos polimorfismos PvuII e XbaI, respectivamente. O genótipo TC e o genótipo AG são heterozigóticos para o polimorfismo PvuII e XbaI, respectivamente.

Estes polimorfismos estão relacionados com alteração da expressão do gene ERS1, por alteração da ligação de fatores de transcrição e influência no splicing diferencial do mRNA do gene ERS1 (JAKIMIUK *et al.*, 2007). O splicing alternativo do gene ERS1 origina uma transdução em proteínas estáveis com diferentes capacidades para ligar ao estrogênio, translocar para o núcleo e interagir com DNA (JAKIMIUK *et al.*, 2007). Estudos efetuados demonstram que estes polimorfismos estão relacionados com doenças como a doença de Alzheimer e doenças cardiovasculares, como fatores de proteção ou de risco (JAKIMIUK *et al.*, 2007).

2.4.3 O Risco Cardiovascular, a Enzima Paraoxonase 1 e a Demência do tipo Alzheimer

Pode-se abordar outro sistema que em sinergia com o polimorfismo da ApoE, também hipoteticamente parece ter relação com o risco de desenvolvimento de demência. A associação com doenças crônicas de ordem cardiovascular por anos foi estudada e volta à tona, pela correlação com o risco relativo que há com as demências.

Nos últimos anos, o metabolismo lipídico foi estudado por desempenhar um papel importante na DA. Mais e mais pesquisas mostraram que a DA está relacionada ao colesterol no cérebro, que está envolvida em uma série de processos metabólicos interdependentes, que envolvem a proteína beta amiloide, incluindo síntese, agregação, neurotoxicidade e eliminação. A TAU fosforilada também estaria relacionada ao metabolismo do colesterol. Além disso, há evidências sugerindo que o colesterol pode contribuir com a patogênese da DA, induzindo a disfunção de vasos cerebrais, como na arteriosclerose SUN *et al.*, 2015. Os pacientes com DA têm em média maiores taxas de colesterol total no plasma e lipoproteínas de baixa densidade (LDL).

Os fatores de risco cardiovascular conhecidos, relacionados ao lipídio no soro também contribuem para o desenvolvimento de DA isso foi relatado há muito tempo atrás por KALMAN *et al.*,1999. A demonstração de que a suscetibilidade do LDL à oxidação é aumentada no líquido cefalocerebral e no plasma de pacientes com demência, em paralelo com níveis reduzidos de antioxidantes, indicam ainda um papel crucial para a oxidação de LDL na doença (SCHIPPLING *et al.*, 2000).

Dado o papel desempenhado pelo estresse oxidativo na demência, muitos estudos abordaram o link putativo entre a atividade da enzima paraoxonase 1 (PON1), seus polimorfismos com o processo demencial. Um estudo incluiu 120 pacientes com demência: 51 com DA, 28 com demência de origem vascular, 41 com demência mista, 45 com comprometimento cognitivo leve, com idades e sexo controlados, a atividade da PON1 estava diminuída em pacientes com DA e Demência mista em comparação com sujeitos de controle (WEHR *et al.*, 2009).

Porém a literatura ainda é confusa por estudos com resultados diferentes, que apontam a não correlação destes polimorfismos mais comuns para PON1 com a doença de Alzheimer e estudos que sugerem sua atuação como fator de risco. No entanto devido a população idosa apresentar auto índice de prevalência de doenças como hipercolesterolemia, arterioesclerose foi levantada a hipótese da possibilidade de sinergia com os demais polimorfismos já descritos.

A paraoxonase 1 (PON1) humana é uma esterase associada à apolipoproteína AI (ApoAI) e clusterina (apolipoproteína J) no HDL. O gene da PON1 reside no cromossomo 7 e codifica uma proteína de 43KDa. A PON1 é um antioxidante dependente de cálcio, versátil, produzida principalmente no fígado e circula dentro de partículas de HDL (GOSWAMI *et al.*,2009)

As partículas PON1 exibem tanto paraoxonase quanto atividades de arilesterase, uma vez que hidrolisa organofosfato compostos como o paraoxon e ésteres aromáticos de ácido carboxílico tais como fenilacetato. Sabe-se que a PON1 apresenta atividade anti-inflamatória e anti-aterogênica por conta de sua capacidade em gerar produtos de peroxidação lipídica e prevenir acúmulos de lipídios oxidados em lipoproteínas (AVIRAM *et al.*, 1998; MACKNESS *et al.*, 1996; DEAKIN *et al.*,2004). Durante a última década, PON1 foi aprovada como um contribuinte importante para a atividade antioxidante de HDL, bem como um fator de risco negativo independente para a aterosclerose em estudos epidemiológicos.

A versatilidade de PON1 proporciona a ela desempenhar um papel em vários caminhos, muitos dos quais protegem contra aterosclerose:

1. Ela hidrólisa efetivamente peróxidos e lactonas em lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e partículas de HDL
2. Protege os macrófagos da oxidação.
3. Participa na homeostase endotelial.
4. É um metabolizador xenobiótico eficaz
5. É uma homocisteína-tiolactonase.

A enzima PON1 evoluiu a partir de enzimas bifuncionais que atuam como lactonas de homoserina que são quorum-sensing, moléculas empregadas por muitas bactérias gram negativas. PON1 é, portanto, um componente da imunidade inata (MENINI *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, a baixa atividade de PON1 foi consistentemente ligada a um risco aumentado de eventos cardiovasculares maiores, também estabelecimento de prevenção secundária de doença coronariana e arterial periférica (MENINI *et al.*, 2013).

O papel proposto da PON1 em doenças neurovasculares, uma consequência importante da aterosclerose, está ilustrado no diagrama esquemático da Figura 4.

O diagrama mostra como as espécies reativas de oxigênio produzidas por leucócitos em LDL (1) ou membranas celulares (2) resultam na Formação de fosfolípidos oxidados (3). PON1 é sintetizado no fígado em associação com HDL. PON1 pode atuar sobre a fosfatidilcolina oxidada derivada de LDL oxidado (3) ou membranas de macrófagos oxidadas para produzir uma lactona (atividade lactonizante de PON1, (4), que, por sua vez, é submetida à atividade de lactonase (5) para produzir um ácido carboxílico inócuo eliminando mais danos.

A atividade da lactonase de PON1 também permite desintoxicar a tiolactona de homocisteína (6). Este composto está associado ao aumento do risco cardiovascular, uma vez que a homocisteinilação de proteínas (fatores de coagulação, lipoproteínas, receptores endoteliais) é aterogênica (7). A homocisteína teolactona é um dos substratos naturais de PON1, que o hidrolisa para homocisteína inócua (8). A PON1 também exerce sua ação salutar sobre macrófagos e outras células inflamatórias (9), prevenindo o estresse oxidativo celular e bloqueando as cascatas de citocinas que agravam a inflamação, o que

pode levar a uma aterogênese e doença neurovascular aprimoradas (10).

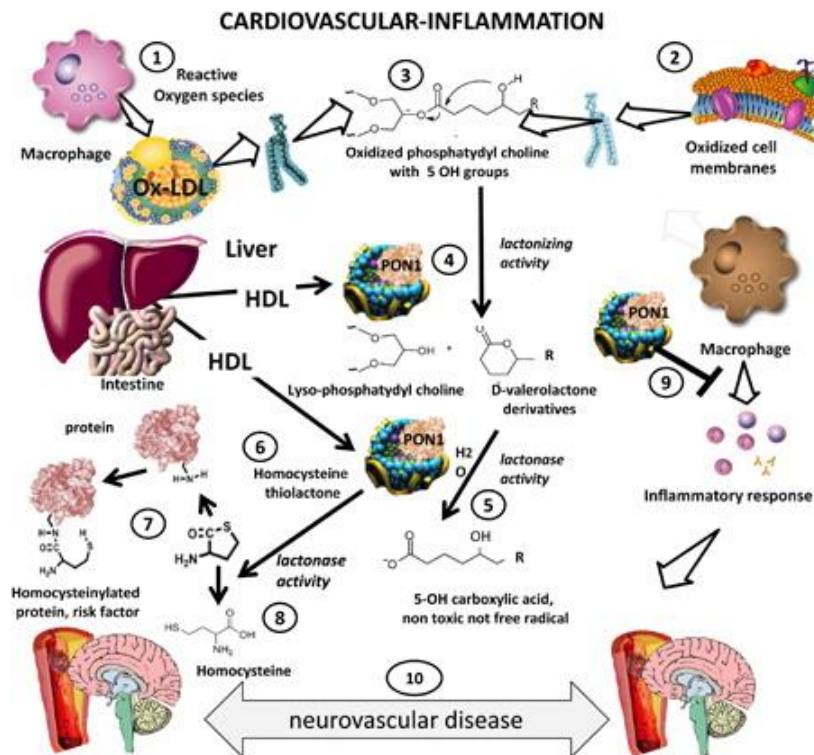


Figura 4: O papel proposto da PON1 em doenças neurovasculares. Fonte: MENINI e GUGLIUCCI 2014.

A PON1 em toxicologia apresenta também suas implicações para doenças neurodegenerativas mostradas no diagrama da figura 5.

A PON1 evoluiu a partir de lactonases que têm um papel fundamental na imunidade natural, limitando as lactonas que detectam quorum de bactérias. Na evolução, adquiriu atividades de esterase promíscuas, hidrolisando compostos de interesse em toxicologia. Os pesticidas de organofosfato (1) são metabolizados no respectivo oxona pelo metabolismo da fase 1 no fígado (AVIRAM *et al.*, 2013). Estes éxons são tóxicos devido à sua inibição da acetilcolinesterase, que está associada a vários distúrbios neurodegenerativos (4). O PON1 hidroliza o paraoxon (oxão do paratião, do qual o nome deriva) e os oxones de muitos outros organofosforados (5) e os desintoxica. Os principais polimorfismos na PON1 alteram significativamente esta atividade (6) e podem estar associados ao aumento da suscetibilidade a distúrbios neurodegenerativos conforme discutido no texto.

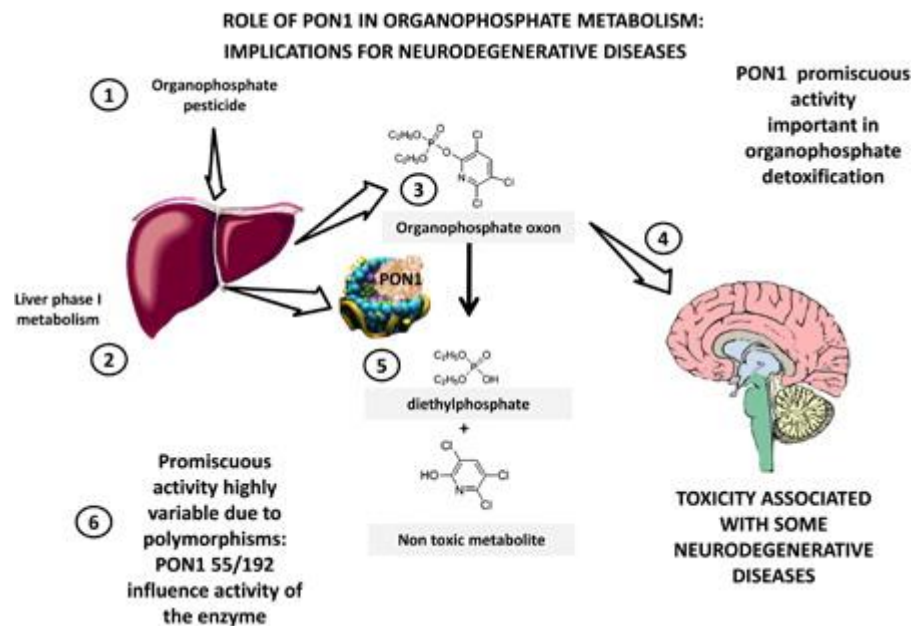


Figura 5. O papel da PON1 em doenças neurodegenerativas. Fonte: MENINI e GUGLIUCCI 2014.

O gene PON1 humano tem quase 200 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). Os mais importantes são os seguintes SNPs: 108C> T (rs705379) e 162A> G (rs705381) na região promotora e Q192R (rs662) e L55M (rs854560) na região de codificação do gene (LEVIEV *et al.*,2000).

Foi escolhido, pelo número de estudos de base, para testar a hipótese de possível mecanismo de ação para a patogênese da doença dois destes polimorfismos, um na região promotora 108C> T (rs705379) e outro na região codificante Q192R (rs662).

Estudos caso-controle de variantes genéticas PON1 na doença de Alzheimer (DA) e a doença de Parkinson (DP) revelaram alguma relação, embora haja associações ainda inconsistentes com os dois polimorfismos de escolha para este estudo PON1: Q192R (rs662) e 108C> T (rs705379) (PI Y *et al.*, 2012).

3. OBJETIVO GERAL

Testar a hipótese que aspectos clínicos e genéticos estejam associados com as alterações cognitivas em idosos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar:

- Distribuição sócio-demográfica na população idosa;
- Associação entre dislipidemia e perda cognitiva na população idosa;
- Associação entre a hipertensão arterial (HAS) e perda cognitiva na população idosa;
- Relação entre fatores de ordem metabólica (cardiovascular e Obesidade) e perda cognitiva na população idosa;
- Relação entre o sedentarismo e perda cognitiva na população idosa;
- A associação da capacidade funcional e perda cognitiva na população idosa;
- A associação da avaliação física antropométrica e perda cognitiva na população idosa;
- A associação força de preensão manual e perda cognitiva na população idosa.
- A expressão dos alelos polimórficos ApoE3 e ApoE4;
- A expressão dos polimorfismos ligados ao gene ERS1 e polimorfismos ligados a PON1 (*rs662* e *rs705379*) em idosos portadores de déficit cognitivo;
- A influência dos alelos polimórficos ApoE3, ApoE4, polimorfismos ligados ao gene ERS1 e polimorfismos ligados a PON1 (*rs662* e *rs705379*) nas diferentes fases do déficit cognitivo;
- Se há sinergia entre os polimorfismos apresentados e o déficit cognitivo em idosos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aprovação do Projeto de Pesquisa

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) em 04 de Novembro de 2015 sob o número 1.307.524 em anexo (ANEXO I). Estando envolvidos o Laboratório de Biologia Celular do Envelhecimento (LBCE) e as parcerias com a prefeitura de Vitória e Vila Velha (ANEXO II) e com a Instituição de Longa Permanência para idosos (ILPI) Solares Casa de Repouso LTDA-ME (ANEXO III).

4.2 População Estudada e tipo de pesquisa

Pesquisa exploratória, quantitativa, descritiva, de natureza comparativa, realizada em ILPI parceira e Centro de Convivências para a Terceira Idade com uma população de 178 idosos, localizadas na região da grande Vitória/ Espírito Santo Brasil. Foram excluídos idosos que não participaram de todos os testes e etapas propostas até o final da coleta de dados.

4.3 Etapas e divisões dos grupos experimentais

A primeira etapa do estudo constou de uma triagem feita por alunos de Iniciação Científica dos cursos de Enfermagem, Farmácia, Fisioterapia e Medicina da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), nos pontos focais de captação de idosos (Instituições de Longa Permanência para Idosos participantes e Centros de Vivência).

Os alunos foram treinados, anteriormente a esta etapa e acompanhados pelo professor responsável pela pesquisa e aluna de doutoramento desta tese, a fim de produzir informações relativas à mesma e sua importância social e científica.

No mesmo dia foi agendado testes experimentais que envolveram a avaliação funcional, através de dois instrumentos validados (Index de Independência nas Atividades de Vida Diária de Sidney Katz. (KATZ *et al*, 1976 in Azeredo & Matos, 2003) e Escala de Atividade Instrumental de vida diária Lawton e Brody, Azeredo & Matos, 2003), também por avaliação física-funcional (perimetria, preensão manual para medida de força, cálculo de gordura corporal por protocolo de Pollock de três dobras (JACKSON *et al*, 1985).

A triagem constou de um formulário de anamnese supracitado, criado pelos autores da pesquisa, visando à coleta de história clínica e sócio demográficos dos indivíduos voluntários e em seguida foram submetidos a dois testes preditivos de demência já validados; Mini Exame do Estado Mental (MEEM) e a Escala de Avaliação Clínica da Demência (CDR-Clinical Dementia Rating) onde o score 0 ou 0,5 = sem comprometimento cognitivo; 1 = Comprometimento Leve; 2 Comprometimento Moderado; 3 Comprometimento Grave, a participação de um acompanhante cuidador do idoso se faz necessário (ANEXO IV). (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011; KVITTING *et al.*, 2013; MONTANO, 2005).

Os indivíduos foram separados em grupos experimentais descritos a seguir:

- Grupo Controle

Neste grupo constaram todos os indivíduos participantes que não apresentassem sinais clínicos preditivos de demência

- Grupo Caso

Os indivíduos que participaram deste grupo apresentaram algum sinal clínico preditivo de demência, bem como presença de positividade nos exames específicos CDR e MEEM.

A segunda etapa consistiu na coleta de material biológico (sangue humano em torno de 2,5 ml em triplicata) a fim de analisar o resultado de exames hematológicos pré - estabelecidos pelos pesquisadores (colesterol total e triglicérides) onde foram utilizados exames dispostos pelos indivíduos realizados a menos de um ano.

4.4 Análises Biomoleculares

As amostras de sangue foram resfriadas a 4^o C., centrifugadas a 2800 g em ultracentrífuga (marca SIGMA, modelo: 2-16 PK) por cinco minutos. As amostras foram separadas, em triplicata, em soro e fase branca celular, armazenadas em microtubos. O soro e fase branca foram congelados e preservados a -80°C.

As amostras foram separadas e sofreram descongelamento progressivo a -20°C por 2 horas sendo em seguida imersas em gelo.

4.4.1. Extração do DNA Genômico

Foi utilizado somente a fase branca de sangue periférico utilizando o Protocolo de GOELZ, et al., 1985 com modificações, de acordo com as seguintes etapas: Centrifugação do tubo por 5 minutos a 4800 g a 4°C, descarte do sobrenadante e adição 1mL de TM (tampão de hemólise) para cada amostra de 25 mL: Tris-HCl 1 M, com pH 7,6; concentração final de 10 Mm a (-20°), homogeneizando. Nova centrifugação do tubo por 5 minutos a 4800 g a 4°C e descarte do sobrenadante. Adição de 1mL de TM (-20°) novamente, homogeneizando em seguida de centrifugação do tubo por 5 minutos a 4800 g a 4°C. Novo descarte do sobrenadante. Ressuspensão do precipitado em 405µl de TE9 (tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, com pH 9,0; tris = hidroximetilaminometano, homogeneizando. Adição de 45µl de Solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 0,1% SDS - proteinase K (concentração final de 20 mg/mL), homogeneização leve e incubação em banho-maria a 48°C por 2 horas. Adição de 450µl de PC9 (phenol – clorofórmio) e homogeneização por 1 minuto. Centrifugação a 4800 g por 2 minutos. Transferência do sobrenadante aquoso para um novo tubo e a um volume prévio de 400µl, adição de 100µl de 10M NH₄OH.

Precipitação do DNA com 1mL de etanol 100% gelado (-20 °C). Centrifugação a 4800 g por 15 minutos. Descarte de todo o líquido e lavagem com etanol 70%. Centrifugação a 4800 g por 2 minutos e, novamente, descarte de todo o líquido. Secagem dos tubos por 15 minutos e ressuspensão do DNA em 100µl de água livre de DNA, RNA e DNase. Incubação em banho-maria a 37°C por 15 minutos para eluir o DNA e armazenamento a -20°C.

Os DNAs obtidos foram visualizados em gel de agarose 4% depois de percorrerem 40 minutos em uma cuba de eletroforese horizontal a 120 volts para estimar a qualidade e quantidade de DNA como mostra a figura 6.

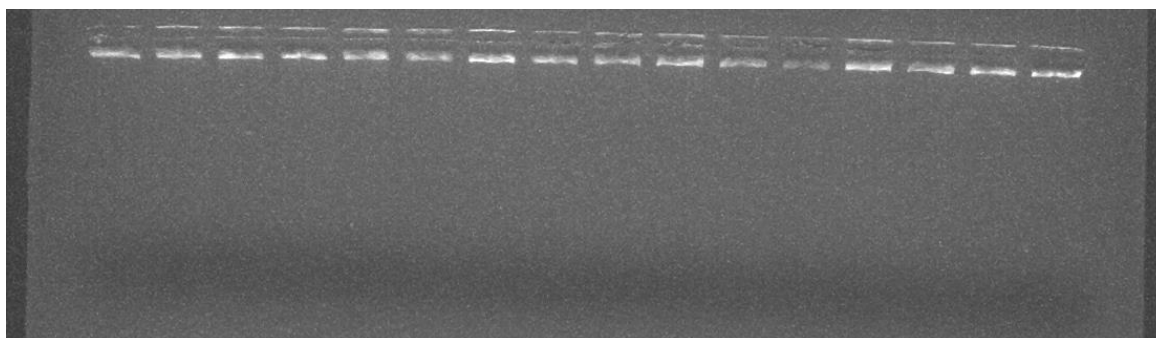


Figura 6. Mostra de gel de agarose, corado com brometo de etídeo, contendo DNA genômico.

A concentração de DNA foi medida por espectrofotometria nas densidades óticas de 280 nm (Nanodrop INC., EUA).

4.4.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP)

As amostras foram submetidas a PCR-RFLP, para avaliação de polimorfismos relacionados a processos demências e doenças crônicas do envelhecimento descritas nos subtópicos a seguir:

4.4.2.1 Apolipoprotína E (ApoE)

Os primers utilizados estão na tabela 1. Foram descritos por EMI *et al.*, em 1988 e modificado com o auxílio do programa BIOEDIT™ (versão 7.0.9.0) e do serviço BLAST do site do National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez), foram feitos anteriormente a esta tese, já estando estabelecidos em nosso laboratório (SOUZA *et al.*, 2017).

Tabela 1. Primers ApoE, sense e anti sense utilizados neste estudo

Foward	5'- ACAGAATTCGCCCGGCCTGGTACAC-3'
Reverse	5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3'

Fonte: SOUZA *et al.*, 2017

As amostras de DNA total foram amplificadas em termociclador (BIO-RAD) pela técnica de PCR gerando fragmentos de 244 pb. Os ciclos da reação foram: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C; seguido por 35 ciclos de 95° C por 30 segundos; 60°C por 30 segundos; 72° C por 30 segundos, respectivamente; finalmente 7 minutos a 72° C.

Para cada reação de PCR foram utilizados tampão 1X, 3 mM de MgCl₂ (Ludwing, Brasil), 0,4 mM de cada dNTP (Ludwing, Brasil) 0,4 mM de cada primer, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Ludwing, Brasil) e cerca de 2uL de DNA. Os produtos de PCR amplificados foram visualizados gel de agarose 4% depois de percorridos 40 minutos a 110 volts em uma cuba de eletroforese horizontal (BIO-RAD, EUA) e os tamanhos estimados com marcador de peso molecular de 100pb (Ludwing, Brasil), figura 7.

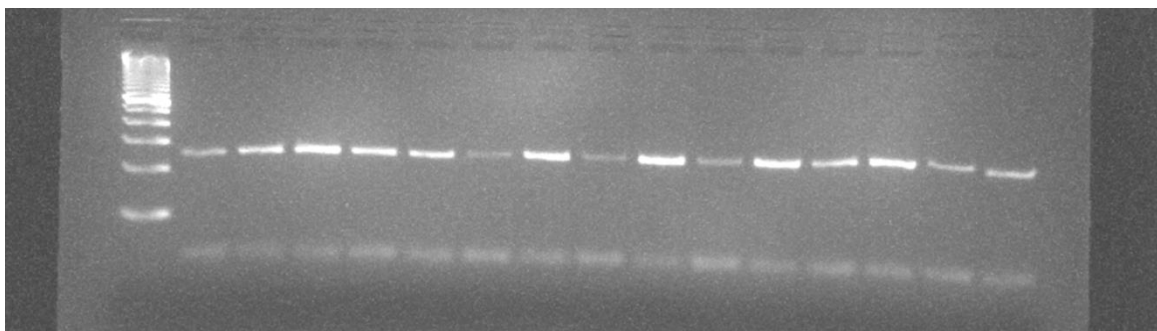


Figura 7. Produto de PCR amplificado para fragmentos de ApoE corado com brometo de etídeo.

Para utilização da técnica de Polimorfismos de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP) foi utilizada a enzima de restrição HhaI (Invitrogen) amplamente utilizada em estudos de polimorfismos do gene da ApoE.

As digestões foram feitas seguindo as especificações dos fabricantes e utilizando 15UL de produto de PCR, os fragmentos de restrição foram visualizados em gel de poliacrilamida 12%, na cuba de eletroforese vertical (BIO-RAD) onde percorreram no gel por 1 hora e trinta minutos a 110 volts. Após fixação por 6 minutos em solução de etanol a 10% e ácido acético 0,5%, corado em solução de nitrato de prata 0,1% por 10 minutos e colocado em uma solução de hidróxido de sódio 3% e formaldeído 0,5%. Foi estimado utilizando marcadores de peso molecular de 50pb (Ludwing, Brasil) (Tabela 2).

Tabela 2 - Padrões de bandas específicas de digestão para o fragmento de 244 pb amplificado a partir do gene da Apolipoproteína E (ApoE)

Enzima de restrição	Sequência dos genótipos	Tamanho dos fragmentos (pb)
HhaI	E2E2	91, 81,38, 18 e 16
	E2E3	91, 81, 48, 38, 33, 18 e 16
	E2E4	91, 81, 72, 48, 38, 33, 19, 18 e 16
	E3E3	91, 48, 38, 33, 18 e 16
	E3E4	91, 72, 48, 38, 33, 19, 18 e 16
	E4E4	72, 48, 38, 19, 18 e 16

Fonte: SOUZA *et al*,2017.

4.4.2.2 Análise dos polimorfismos do ERS1 ligados ao Receptor de Estrogênio Alfa (RE α).

Os primers da região do íntron 1 do ERS1 contendo os SNPs PvuII e XbaI foram feitos anteriormente a esta tese, já estando estabelecidos em nosso laboratório (SOUZA *et al.*, 2017) de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3. Primers da região do íntron 1 do ERS1 contendo os SNPs PvuII e XbaI utilizados neste estudo.

Forward	5`CTGTGTTGTCCATCAGTTCATC3`
Reverse	5`CCATTAGAGACCAATGCTCATC3`

Fonte: SOUZA *et al.*,2017.

Com a utilização de um termociclador (BIO-RAD) foram amplificados fragmentos de 119pb pela técnica de PCR de acordo com o ciclo: Primeiros 5 minutos a 95°C; seguidos por 30 ciclos de: 95° C por 60 segundos, 52°C por 30 segundos e 72° C por 30 segundos, respectivamente; e por fim 5 minutos a 72° C.

Para cada reação de PCR foram utilizados tampão 1X, 3 mM de MgCl₂ (Ludwing, Brasil), 0,4 mM de cada dNTP (Ludwing, Brasil), 0,4 mM de cada primer, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Ludwing, Brasil) e cerca de 50 ng de DNA. Os produtos de PCR amplificados foram visualizados em gel de agarose 4% depois de percorridos 40 minutos a 110 volts em uma cuba de eletroforese horizontal (BIO-RAD, EUA) e os tamanhos estimados com marcador de peso molecular de 50pb (Ludwing, Brasil), figura 8.

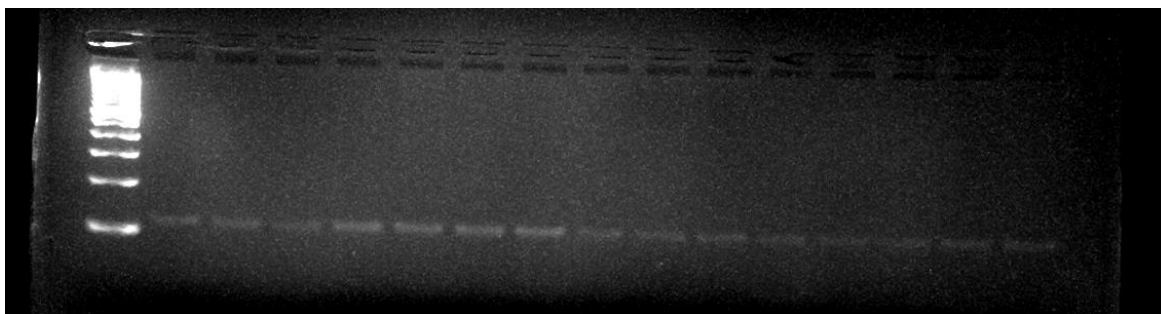


Figura 8. Produto de PCR amplificado para fragmentos de ERS1, corado com brometo de etídeo.

Para utilização da técnica de Polimorfismos de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP) foram utilizadas duas enzimas de restrições PvuII e XbaI.

As digestões foram feitas seguindo as especificações dos fabricantes e os fragmentos de restrição foram aplicados em gel de poliacrilamida 12% e na cuba de eletroforese vertical “correram” por 1 hora e trinta minutos a 110 volts. Após fixação por 6 minutos em solução de etanol a 10% e ácido acético 0,5%, corado em solução de nitrato de prata 0,1% por 10 minutos e colocado em uma solução de hidróxido de sódio 3% e formaldeído 0,5%, era nítido o aparecimento de fragmentos específicos (Tabela 4) que possibilitaram a interpretação dos resultados.

Tabela 4. Padrões de bandas específicas de digestão para o fragmento de 119 pb amplificado a partir do gene ERS1↓: Sítio de restrição reconhecido pelas enzimas.

Enzimas de restrição	Sequência dos alelos	Tamanho dos fragmentos (pb)
PvuII 5`CAGCCG3`	119 5`CAG↓CTG3`	78 e 41
XbaI 5`TCTGGA3`	119 5`T↓CTAGA3`	88 e 31

Fonte: Pontos de corte descritos pelo fabricante.

4.4.2.3 Paroxonase do tipo 1 - PON 1

Para determinar a presença dos polimorfismos em questão, as amostras foram levadas para sequenciamento **em parceria com o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração do Hospital das clínicas de São Paulo (LGCM-INCOR).**

As análises dos genótipos para os polimorfismos no gene *PON 1* (*rs622* e *rs705379*), foram realizadas por amplificação do DNA genômico através da reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*) seguida por análise da curva de *melting* (HRM – *high resolution melting*).

Para este procedimento, as reações foram otimizadas no aparelho *Rotor Gene 6000*[®] (*Qiagen, Courtaboeuf, France*) e utilizando o reagente fluorescente DNA-intercalante *SYTO9*[®] (*Invitrogen, Carlsbad, USA*). A reação foi constituída por 1 µL (10ng) de DNA genômico, 2 µL de tampão de reação (MgCl₂ 2 mM, dNTPs 200mM), 0,4 µL de cada *primer* (200 nM), 0,6 µL de *SYTO9*[®] (1,5 mM), 0,5 U de BioTaq Polimerase DNA (Bio-Química, Brasil) e água para PCR completando para 10 µL.

Na fase da análise da curva de *melting* (HRM), o aparelho mensurou a fluorescência emitida pela reação a cada aumento de 0,1°C de temperatura na faixa de 70-94°C. A curva de *melting* foi gerada pela diminuição da fluorescência com o aumento da temperatura, e na análise, os nucleotídeos polimórficos geram padrões de curva diferenciados em relação aos nucleotídeos selvagens.

Para o polimorfismo *rs622* a frequência do alelo G em *PON rs662* foi de 48,0%. A distribuição dos genótipos foi de 21,1% para homozigotos mutados, 53,2% para heterozigotos e 25,7% para genótipo do tipo selvagem. A distribuição genotípica para o polimorfismo *PON rs662* encontra-se semelhante do descrito em estudos do NCBI e está em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($X^2 = 0,56$; $p = 0,43$). Figura 9 e gráfico 2 abaixo:

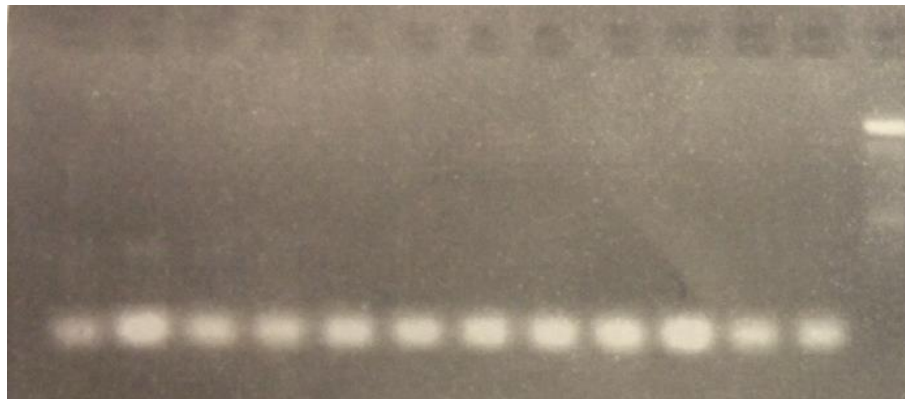


Figura 9. Foto do gradiente de temperatura para *PON rs662* em gel de agarose (Fonte: LGCM-INCOR, 2017)

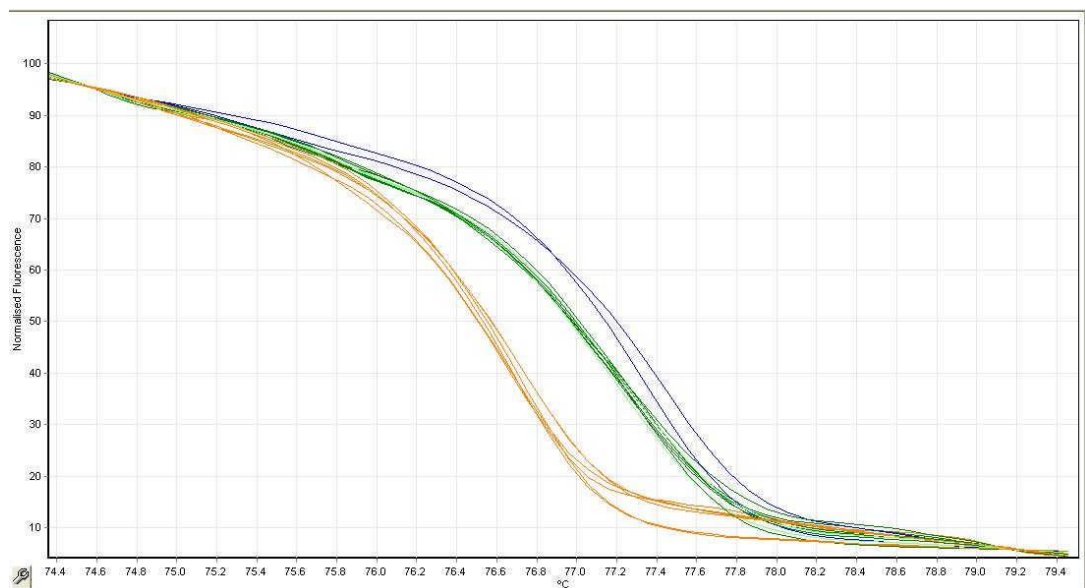


Gráfico 2. Gráfico *PON rs662* (A>G): Gráfico da fluorescência normalizada pela temperatura. Genótipos: Laranja Selvagem (AA), Verde Heterozigoto (AG) e Azul Homozigoto (GG).

Já a frequência do alelo G em *PON rs705379* foi de 47%. A distribuição dos genótipos foi de 21% para homozigotos mutados, 53,2% para heterozigotos e 25,8% para genótipo do tipo selvagem. A distribuição genotípica para o polimorfismo *PON rs705379* encontra-se semelhante do descrito em estudos do NCBI e está em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($X^2= 0,56$; $p= 0,43$). Figura 10 e gráfico 3 abaixo:

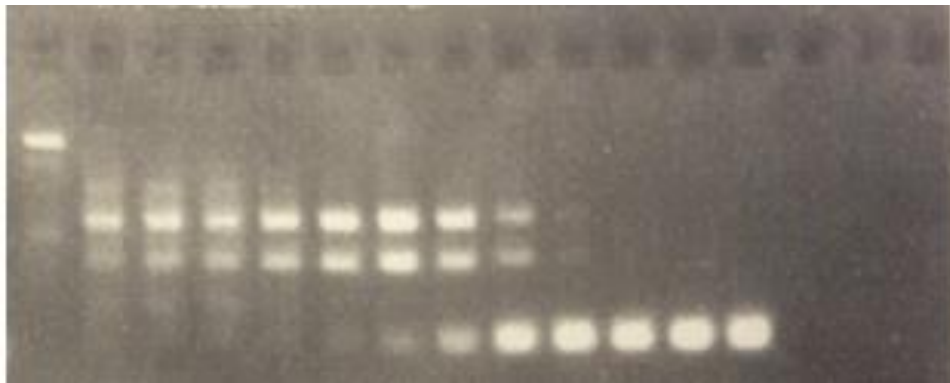


Figura 10. Foto do gradiente de temperatura para *PON rs705379* em gel de agarose

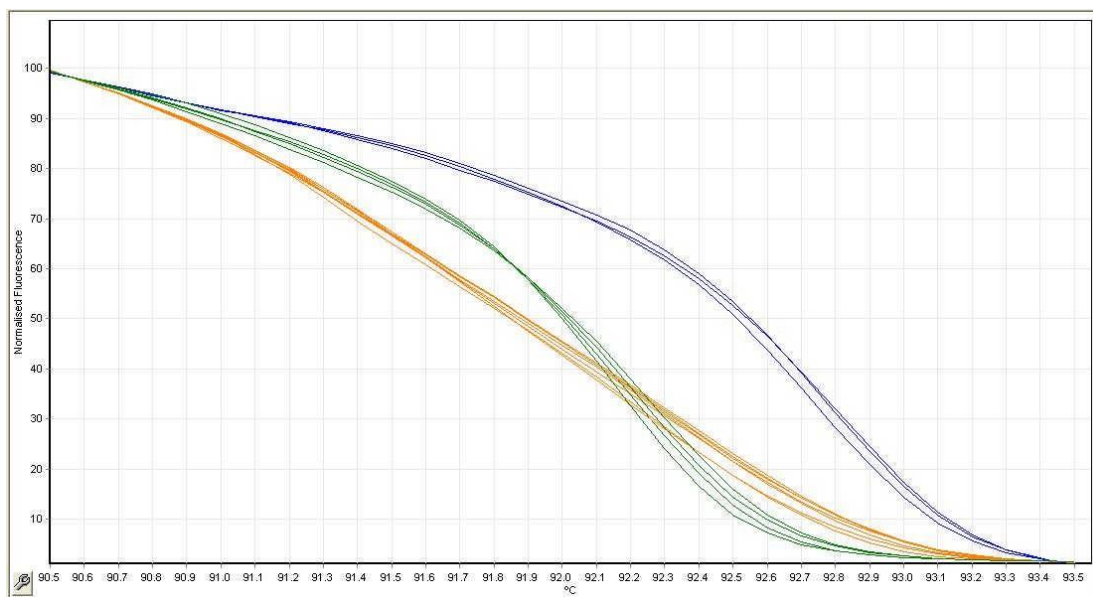


Gráfico 3. Gráfico do Teste no HRM para *PON rs705379* (A>G): Gráfico da fluorescência normalizada pela temperatura. Genótipos: Laranja Selvagem (AA), Verde Heterozigoto (AG) e Azul Homozigoto (GG).

Amostras de três curvas observadas foram submetidas ao sequenciamento direto (*ABI Terminator Sequencing Kit*[®] e sequenciador *ABI 3500*[®] - *Applied Biosystems, Foster City, CA, E.U.A.*) para a confirmação dos genótipos indicados pelo HRM.

Foram utilizados *primers* elaborados a partir da numeração *rs* já descrita para cada polimorfismo e desenhados no programa *Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) que podem ser vistos na tabela 5. Reforçando que todo o processo de sequenciamento foi realizado em parceria **com o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração do Hospital das clínicas de São Paulo.**

Tabela 5 - Primers PON1 utilizados neste estudo.

<u><i>rs622</i></u>	
Foward	5'- TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG -3'
Reverse	5'- CACGCTAAACCCAAATACATCTC -3'
<u><i>rs705379</i></u>	
Foward	5'- ACGGGCTAGGAGGCTCTG -3'
Reverse	5'- GCCTTCTGTGCACCTGGTC -3'

5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

No primeiro capítulo para a confecção de planilhas e para a realização dos testes estatísticos os dados foram analisados utilizando-se os programas *GraphPad Prism 6 for Windows Version 5.00*, *Microsoft® Office Excel® 2010* (12.0.6514.5000).

Foram utilizados ANOVA uma via e teste T com pós-teste de Tukey / Bonferroni.

Para grupos independentes utilizou-se o teste de Mann-Whitney.

Inicialmente, apresentou-se a distribuição de frequências dos genes entre ambos os sexos, separados pelos grupos Caso e Controle, assim como se exibiu uma tabela com as frequências e porcentagens dos genes relacionados ao grau da doença, medido pela variável **CDR**.

A fim de verificar se diferentes grupos têm a mesma proporção de indivíduos, com determinada característica, ou se existe associação entre duas variáveis, utilizou-se o **teste Qui-quadrado**. A partir deste, é verificada se a igualdade entre as proporções é estatisticamente significativa. Entretanto, em alguns casos, os pressupostos necessários para a aplicação do teste não foram atendidos, implicando na utilização do **teste exato de Fisher**, podendo-se interpretar da mesma forma.

Para comparar os genes e alelos de ApoE quanto as variáveis contínuas AIVD, IMC, Força de preensão D e E, realizaram-se testes estatísticos de comparação entre os grupos. Estes são realizados levando em conta a suposição da normalidade na distribuição dos dados.

As variáveis IMC e Força de Preenção, apresentaram normalidade em suas distribuições, portanto, utilizou-se o **teste t** para comparação de médias entre dois grupos. Entretanto, as variáveis AIVD e Força de Preenção D não apresentaram distribuições normais, implicando no uso do teste não-paramétrico *Mann-Whitney*. Em ambos os casos, o valor-p menor que 0,05 indica que a diferença entre os dois grupos é estatisticamente significativa.

Por fim, criou-se a variável “**Genes**”, responsável por expressar a quantidade de genes presentes em um determinado paciente. Um modelo de **regressão logística** foi construído a fim de verificar se a razão de chances aumenta se coexistir a presença de mais de um gene.

Os resultados foram apresentados em números absolutos e percentís para a descrição da população estudada. Os demais dados de acordo com a média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças observadas durante a análise foram consideradas estatisticamente significativas quando a probabilidade encontrada foi menor que 0,05 (5%).

Destaca-se que os genes AA, AG e GG oriundos do genótipo *rs622* foram apresentados com o 1 em seguida (AA1, AG1 e GG1), enquanto o genótipo *rs 705379* foi apresentado como AA2, AG2 e GG2.

6. RESULTADOS

Os resultados foram separados em capítulos descritos a seguir:

CAPITULO 1: Abordagem dos Aspectos Clínicos, Avaliação Física e Funcional de Idosos Portadores de Alteração Cognitiva

6.1 Caracterização da Amostra

O número de idosos que concordaram em participar do estudo foi de 178 indivíduos que apresentam mediana de idade de 74(65 mínimo-95 máximo) anos.

Observou-se uma população homogênea, classe média baixa, onde predomina a viuvez, com resultado estatisticamente significativo, entre os grupos para a diferença de localidade, podendo-se constatar que há presença de indivíduos com maior grau de perda cognitiva alocados em instituição de longa permanência (R) em relação aos encontrados na comunidade local (P). Também houve diferença estatística quanto ao grau de escolaridade da população em questão, observando-se que a predominância de indivíduos com perda cognitiva está na faixa de estudo do ensino fundamental (EF) e ainda que o grupo controle como um todo seja mais escolarizado que o grupo caso (Tabela 6).

Pode-se observar que há presença maciça nos dois grupos, de doenças crônicas prevalentes no envelhecimento como a hipertensão (HAS) e dislipidemia preponderante no grupo de indivíduos com perda cognitiva. Também vale ressaltar que a população é saudável em seus hábitos relacionados à presença de tabagismo e etilismo e em questão de prática de alguma atividade física, sendo o sedentarismo um fator não observado. (Tabela 7)

Tabela 6. Apresentação sociodemográfica da população estudada

Variáveis	CONTROLE	CASO	Valor - p
	<i>n/%</i>	<i>n/%</i>	
Sexo			
Feminino	90(85,7)	62(84,9)	0,884
Masculino	15(14,3)	11(15,1)	
Localidade			
ILPI	15(14,3)	35(47,9)	<0,001
Comunidade	90(85,7)	38(52,1)	
Raça			
Branco	52(49,5)	33(45,2)	0,848
Negro	27(25,7)	20(27,4)	
Pardo	26(24,8)	20(27,4)	
Escolaridade			
Ensino Fundamental	54(51,4)	52(71,2)	0,028
Ensino Médio	31(29,5)	11(15,1)	
Ensino Superior	19(18,1)	10(13,7)	
Total	105	73	

Tabela 7. Apresentação clínica da população estudada

Variáveis	CONTROLE	CASO	Valor-p
	<i>n/%</i>	<i>n/%</i>	
Tabagismo			
Sim	35(33)	23(31,5)	0,798
Não	70(66,7)	50(68,5)	
Etilismo			
Sim	30(28,6)	30(41,1)	0,082
Não	75(71,4)	43(58,9)	
Doença Vascular			
Sim	47(44,8)	34(46,6)	0,811
Não	58(55,2)	39(53,4)	
HAS			
Sim	72(68,6)	57(78,1)	0,162
Não	33(31,4)	16(21,9)	
Dislipidemia			
Sim	50(47,6%)	51(69,9%)	0,003
Não	55(52,4%)	22(30,1%)	
Cardiopatía			
Sim	51(48,6%)	33(45,2%)	0,658
Não	54(51,4%)	40(54,8%)	
Atividade Física			
Sim	103(98,1%)	63(86,3%)	0,004
Não	2(1,9%)	10(13,7%)	
Total	105	73	

Para produzir melhores conclusões, foi analisada tanto a correlação entre nível cognitivo e capacidade funcional com cada variável estudada, quanto à comparação entre os grupos estudados e a diferença de gênero.

6.2 Correlação entre as Variáveis Clínicas, Deficit Cognitivo e Capacidade Funcional

Consideramos três variáveis principais para correlacionarmos ao exame físico e biomolecular da população, a ser: o exame cognitivo dado pelo Mini Exame do Estado mental (MEEM) que mede a presença ou ausência de perda cognitiva. Escala Clínica de Demência (CDR) que aborda o estágio de perda cognitiva que o indivíduo se encontra e o índice de Katz que mede o grau de dependência física para atividades instrumentais de vida diária (AIVD). Diante destas variáveis e da divisão em grupo controle e caso, quantificamos a associação existente, por teste de correlação de Pearson, com as demais variáveis relacionadas avaliação antropométrica; de gordura corporal e dois índices preditores de obesidade (Índice de Massa Corpórea –IMC e Relação Cintura versus Quadril- RCQ), força muscular (teste de prensão) e parâmetros bioquímicos do lipidograma, demonstrados nas tabelas 8, 9, 10 e 11.

Inicialmente, foi analisado o conjunto de dados referente ao exame de antropometria dos grupos controle (GC) e grupo caso (SHAZ). Foi possível observar uma fraca correlação entre a funcionalidade do indivíduo do grupo controle com a medida de percentual de gordura excedente e peso excedente.

Tabela 8. Correlação entre MEEM, CDR E AIVD com antropometria.

	MEEM	CDR	AIVD	Valor-p
	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	
% de Gordura Total				
GC	0,136	-	-0,077	-
SHAZ	-0,008	-0,0981	0,115	-
% de Gordura Excedente				
GC	0,131	-	-0,213	0,021
SHAZ	0,030	-0,094	0,142	-
Peso Magro				
GC	0,034	-	0,134	-
SHAZ	0,167	0,115	-0,005	-
Peso Gordo				
GC	0,066	-	-0,0885	-
SHAZ	0,028	0,517	-0,019	-
Peso Excedente				
GC	0,026	-	-0,201	0,039
SHAZ	0,080	0,002	0,131	-

Os resultados entre grupos para os parâmetros, variações de peso e peso magro em kg, nos grupos controle (GC) e caso (SHAZ) comparado entre si respectivamente, controle versus controle (A e C) ou caso versus caso (B e D) – comparação de gêneros e comparados caso/controle (E e F).

Foi observado que houve diferença estatística apenas para o peso magro das mulheres do grupo controle, comparado aos homens do mesmo grupo ($p=0,03$). É válido ressaltar que apesar de não haver diferença estatística, o peso magro e o peso real supera o das mulheres doentes (Figura 11).

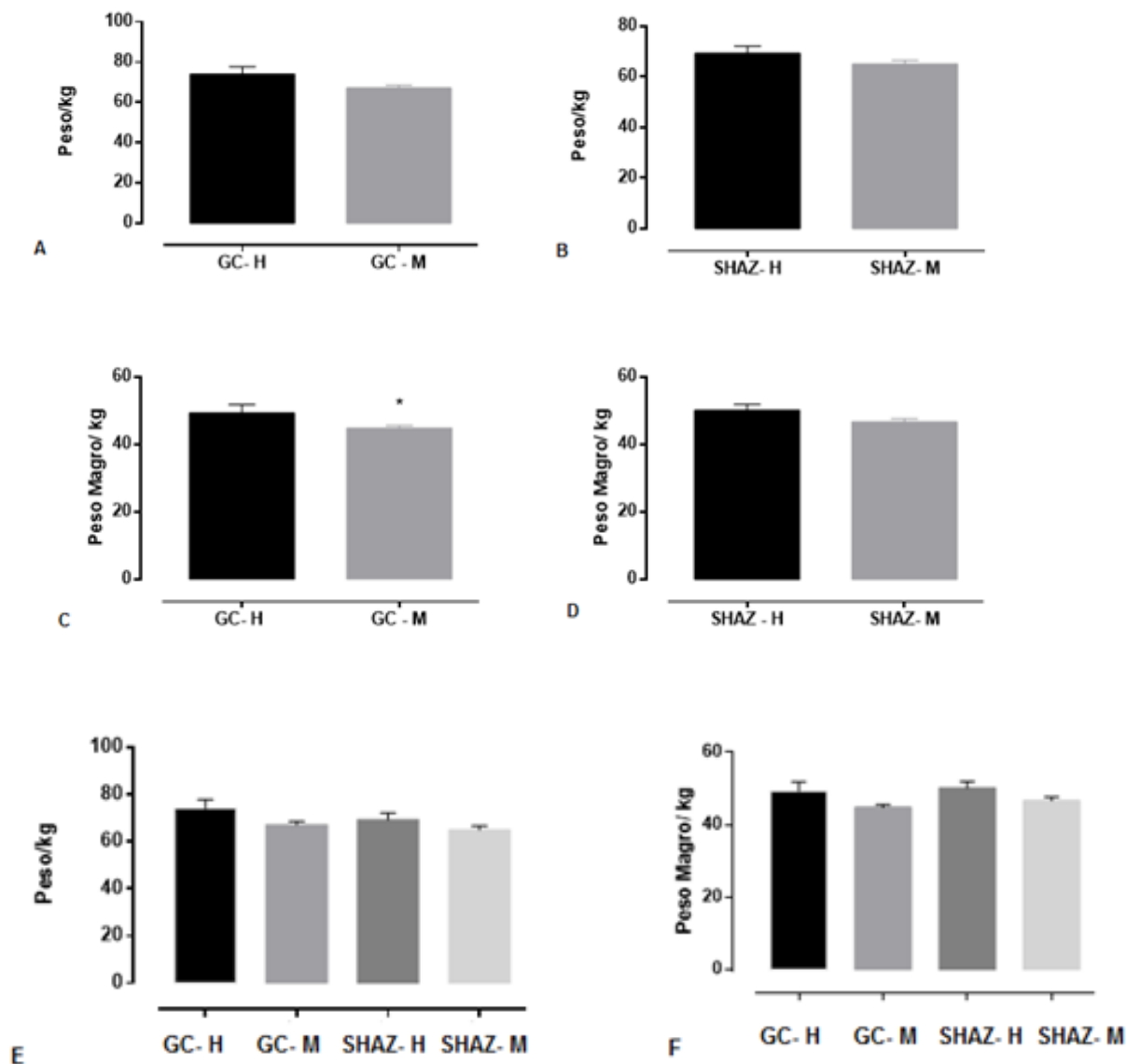


Figura 11. Comparação das variáveis peso e peso magro entre gêneros de um mesmo grupo e entre caso/controlado. **A:** controle versus controle, **B:** Caso versus caso, **C:** comparação de gêneros e comparados caso/controlado. GC-H; grupo controle homem, GC-M, grupo controle mulher; SHAZ-H, grupo caso homem; SHAZ-M, grupo caso mulher.

As relações entre as variações de percentual de gordura total e gordura excedente, nos grupos controle (GC) e caso (SHAZ), comparados entre si respectivamente, controle versus controle (A e C) ou caso versus caso (B e D) – comparação de gêneros e comparados caso/controlado (E e F) (Figura 16)

Para este conjunto de resultado foi observado diferença estatística nas comparações entre caso controle para percentual de gordura total, tendo as mulheres doentes uma redução em relação às do grupo controle ($p = 0,05$). Igualmente, em ambos os gêneros, houve uma redução no grupo caso para percentual de gordura excedente ($p < 0,0001$). (Figura 12)

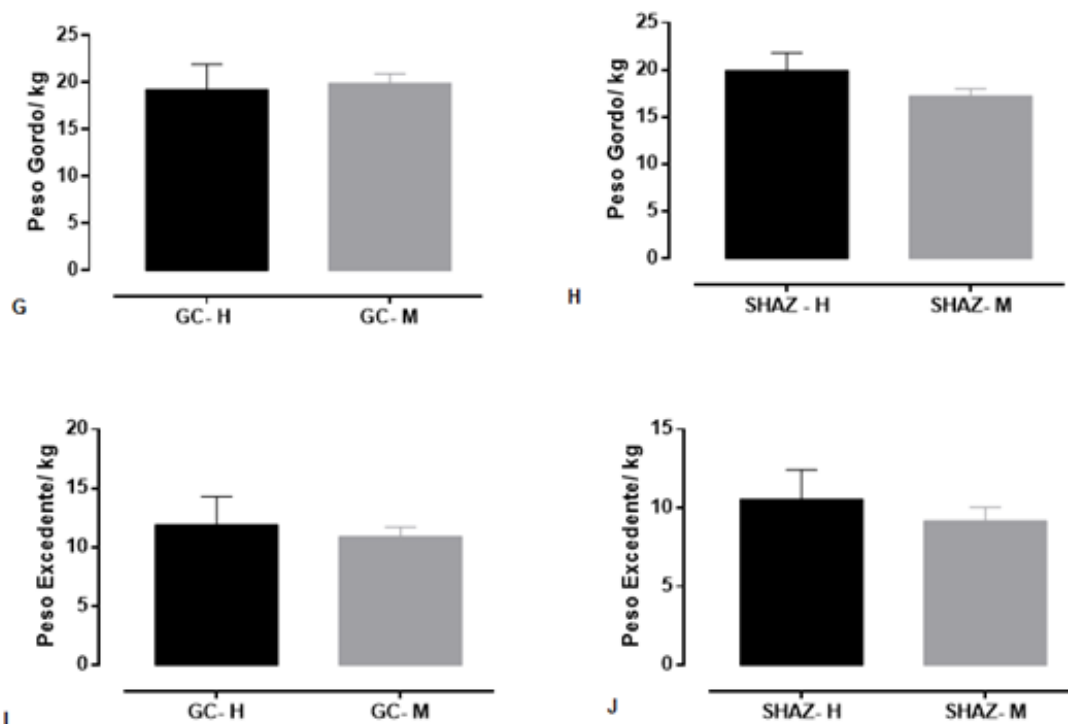


Figura 12. Comparação das variáveis percentual de gordura total e exedente entre gêneros de um mesmo grupo e entre caso/controle. **A/C:** controle versus controle, **B/D:** Caso versus caso, **E/F:** comparação de gêneros e comparados caso/controle. GC-H; grupo controle homem, GC-M, grupo controle mulher; SHAZ-H, grupo caso homem; SHAZ-M, grupo caso mulher.

Para este conjunto de resultados, foi observada diferença estatística apenas para redução do peso gordo para mulheres do grupo caso em relação ao controle ($p = 0,001$).

6.3 Análise Antropométrica, índices preditores de Obesidade e riscocardiovascular e teste de força muscular.

A análise da perimetria revelou que no grupo controle houve correlação fraca relacionada à avaliação cognitiva para as medidas de tórax apenas, já no grupo caso houve correlação fraca para as medidas de tórax, abdômen, quadril e panturrilhas e moderada para a medida de coxa, ambas relacionadas à avaliação cognitiva (tabela 9), sendo estas diretamente proporcionais, sugerindo que a perda de massa muscular teria relação com o déficit cognitivo apresentado neste grupo. Avaliando as mesmas variáveis, ainda para o grupo caso, verificou-se uma correlação entre a perda de massa do membro inferior inversamente proporcional ao estadiamento da doença, sugerindo que a perda ocorre cada vez mais nos estágios avançados da doença.

Em relação à capacidade funcional, notou-se correlação fraca inversamente

proporcional, para o grupo controle, em braço direito e esquerdo e diretamente proporcional em membros inferiores, sugerindo que há perda funcional independente do processo doença. Porém, a correlação passa a moderada no grupo caso, mostrando assim que os indivíduos com perda cognitiva apresentam maior grau de dependência relacionado ao controle. (tabela 9)

Tabela 9. Correlação entre MEEM, CDR E AIVD com perimetria

	MEEM	CDR	AIVD	Valor-P
	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	
Tórax				
GC	0,194*	-	-0,068	0,047
SHAZ	0,236*	-0,009	0,098	0,044
Braço Direito				
GC	0,024	-	-0,197	0,043
SHAZ	-0,026	-0,004	0,029	-
Braço Esquerdo				
GC	0,098	-	-0,205	0,036
SHAZ	0,002	0,002	0,042	-
Antebraço Direito				
GC	-0,077	-	-0,096	-
SHAZ	-0,014	0,033	0,022	-
Antebraço Esquerdo				
GC	-0,043	-	-0,055	-
SHAZ	-0,071	0,132	-0,066	-
Cintura				
GC	0,110	-	-0,058	-
SHAZ	0,028	-0,112	0,132	-

Abdômen	0,181	-	-0,075	-
GC	0,231	-0,049	0,186	0,049
SHAZ				
Quadril	0,149	-	-0,078	-
GC	0,387	-0,221	0,316	<0,001/0,006
SHAZ				
Coxa Direita	0,017	-	0,253	0,254
GC	0,477	-0,426	0,458	0,526
SHAZ				
Coxa Esquerda				
GC	0,063	-0,034	0,295	0,008
SHAZ	0,404	0,309	0,548	<0,001
Panturrilha Direita				
GC	0,025	-	0,306	0,002
SHAZ	0,304	-0,367	0,533	<0,001/0,005/<0,001
Panturrilha Esquerda				
GC	-	-	0,458	0,001
SHAZ	-0,324	-0,315	0,546	0,002/0,006/<0,001

A relação entre o fator cognição e funcionalidade versus índices preditores de obesidade e risco cardiovascular. Observamos uma correlação fraca para os indivíduos portadores de déficit cognitivo relacionado ao índice de massa corpórea e moderada para a relação cintura quadril sugerindo que risco cardiovascular e obesidade podem ser fatores de risco para incapacidade funcional e para o desenvolvimento de transtornos cognitivos e possível evolução para uma demência.

Também foi observado a presença de correlação fraca, diretamente proporcional, ou seja, quanto maior o score cognitivo melhor o resultado do teste para força de preensão manual direita e esquerda no grupo controle e também representado da mesma forma quando relacionado com a funcionalidade. A presença de correlação moderada para o grupo caso também nos dois quesitos e fraca por presente para o estadiamento de forma inversamente proporcional o que atenta para quanto maior o estágio pior estará a força muscular (tabela 10).

Tabela 10. Correlação entre MEEM, CDR e AIVD com preditores de obesidade, risco cardiovascular e preensão.

	MEEM	CDR	AIVD	Valor-p
	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	
IMC				
GC	0,164	-	-0,074	-
SHAZ	0,265	-0,195	0,279	0,023/0,016
RCQ				
GC	-0,014	-	-0,458	0,001
SHAZ	-0,407	0,505	-0,513	<0,001
Preensão Direita				
GC	0,302	-	0,385	0,001/<0,001
SHAZ	0,651	-0,316*	0,281	<0,001/0,006/0,015
Preensão Esquerda				
GC	0,264	-	0,434	0,006/<0,001
SHAZ	0,638	-0,286	0,262	<0,001/0,014/0,025

Esta etapa faz menção à perda de força muscular em relação à presença ou não do deficit cognitivo. É sabido que há redução deste parâmetro com o envelhecimento, independente da presença ou não do déficit cognitivo aqui discutido. Por isso, consideramos o grupo controle como a base real das medidas de dinamometria manual em quilograma força (Kgf), para perda de força relacionada à doença, sendo os valores de referencia segundo Bohannon *et al.*, 2006, maior que 24,8–34,7 Kgf para homens e 16,0–19,9 Kgf para mulheres (Figura 13).

O resultado de força de preensão manual direita e esquerda, nos grupos controle (GC) e casos (SHAZ) comparados entre si, controle versus controle (A) ou caso versus caso (B) – comparação de gêneros e comparados caso/controle (C).

Quando se analisou entre grupos o IMC, observa-se que não houve diferença estatística entre os índices, mas vale ressaltar que foi observado no grupo caso uma ligeira tendência a um IMC maior para as mulheres, no entanto quando comparados ao controle, este, independente do gênero se mostrou mais elevado que no grupo caso (Figura 14)

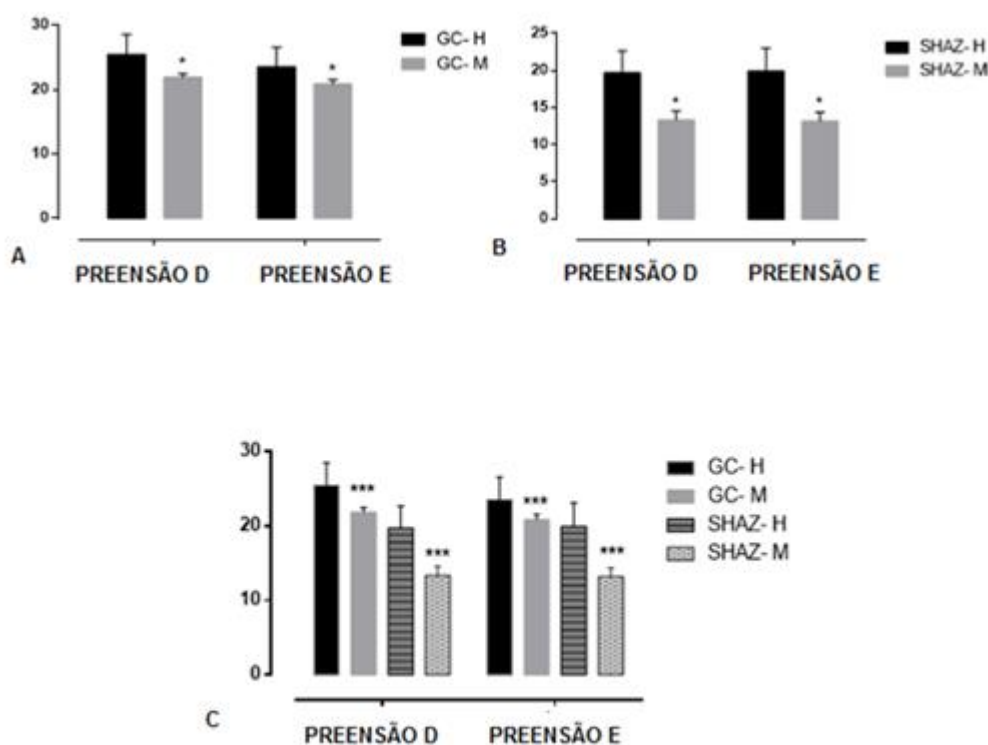


Figura 14 Comparação da força de preensão direita (D) e esquerda (E) entre gêneros de um mesmo grupo e entre caso/controle. **A:** controle versus controle, **B:** Caso versus caso, **C:** comparação de gêneros e comparados caso/controle. GC-H; grupo controle homem, GC-M, grupo controle mulher; SHAZ-H, grupo caso homem; SHAZ-M, grupo caso mulher.

Observa-se que há presença de diferença estatisticamente significativa entre mulheres do grupo controle e mulheres do grupo caso ($p = 0,003$), sendo que em ambos há maior perda de força presente em indivíduos do grupo caso ($p < 0,001$).

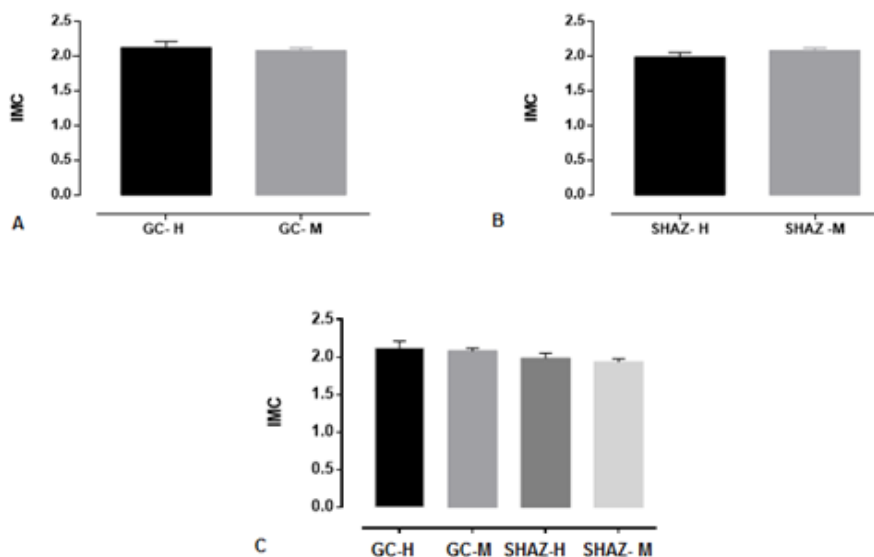


Figura 15 Comparação do Índice de massa corpórea IMC, entre gêneros de um mesmo grupo e entre caso/controle. **A:** controle versus controle, **B:** Caso versus caso, **C:** comparação de gêneros e comparados caso/controle. GC-H; grupo controle homem, GC-M, grupo controle mulher; SHAZ-H, grupo caso homem; SHAZ-M, grupo caso mulher.

6.4 Análise de Colesterol total e triglicérides

Analizados os parâmetros bioquímicos, colesterol total e triglicérides, apenas o colesterol mostrou correlação significativa inversamente proporcional ao estadiamento da doença e diretamente proporcional ao grau de funcionalidade do indivíduo do grupo caso (tabela 11).

Tabela 11. Correlação entre MEEM, CDR E AIVD com parâmetros bioquímicos do lipidograma.

	MEEM	CDR	AIVD	Valor-P
	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	
COLESTEROL TOTAL				
GC	-0,030	-	0,101	-
SHAZ	0,498	-0,254*	0,304*	0,030/0,008*
TRIGLICÉRIDES				
GC	-0,003	-	0,152	-
SHAZ	0,010	-0,216	0,187	-

A população estudada apresentou, em ambos os grupos, um padrão dislipidêmico, sendo o valor de referência utilizado para colesterol total de 190 mg/dL, valor este recomendado pela sociedade brasileira de cardiologia. Na **figura 16** veremos as relações entre as variações de colesterol total nos grupos controle (GC) e caso (SHAZ), comparadas entre si - controle versus controle (A) ou caso versus caso (B) – comparação de gêneros e comparados caso/controle (C).

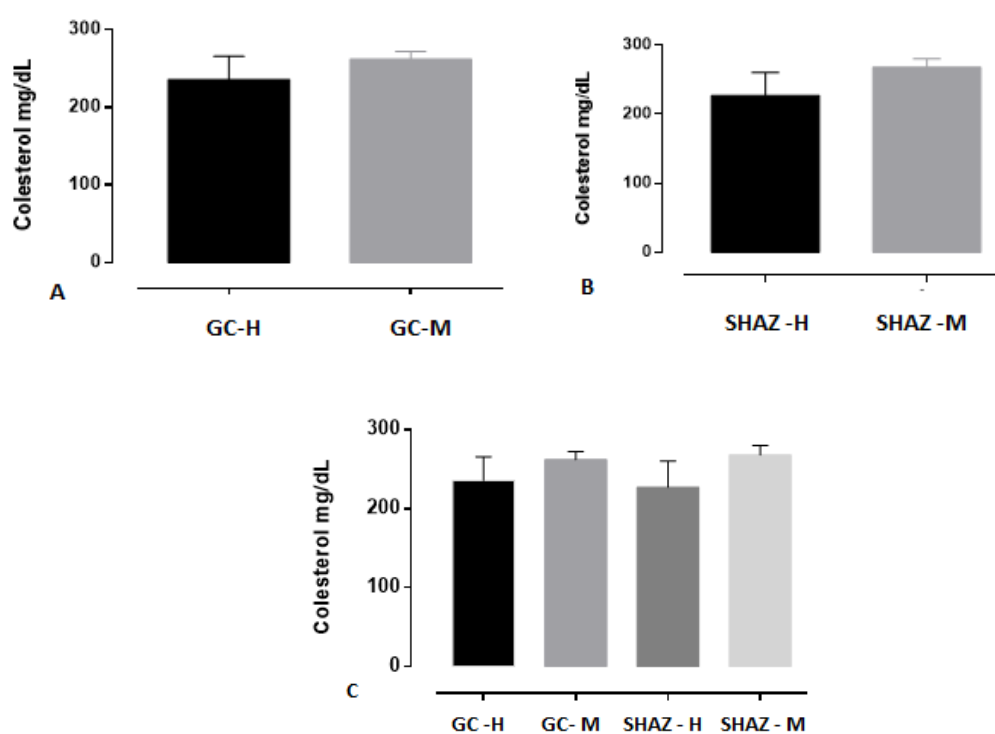


Figura 16. Níveis de colesterol total entre gêneros de um mesmo grupo e entre caso/controle. **A:** controle versus controle, **B:** Caso versus caso, **C:** comparação de gêneros e comparados caso/controle. GC-H; grupo controle homem, GC-M, grupo controle mulher; SHAZ-H, grupo caso

homem; SHAZ-M, grupo caso mulher.

Observou-se que há presença de hipercolesterolemia em ambos os grupos e gêneros, porém nas mulheres a taxa foi mais alta. Não houve diferença estatística neste caso ($p=0,006$).

Para triglicérides, a população estudada apresentou em ambos os grupos um padrão dislipidêmico, sendo o valor de referência utilizado para triglicérides ideal total de 150 mg/dL e limítrofe 200 mg/dL, valor este também recomendado pela sociedade brasileira de cardiologia. **Na figura 17** estão apresentados as relações entre as variações de triglicérides nos grupos controle (GC) e caso (SHAZ) comparados entre si - controle versus controle (A) ou caso versus caso (B) – comparação de gêneros e comparados caso/controle (C).

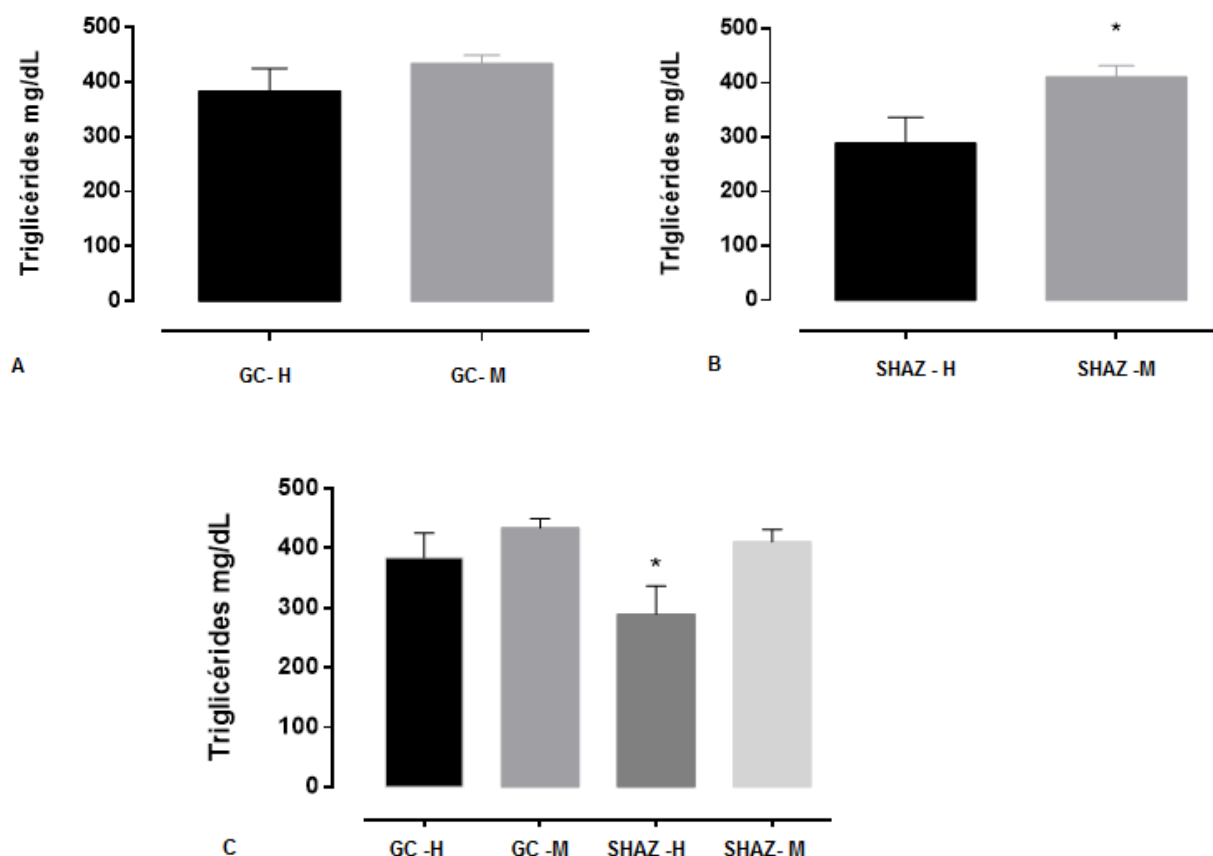


Figura 17. Níveis de triglicérides entre gêneros de um mesmo grupo e entre caso/controle. **A:** controle versus controle, **B:** Caso versus caso, **C:** comparação de gêneros e comparados caso/controle. GC-H; grupo controle homem, GC-M, grupo controle mulher; SHAZ-H, grupo caso homem; SHAZ-M, grupo caso mulher.

Observou-se que há aumento dos triglicérides em ambos os grupos e gêneros. Quando comparados os grupos entre si, houve diferença significativa para as mulheres doentes e quando comparamos caso e controle encontramos diferença significativa para os homens doentes, apresentando uma taxa mais baixa que os demais grupos ($p = 0,004$).

6.5 Análise da Função Cognitiva e Nível de Independência Funcional

Esta análise mostra as variáveis-chaves do trabalho, buscando entender o comportamento funcional diante da presença ou não do déficit cognitivo, se houve alteração de ambos, para as **Atividades Instrumentais de Vida Diária (AIVD)** que compreendem as atividades que dão suporte as atividades de vida diária em casa ou na comunidade e que, frequentemente, exigem interações mais complexas que as atividades básicas. O score dessas atividades é decrescente (de 21 a 0) sendo quanto mais baixo mais dependente o indivíduo se encontra para tal atividade.

No resultado das variações de função cognitiva (MEEM), estadiamento do déficit cognitivo (CDR) e grau de independência funcional para atividades instrumentais de vida diária (AIVD) nos grupos controle (GC) e casos (SHAZ) comparados entre si - controle versus controle (A) ou caso versus caso (B) – comparação de gêneros e comparados caso/controle (C).

Encontramos em ambos os grupos diferenças reais quanto à análise de funcionalidade, onde os idosos doentes são mais dependentes que os encontrados no grupo caso, independente do gênero. Este resultado sugere que a atividade funcional apresente uma relação diretamente proporcional ao nível cognitivo (dependência parcial ou total foi encontrada com scores menores que 15) $p < 0,001$. (figura 13)

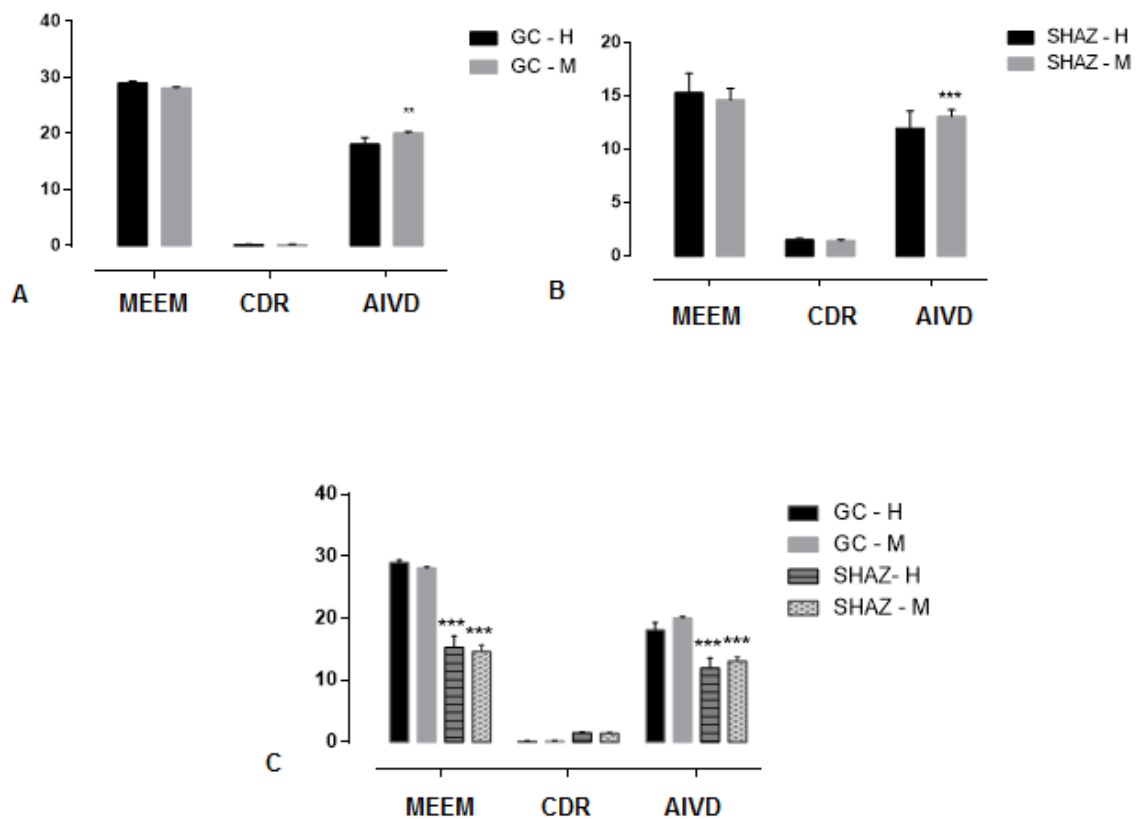


Figura 13. Comparação do nível cognitivo, grau de comprometimento e funcionalidade entre gêneros de um mesmo grupo e entre caso/controlado. **A:** controle versus controle, **B:** Caso versus caso, **C:** comparação de gêneros e comparados caso/controlado. GC-H; grupo controle homem, GC-M, grupo controle mulher; SHAZ-H, grupo caso homem; SHAZ-M, grupo caso mulher.

6.6 Modelo de regressão logística para os dados Clínicos

Realizou-se um modelo de regressão logística com as variáveis demográficas e de doenças crônicas significantes, oriundas da Tabela 12. Em negrito estão apresentados os casos em que o *Odds Ratio* (razão de chances) foi significativo.

Tabela 12. Regressão logística com variáveis demográficas e doenças crônicas

Variáveis		OR ajustado			
		IC (OR)			
		OR	LI 95%	LS 95%	valor-p(OR)
Escolaridade	Ensino Fundamental	2,194	0,841	5,720	0,1082
	Ensino Médio	0,788	0,252	2,465	0,6821
	Ensino Superior	1			
Faixa Etária	até 69 anos	1			
	70 a 79 anos	1,658	0,710	3,873	0,2429
	80 a 89 anos	3,849	1,465	10,112	0,0062
	90 ou mais	15,000	1,552	144,964	0,0193
Dislipidemia	Sim	3,166	1,527	6,566	0,0020
	Não	1			
Atividade Física	Sim	0,138	0,023	0,834	0,0310
	Não	1			

Pode-se inferir, a partir da Tabela 11, que os indivíduos que possuem 90 ou mais anos de idade possuem 15 vezes chances mais de apresentar a doença do que os que possuem até 69 anos, que neste caso é a categoria de referência. Os que possuem dislipidemia possuem 3,166 vezes chances mais de ter a doença. Entretanto, aqueles que praticam atividade física possuem menor chance de apresentar as alterações cognitivas, quando comparado àqueles que não praticam. (OR=0,138)

CAPITULO 2: ASPECTOS GENÉTICOS EM UMA POPULAÇÃO DE IDOSOS PORTADORES DE ALTERAÇÕES COGNITIVAS

RESULTADOS

6.7 Proporção dos Alelos balizadores de ApoE e genótipos ERS1 e PON1 entre os gêneros.

Buscando saber se haveria diferença entre as proporções dos genes em relação a cada gênero, a tabela 13 mostrará tal proporção.

Tabela 13. Descrição das proporções dos genes entre gêneros

Variáveis / Categorias	SEXO				valor-p		
	Masculino		Feminino				
	N	N%	N	N%			
Alelo ApoE	E2	Sim	8	36,4%	74	58,7%	0,050
		Não	14	63,6%	52	41,3%	
	E3	Sim	20	90,9%	93	73,8%	0,082
		Não	2	9,1%	33	26,2%	
	E4	Sim	7	31,8%	50	39,7%	0,484
		Não	15	68,2%	76	60,3%	
Gene ERS1 PVU	PP	Sim	8	36,4%	10	7,9%	0,050
		Não	14	63,6%	116	92,1%	
	Pp	Sim	14	63,6%	83	65,9%	0,839
		Não	8	36,4%	43	34,1%	
	pp	Sim	0	0,0%	33	26,2%	0,033
		Não	22	100,0%	93	73,8%	
Gene ERS1 Xball	XX	Sim	2	9,1%	12	9,5%	0,999
		Não	20	90,9%	114	90,5%	
	Xx	Sim	15	68,2%	66	52,4%	0,169
		Não	7	31,8%	60	47,6%	
	xx	Sim	5	22,7%	48	38,1%	0,165
		Não	17	77,3%	78	61,9%	
Gene PON1 RS705379	AA2	Sim	7	31,8%	18	19,8%	0,650
		Não	15	68,2%	73	80,2%	
	AG2	Sim	4	18,2%	31	34,1%	0,148
		Não	18	81,8%	60	65,9%	
	GG2	Sim	10	45,5%	26	28,6%	0,127
		Não	12	54,5%	65	71,4%	

Os resultados demonstram que a proporção relacionada ao gênero para cada gene foi relevante para o alelo E2 e genótipo PP (ERS1- PvuII) para o sexo feminino, enquanto para o sexo masculino apenas AG1, relativo à rs622.

6.8 Frequências dos Alelos balizadores de ApoE e genótipos ERS1 e PON1 entre os gêneros e grupos.

O resultado da distribuição dos alelos foco do estudo, entre gêneros e grupos de estudo caso/controle. Enquanto a tabela 15 mostra o resultado da distribuição dos genótipos encontrados para os genes ligados ao receptor de estrogênio e a PON 1.(Tabela 4)

Tabela 14. Distribuição dos alelos da ApoE entre os sexos nos grupos caso e controle

Variáveis / Categorias	Caso		Controle		
	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	
Alelo ApoE E2	Sim	5	21	3	53
	Não	5	17	9	35
E3	Sim	9	24	11	69
	Não	1	14	1	19
E4	Sim	4	23	3	27
	Não	6	15	9	61

Tabela 15. Distribuição dos Genótipos de ERS1 e PON1 entre os sexos nos grupos caso e controle

Variáveis / Categorias	Caso		Controle		
	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	
Gene ERS1 / PVU PP	Sim	1	1	7	9
	Não	9	36	5	80
Pp	Sim	9	20	5	63
	Não	1	17	7	26
pp	Sim	0	16	0	17
	Não	10	21	12	72
Gene ERS1/ Xball XX	Sim	0	4	2	8
	Não	10	33	10	81
Xx	Sim	6	24	9	42
	Não	4	13	3	47
xx	Sim	4	9	1	39
	Não	6	28	11	50
Gene PON1 / rs622 AA1	Sim	3	21	4	13
	Não	4	17	11	40
AG1	Sim	2	11	12	15
	Não	5	27	3	38
GG1	Sim	1	5	2	15
	Não	6	33	13	38

Gene PON1 rs7053379	AA2	Sim	2	9	5	9
		Não	5	29	10	44
	AG2	Sim	1	8	3	23
		Não	6	30	12	30
	GG2	Sim	3	18	7	8
		Não	4	20	8	45

Foi observada a maior prevalência dos alelos balizadores do estudo E3 e E4 no grupo caso, para o sexo feminino, E3 para o sexo masculino. Já para os polimorfismos, o padrão heterozigoto em ambos os gêneros foi visto na avaliação para receptores de estrogênio (Pp e Xx). Quando analisados os polimorfismos no grupo caso, para o gene PON 1 *rs622* a forma mais prevalente foi a selvagem (AA) em ambos os gêneros e no polimorfismo *rs705379* a presença do polimorfismo homozigoto mutado (GG) também para ambos os sexos, não apresentando padronagem diferente entre gêneros.

Já no grupo controle a prevalência dos polimorfismos E2/E3 para o sexo feminino, E3 para o masculino. O padrão heterozigoto para receptores de estrogênio para o sexo feminino (Pp/ Xx), homozigoto no caso da PvuII (PP) e heterozigoto no caso de XbaI (Xx) para o sexo masculino. Em relação à PON 1 *rs622* a forma mais prevalente foi a heterozigoto (AG) e homozigoto mutado (GG) para o sexo feminino, enquanto para o masculino prevaleceu a forma heterozigoto (AG). Já no polimorfismo *rs705379* a presença mais prevalente foi do polimorfismo heterozigoto (AG) para o sexo feminino e homozigoto mutado (GG) para o sexo masculino.

6.9 Prevalência dos Alelos balizadores de ApoE e genótipos ERS1 e PON1 nos diferentes graus de evolução da doença segundo a CDR.

A fim de saber se haveria diferença de prevalência, quando levado em consideração o grau de acometimento da doença, a tabela 16 apresenta as frequências e percentagens presentes em cada grau de evolução da doença, indicado pela variável CDR para os alelos de ApoE e genótipos para ERS1 e PON1.

Tabela 16. Frequências e porcentagens presentes em cada grau de evolução da doença, indicado pela variável CDR.

Variável / Categorias	CDR						
	1		2		3		
	N	N%	N	N%	N	N%	
Alelo ApoE	E2 Sim	19	59,4%	6	50,0%	1	25,0%
	E2 Não	13	40,6%	6	50,0%	3	75,0%
Gene ERS1 PVU	E3 Sim	20	62,5%	9	75,0%	4	100,0%
	E3 Não	12	37,5%	3	25,0%	0	0,0%
Gene ERS1 Xball	E4 Sim	18	56,3%	6	50,0%	3	75,0%
	E4 Não	14	43,8%	6	50,0%	1	25,0%
Gene PON1 rs622	PP Sim	1	3,2%	1	8,3%	0	0,0%
	PP Não	30	96,8%	11	91,7%	4	100,0%
Gene PON1 rs705379	Pp Sim	21	67,7%	7	58,3%	1	25,0%
	Pp Não	10	32,3%	5	41,7%	3	75,0%
Gene PON1 rs622	XX Não	22	71,0%	8	66,7%	1	25,0%
	XX Sim	4	12,9%	0	0,0%	0	0,0%
Gene PON1 rs622	Xx Não	27	87,1%	12	100,0%	4	100,0%
	Xx Sim	19	61,3%	9	75,0%	2	50,0%
Gene PON1 rs622	xx Não	12	38,7%	3	25,0%	2	50,0%
	xx Sim	8	25,8%	3	25,0%	2	50,0%
Gene PON1 rs622	AA1 Sim	18	56,3%	4	44,4%	2	50,0%
	AA1 Não	14	43,8%	5	55,6%	2	50,0%
Gene PON1 rs622	AG1 Sim	9	28,1%	2	22,2%	2	50,0%
	AG1 Não	23	71,9%	7	77,8%	2	50,0%
Gene PON1 rs622	GG1 Sim	4	12,5%	2	22,2%	0	0,0%
	GG1 Não	28	87,5%	7	77,8%	4	100,0%
Gene PON1 rs705379	AA2 Sim	8	25,0%	3	33,3%	0	0,0%
	AA2 Não	24	75,0%	6	66,7%	4	100,0%
Gene PON1 rs705379	AG2 Sim	7	21,9%	1	11,1%	1	25,0%
	AG2 Não	25	78,1%	8	88,9%	3	75,0%
Gene PON1 rs705379	GG2 Sim	16	50,0%	2	22,2%	3	75,0%
	GG2 Não	16	50,0%	7	77,8%	1	25,0%

Os resultados não apresentam nenhum padrão, entretanto, pode-se destacar as variáveis PP, XX e GG1, que apresentam altos índices de ausência dos genes em todos os graus. Quando avaliado a prevalência, o alelo E2, genótipos PP/Pp/pp, XX/Xx/xx, todas as formas de polimorfismos para *rs622* e o homocigoto mutado (GG) para *rs705379* aparecem no grau mais leve da doença, enquanto E3/E4 e AG para *rs705379* encontram-se mais prevalentes no grau mais elevado

da doença.

6.10 Associação da presença dos Alelos balizadores de ApoE e genótipos ERS1 e PON1 com a presença de alteração cognitiva.

A Tabela 17 apresenta os resultados dos testes que visaram verificar se existia alguma associação entre o fato do paciente apresentar os determinados genes, e se encontrar no grupo caso.

Tabela 17: Teste de associação entre os genes e os grupos

Variáveis / Categorias	CASO		CONTROLE		valor-p	
	N	N%	N	N%		
Alelos ApoE E2	Sim	26	54,2%	56	56,0%	0,834
	Não	22	45,8%	44	44,0%	
E3	Sim	33	68,8%	80	80,0%	0,132
	Não	15	31,3%	20	20,0%	
E4	Sim	27	56,3%	30	30,0%	0,002*
	Não	21	43,8%	70	70,0%	
Gene ERS1 PVU PP	Sim	2	4,3%	16	15,8%	0,045*
	Não	45	95,7%	85	84,2%	
Pp	Sim	29	61,7%	68	67,3%	0,503
	Não	18	38,3%	33	32,7%	
pp	Sim	16	34,0%	17	16,8%	0,019*
	Não	31	66,0%	84	83,2%	
Gene ERS1 Xball XX	Sim	4	8,5%	10	9,9%	0,99
	Não	43	91,5%	91	90,1%	
Xx	Sim	30	63,8%	51	50,5%	0,129
	Não	17	36,2%	50	49,5%	
xx	Sim	13	27,7%	40	39,6%	0,158
	Não	34	72,3%	61	60,4%	
Gene PON1 rs622 AA1	Sim	24	53,3%	17	25,0%	0,002*
	Não	21	46,7%	51	75,0%	
AG1	Sim	13	28,9%	27	39,7%	0,239
	Não	32	71,1%	41	60,3%	
GG1	Sim	6	13,3%	17	25,0%	0,132
	Não	39	86,7%	51	75,0%	
AA2	Sim	11	24,4%	14	20,6%	0,629
	Não	34	75,6%	54	79,4%	
Gene PON1 rs705379 AG2	Sim	9	20,0%	26	38,2%	0,042*
	Não	36	80,0%	42	61,8%	
GG2	Sim	21	46,7%	15	22,1%	0,006*
	Não	24	53,3%	53	77,9%	

m

Os genes **E4**, **PP**, **pp**, **AA1**, **AG2** e **GG2** exibiram uma associação significativa com os grupos, baseado . Sendo E4, pp, AA1 e GG2 apresentando associação com o grupo caso e PP e AG2 com o grupo controle.

6.11 Associação da presença dos Alelos balizadores de ApoE e genótipos ERS1 e PON1 com a presença de alteração cognitiva, segundo gênero e apresentação da razão de chances.

Os resultados da tabela 18 reforçam a associação entre a presença dos genes e os grupos caso e controle, entretanto, desta vez, os dados foram separados por sexo masculino e feminino, e as razões de chances foram calculadas.

Tabela 18: Teste de associação entre os genes e os grupos, separados pela variável Sexo.

Variável / Categoria	Feminino		valor-p	Razão de chances	Masculino		valor-p	Razão de chances	
	CASO	CONTROLE			CASO	CONTROLE			
Alelo ApoE	E2	Sim	21	0,694	0,816	5	3	0,378	3
		Não	17			5	9		
	E3	Sim	24	0,082	0,472	9	11	0,999	0,818
		Não	14			1	1		
E4	Sim	23	0,003*	3,464	4	3	0,652	2	
	Não	15			6	9			
Gene ERS1	PP	Sim	1	0,279	0,247	1	7	0,031*	0,079
		Não	36			80	9		
	Pp	Sim	20	0,098	0,486	9	5	0,031*	12,6
		Não	17			26	1		
pp	Sim	16	0,007*	3,227	0	0	-	-	
	Não	21			72	10			12
Gene ERS1 Xball	XX	Sim	4	0,746	1,227	0	2	0,481	-
		Não	33			81	10		
	Xx	Sim	24	0,081	2,066	6	9	0,652	0,5
		Não	13			47	4		
xx	Sim	9	0,046*	0,412	4	1	0,135	7,33	
	Não	28			50	6			11
Gene PON1 rs622	AA 1	Sim	21	0,004*	3,801	3	4	0,63	2,063
		Não	17			40	4		
	AG 1	Sim	11	0,999	1,032	2	12	0,052*	0,107
		Não	27			38	5		
GG 1	Sim	5	0,123	0,384	1	2	0,999	1,083	
	Não	33			38	6			13
Gene PON1 rs705379	AA 2	Sim	9	0,439	1,517	2	5	0,999	0,8
		Não	29			44	5		
	AG 2	Sim	8	0,043*	0,348	1	3	0,999	0,67
		Não	30			30	6		
GG 2	Sim	18	0,001*	5,063	3	7	0,999	0,857	
	Não	20			45	4			8

Novamente os valores destacados mostraram as diferenças estatísticas. Pode-se inferir que o paciente do sexo feminino que possui o gene E4, têm uma chance 3,46 vezes maior de ter a doença do que a paciente que não possui este gene. Da mesma forma, o paciente do sexo masculino, que possui o gene Pp têm uma chance 12,6 vezes maior de apresentar a doença do que a paciente que não apresenta este gene.

Avaliando toda a expressão gênica desta tabela, observa-se que a presença de E4, pp, AA1 e GG2 aumentam as chances de desenvolver um processo demencial em mulheres, já xx e AG2 parecem atuar como protetores. Quando observado a expressão dos polimorfismos no gênero masculino, a presença do polimorfismo de Pvull heterozigoto "Pp" aumenta muito as chances do desenvolvimento de um processo demencial e os polimorfismos que agem então como protetores seriam o homozigoto de Pvull "PP" e o heterozigoto AG1 do polimorfismo *rs622* do gene PON1.

6.12 Relação da presença dos Alelos balizadores de ApoE e genótipos ERS1 e PON1 com as variáveis contínuas AIVD, força de preensão e IMC.

Visando estudar a hipótese de uma relação dos achados genéticos com as variáveis contínuas importantes levantadas no exame físico dos pacientes e mostradas no primeiro capítulo desta tese, foram escolhidos três dados clínicos, representativos das teorias propostas que norteiam o diagnóstico de demência para testar a hipótese de uma ligação com a expressão gênica proposta neste capítulo.

A tabela 19 exhibe os resultados relacionados às variáveis contínuas ligadas a avaliação clínica mostrada no conjunto de dados do capítulo um. Neste caso, observou-se que existiam diferenças nessas variáveis entre os pacientes que possuíam os determinados genes e aqueles que não tinham. Os valores-p nas duas primeiras variáveis são oriundos do teste de Mann-Whitney, enquanto os demais do teste t. Nessa tabela também estão apresentados, as médias de cada categoria das variáveis e os valores-p, que indicam se a diferença entre estas é significativa estatisticamente, o parâmetro de obesidade IMC foi escolhido pela vasta discussão em âmbito científico, de sua influência na apresentação da doença.

Tabela 19: Testes de comparação entre grupos

Variável / Categoria	AIVD		Força de preensão D		Força de preensão E		IMC			
	Média	valor-p (MW)	Média	valor-p (MW)	Média	valor-p (T)	Média	valor-p (T)		
Alelo ApoE	E2	Sim	17,72	0,43	19,26	0,44	18,59	0,89	1,99	0,17
		Não	16,97		19,79		18,79		2,07	
	E3	Sim	17,39	0,51	20,08	0,05*	19,15	0,23	2,02	0,82
		Não	17,37		17,63		17,15		2,04	
	E4	Sim	16,42	0,01*	17,48	0,07	16,85	0,05*	2,06	0,38
		Não	17,99		20,76		19,83		2,01	
Gene ERS1 Pvu	PP	Sim	18,17	0,25	19,01	0,84	18,59	0,90	1,97	0,45
		Não	17,32		19,71		18,86		2,03	
	Pp	Sim	17,75	0,72	20,53	0,05*	19,75	0,07	2,04	0,40
		Não	16,80		17,90		17,06		1,99	
	pp	Sim	16,06	0,19	17,30	0,04*	16,23	0,05*	2,00	0,71
		Não	17,82		20,29		19,57		2,03	
Gene ERS1 XbaII	XX	Sim	19,50	0,13	18,50	0,72	18,61	0,92	1,77	0,01*
		Não	17,21		19,74		18,85		2,05	
	Xx	Sim	17,02	0,22	20,17	0,51	19,53	0,27	2,02	0,95
		Não	17,91		18,97		17,98		2,03	
	xx	Sim	17,49	0,72	19,09	0,65	17,82	0,28	2,09	0,08
		Não	17,39		19,92		19,39		1,99	
Gene PON 1 rs622	AA1	Sim	15,78	0,03*	18,08	0,49	17,14	0,48	1,94	0,18
		Não	17,38		19,56		18,46		2,04	
	AG1	Sim	17,18	0,49	20,12	0,36	18,73	0,53	2,05	0,33
		Não	16,59		18,42		17,57		1,98	
	GG1	Sim	17,39	0,33	19,87	0,54	18,55	0,75	2,05	0,43
		Não	16,64		18,81		17,83		1,99	
Gene PON1 rs705379	AA2	Sim	17,36	0,45	19,57	0,83	18,79	0,63	1,95	0,37
		Não	16,64		18,87		17,75		2,02	
	AG2	Sim	18,29	0,04*	19,27	0,82	17,80	0,89	2,04	0,40
		Não	16,13		18,92		18,06		1,98	
	GG2	Sim	14,72	<0,001*	17,45	0,26	16,02	0,13	2,02	0,73
		Não	17,77		19,76		18,89		2,00	

Foi observado então, que a presença dos polimorfismos E4, AA1, AG2 e GG2 apresentavam ligação com a perda de funcionalidade. Os polimorfismos nos genes E4, E3, Pp e pp apresentaram ligação com a perda de força observada na amostra e o único polimorfismo que apresentou ligação com IMC foi o XX.

6.13 Sinergias entre a presença dos alelos balizadores de ApoE e genótipos ERS1 e PON1 e a razão de chances de expressar demência.

Por fim, foi construído um modelo de regressão logística binária (tabela 19), cuja variável resposta ou dependente, é a variável **Grupo** (caso e controle). O objetivo é verificar se o fato do paciente possuir mais genes aumenta as chances de ele ter a doença. Além do modelo com todos os pacientes, outros 2 foram construídos, baseados nos pacientes de cada sexo, estes modelos foram construídos pelo departamento de estatística da UFES.

Tabela 19: Modelo de regressão binária para análise de interação entre genótipos

Modelo	B	Wald	valor-p	OR	IC 95% OR	
					LI	LS
Genes - geral	0,78	15,451	<0,001*	2,182	1,479	3,219
Genes - masculino	0,037	0,015	0,903	1,038	0,569	1,892
Genes - feminino	1,102	17,890	<0,001*	3,010	1,809	5,010

***LS:** Limite inferior do interval de confiança, **LI:** Limite inferior do interval de confiança.

No modelo geral, observou-se que para cada gene adicional, o paciente tem uma chance 2,182 vezes maior de possuir a doença. No modelo com os pacientes do sexo masculino não foi observada significância, enquanto no caso feminino, constatou-se que para cada gene adicional, o paciente tem uma chance 3,010 vezes maior de possuir a doença, sugerindo deste modo o gênero feminino ser um fator de risco genético.

7. DISCUSSÃO

7.1. Caracterização demográfica e clinica da amostra

O crescimento da população idosa é um fenômeno mundial. Desse modo, a identificação de indivíduos com potencial risco de desenvolver demência torna-se fundamental.

No presente estudo, a população apresentou uma mediana de idade de 79 anos para mulheres e 78 anos para homens, tratando assim de uma população homogênea neste quesito. Segundo Custodio *et al* (2017), o aumento da população dos idosos de 80 anos ou mais, também conhecido como "velho mais velho" ou "muito idoso", será ainda mais pronunciado, passando de 1,7% da população para

4,5% no mesmo período. Segundo Bongaarts (2009), em comparação com os países europeus e norte-americanos, a América Latina está percorrendo esta mudança sem precedentes ante uma taxa significativamente mais rápida. Estudos revelam que a prevalência de demência aumenta com o tempo, duplicando todos os cinco anos de idade até a idade de 65 anos. Ele cresce de 2,40% (IC 95%) no grupo 60-64 a 33,07% (CI 95%) no grupo 90-94 (NITRINI *et al.*, 2009), tais informes corroboram com os encontrados em nosso estudo.

Quanto à incidência segundo gênero, obteve-se maior parcela da população de mulheres em ambos os grupos sendo o grupo caso composto por 84,9% de mulheres e 15,1% de homens. Estudos realizados na América Latina mostraram taxas ligeiramente mais altas para participantes do sexo feminino, em todas as faixas etárias (NITRINI *et al.*, 2004). Taxas semelhantes foram relatadas em estudos realizados na Europa (LOBO *et al.*, 2000, WINBLAD *et al.*, 2016), Los Angeles, Índia e China (PRINCE *et al.*, 2013), também corroborando com os dados apresentados neste estudo.

Em relação à raça mais acometida, temos a raça branca com 45,2% da população do grupo caso e não há amparo literário que explique a interação entre raça e a prevalência de demência.

Se tratando do nível de escolaridade dos indivíduos, a população com ensino fundamental ou fundamental incompleto apresentou maior déficit cognitivo, totalizando 71,2% da amostra. Segundo Custodio *et al.* (2017), um relacionamento inverso demonstrou existir entre nível educacional e demência. A prevalência de demência em Lima atingiu 3,7% de indivíduos com mais de 8 anos de escolaridade e 15,2% de analfabetos (CUSTODIO *et al.*, 2008). Através de uma análise univariada, o estudo realizado em Catanduva/Brasil, também revelou maior incidência de demência entre os analfabetos (NITRINI *et al.*, 2004). No Chile, dois estudos relataram maior prevalência de comprometimento cognitivo e demência em contextos rurais e em pessoas com baixos níveis educacionais: o comprometimento cognitivo foi 5,6 vezes maior entre adultos com baixos níveis educacionais (17,2%) em comparação com aqueles com níveis educacionais elevados (GONZÁLEZ *et al.*, 2009; ENS, 2010; FUENTES E ALBALA, 2014). Pode-se verificar que tais populações demonstraram características semelhantes com as encontradas na população do presente estudo, sugerindo a adequação da população representativa para a América Latina.

Dentre as condições crônico-degenerativas que afligem idosos, destacam-

se a hipertensão arterial, o diabetes mellitus, a osteoporose, a aterosclerose e as demências. A hipertensão Arterial é uma doença extremamente prevalente na terceira idade. Segundo Vasan *et al.* (2001), a pressão arterial aumenta linearmente com a idade. Em indivíduos jovens, a hipertensão decorre mais freqüentemente apenas da elevação na pressão diastólica, enquanto a partir da sexta década o principal componente é a elevação da pressão sistólica (FRANKLIN *et al* 2005). Em indivíduos idosos da cidade de Bambuí/MG, 61,5% apresentavam hipertensão arterial (FIRMO *et al.*, 2003). É sabido a que as doenças cerebrovasculares apresentam relação com o processo demencial. Existem estudos que sugerem esta ligação, no entanto, não há bases literárias sólidas que esclareçam a ligação direta entre a hipertensão arterial e a DA. Nossos resultados mostraram uma larga incidência da demencia, sendo que 78,1% do grupo caso apresentavam hipertensão arterial.

Segundo Havlik *et al.* (2002), indivíduos hipertensos apresentam pior desempenho em testes neuropsicológicos. Estudos mais recentes sugerem que os indivíduos hipertensos têm maior chance de ocorrência de demência e deficiência física do que os indivíduos normotensos (JOHNSON *et al.*, 2008; ELIAS *et al.*, 2012; FARACO e IADECOLA, 2013). As funções cognitivas, especialmente as funções executivas (CHAND; DHAMALA, 2016b), são amplamente relatadas como prejudicadas em indivíduos hipertensos (VICARIO *et al.*, 2005; GORELICK e NYENHUIS, 2012; HAJJAR *et al.*, 2016). Os indivíduos com hipertensão têm maior chance de ocorrer disfunção executiva antes dos indivíduos com normotensão, o que indica uma potencial associação vascular cognitiva (OVEISGHARNA e HACHINSK, 2010). No entanto, existem estudos de neuroimagem muito limitados que investigaram as bases neurais da hipertensão no declínio cognitivo (LI *et al.*, 2015). Apesar de vários estudos relatarem a alta prevalência das duas enfermidades, ainda há necessidade de maior embasamento literário que reuna informações sobre a interrelação fisiopatológica destas doenças.

O que chamou mais atenção, foi a prevalência de dislipidemia nesta população aonde 69,9% dos indivíduos do grupo caso apresentaram esta disfunção, sugerindo sua ligação com a perda cognitiva. A dislipidemia pode ser o resultado de fatores genéticos e de dieta, e vários subgrupos lipídicos, incluindo ácidos graxos (saturados ou insaturados), triglicerídeos, colesterol e fosfolípidos, são alterados na DA. (SRIDHAR *et al.*,2015; WANAMAKER *et al.*, 2015; MOON *et al.*, 2016). A hipertrigliceridemia é a principal dislipidemia ligada a síndrome

metabólica, uma síndrome que também inclui obesidade e resistência à insulina. Na verdade, estudos que investigam o papel dos lipídios no cérebro revelaram metabolismo lipídico anormal como um processo fisiopatológico importante no desenvolvimento de DA (CREEGAN *et al.*, 2015; FOLEY *et al.*, 2016). As dietas que consistem em um aumento do consumo de gorduras saturadas e trans envolvem uma maior incidência de DA, enquanto as dietas ricas em gorduras saudáveis são protetoras (HANSON *et al.*, 2015; LUCHSINGER *et al.*, 2004). O excesso de ingestão de gordura saturada aumenta os lipídios circulantes, incluindo FFAs e citocinas inflamatórias e requer uma redistribuição do teor de lipídios nas células.

O aumento dos níveis de lipídios pode afetar importantes funções celulares envolvidas em DA, incluindo flexibilidade da membrana celular, potencial de redução-oxidação e agregação de A β (LIM *et al.*, 2014). O metabolismo lipídico está intimamente associado ao processamento da APP, o que resulta em aumento da produção de A β (DI PAOLO, 2011). Isso sugere que a dislipidemia possa ser um fator de risco de estrema ligação com processo demencial, implicando em seu diagnóstico.

7.2 Correlação entre Variáveis Clínicas, Déficit Cognitivo e Funcionalidade

Em um primeiro momento, avaliamos se haveria correlação entre variáveis ligadas a índices preditivos de obesidade com o déficit cognitivo. Visto que 98,1% da população desse estudo fazia prática de alguma atividade física, também foi avaliada a relação com a independência funcional, que afeta substancialmente a qualidade de vida de idosos portadores de alguma demência.

Neste conjunto de dados, foi possível apontar uma fraca correlação entre a funcionalidade dos indivíduos do grupo controle com a medida de percentual de gordura excedente e peso excedente. Não apresentando relação estatisticamente significativa quanto a estes fatores e a perda cognitiva. Porém, segundo Gunstad *et al.* (2010), crescem as evidências de que a obesidade é fator de risco independente para disfunção cognitiva, com prejuízo principalmente da função executiva, o que impactaria a independência funcional que mostrou correlação.

O impacto negativo do excesso de peso e de gordura corporal sobre a função cognitiva já foi observado em crianças, adultos, jovens e idosos (LI, 2008). Após os 85 anos, a relação se inverte e, quanto menor o peso, maior o comprometimento cognitivo (BOEKA, 2008). Este dado corrobora com o

apresentado neste estudo, onde os dados mostram a existência de correlação fraca para os indivíduos portadores de déficit cognitivo, relacionado ao índice de massa corpórea e moderada para a relação cintura quadril. Esse resultado sugere que o risco cardiovascular e obesidade podem ser fatores de risco para incapacidade funcional, para o desenvolvimento de transtornos cognitivos e possível evolução para uma demência.

Desta forma pode se ter como proposta que durante a avaliação para delimitar um processo diagnóstico de demência, se deve ter atenção aos distúrbios metabólicos relacionados à obesidade. Várias revisões sistemáticas e meta-análises foram publicadas em estudos epidemiológicos que exploraram as relações de IMC padrão, de baixo peso, sobrepeso, e obesidade na meia idade com risco de demência na idade avançada (ANSTEY *et al.*, 2011; BEYDOUN *et al.*, 2008; EMMERZAAL *et al.*, 2015; GOROSPE *et al.*, 2007; PEDDITIZI *et al.*, 2016). No entanto, a evidência está se expandindo rapidamente e tornou-se altamente conflitante. Alguns autores consideram a associação entre o IMC da meia idade e o risco de demência como positiva (ROSENGREN *et al.*, 2005; WHITMER *et al.*, 2005), nula (GUSTAFSON *et al.*, 2009; ALBANESE *et al.*, 2015; KIVIPELTO *et al.*, 2005) e inversa (QIZILBACH *et al.*, 2015). Tal heterogeneidade pode ser explicada pelo projeto do estudo e os se os métodos dos estudos primários tiverem sido introduzidos tendências e erros. Por outro lado, a relação cintura quadril é um forte marcador preditivo para doença cardiovascular. Acredita-se que tal correlação tenha relação direta entre o risco cardiovascular como fator de risco para a DA e outras demência.

A doença cardiovascular da meia idade (DCV) e os fatores de risco vascular foi associada consistentemente com um risco aumentado de comprometimento cognitivo e demência (NORTON *et al.*, 2014; SNYDER *et al.*, 2015). Os mecanismos subjacentes que explicam como as DCVs e seus fatores de risco afetam negativamente a função cognitiva são complexos, permanecem incertos e provavelmente variam dependendo do tipo, idade do início, duração e gravidade da doença e fatores de risco ocorrendo concomitante, como baixa escolaridade e doença comorbidade relacionada, este dado também corrobora como que encontramos em nossa população. Além dos processos neurovasculares e de processos neuropatológicos, pensa-se que outras vias biológicas estão envolvidas, tais como o óxido nítrico (NO), processo inflamatório (por exemplo, interleucina-6) e vias de estresse oxidativo, estas duas ultimas intimamente envolvidas nas

descrições fisiopatológicas da DA. Cada um desses processos e a via NO foram implicados na fisiopatologia da DCV, fatores de risco vascular, doença cerebrovascular (por exemplo, AVC), comprometimento cognitivo e demência (PRESSLER *et al.*, 2010).

Analisando o outro grupo de dados, que se refere à perimétrica dos indivíduos, foi observado que no grupo controle houve correlação fraca relacionada à avaliação cognitiva apenas para as medidas de tórax. Porém, no grupo caso houve correlação fraca para as medidas de tórax, abdômen, quadril e panturrilhas e moderada para a medida de coxa, ambas relacionadas à avaliação cognitiva, sendo estas diretamente proporcionais, sugerindo que a perda de massa muscular teria relação com o déficit cognitivo apresentado neste grupo.

Já avaliando as mesmas variáveis, ainda para o grupo caso, a correlação entre a perda de massa dos membros inferiores é inversamente proporcional ao estadiamento da doença, sugerindo que a perda acontece cada vez mais nos estágios avançados da doença. Sendo assim, tal perda pode ser considerada um marcador pré-clínico para demência. Isso é afirmado no estudo de Johnson *et al.* (2006), que sugeriu que as alterações relacionadas à DA na composição corporal podem estar predominantemente relacionadas à perda de massa magra (isto é, sarcopenia).

Embora o projeto transversal do estudo caso-controle limite nossa capacidade de inferir relações causais, nossos dados sugerem que a sarcopenia pode ser acelerada nos primeiros estágios da demência, estágio este que se encontra a maior parte da população caso do presente estudo.

Quando analisado os dados, referindo-se a capacidade funcional, temos correlação fraca inversamente proporcional, para o grupo controle, em braço direito e esquerdo, e, diretamente proporcional em membros inferiores, sugerindo que há perda funcional independente do processo doença. Porém a correlação passa a moderada quando relacionada no grupo caso, mostrando assim que os indivíduos com perda cognitiva apresentam maior grau de dependência relacionado ao controle. Segundo Reis *et al.* (2015), o declínio da capacidade funcional do idoso está relacionado com o próprio processo de envelhecimento, que tem relação com o comprometimento das funções gerais e o surgimento de patologias que afetam a funcionalidade como as demências, contribuindo para a dependência funcional, que significa restrição ou ajuda na participação das atividades do dia a dia. A questão da perda de massa

em membros inferiores é bastante relevante quanto a perda de capacidade de marcha e risco e quedas, atividade essencial para manutenção da independência para as AIVDs. Em estudo prospectivo, Yves *et al.* (2013) mostrou uma alta taxa de declínio na capacidade de caminhar em uma população com DA em ILPI. Nessa população, relatou uma incidência anual de 12,76% de diminuição da capacidade de caminhada. Após quatro anos, aproximadamente um terço (30,20%) da população restante precisava de assistência ou havia perdido a habilidade de caminhar. Esse dado pode ser comparado a população aqui estudada, onde foi observado uma alta incidência do grupo caso em ILPI. A capacidade de caminhar tem sido relatada como um fator importante que afeta a qualidade de vida em pacientes com demência (ANDERSEN *et al.*, 2004). Nossos resultados junto às bases literárias sugerem que a avaliação da capacidade funcional deva ser parte do desenvolvimento do processo de diagnóstico e prognóstico para demência.

Na análise das relações com a força muscular, ainda temos a presença de correlação fraca, diretamente proporcional, ou seja, quanto maior o score cognitivo melhor o resultado do teste para força de preensão manual direita e esquerda no grupo controle e também representado da mesma forma quando relacionado com a funcionalidade. Observou-se a presença de correlação moderada para o grupo caso também nos dois quesitos e fraca, porém presente, para o estadiamento de forma inversamente proporcional, assim quanto maior o estágio pior estará à força muscular. Segundo Wang *et al.* (2006), a força muscular foi associada à taxa de declínio cognitivo, de modo que as pessoas com maior força exibiram uma taxa de declínio consideravelmente mais lenta. Em outra análise (BUCHAMAN *et al.*, 2007) que exclui a demência das pessoas ou comprometimento cognitivo leve, a força muscular foi associada ao risco de desenvolver transtorno cognitivo leve, a primeira manifestação de comprometimento cognitivo. No geral, esses dados mostram que uma maior força muscular está associada a um risco diminuído de desenvolver DA.

7.3 Análise do Colesterol Total e Triglicérides

Nesta fase, analisamos as variáveis sobre sua relação direta com a presença ou não do deficit cognitivo e a diferença de gêneros. Neste momento não encontramos diferença estatística em ambos os grupos ou por gênero mais foi observada o aumento para as mulheres tanto no grupo caso como controle em relação ao sexo oposto.

Segundo Mitisuru *et al.* (2014), o aumento dos níveis de colesterol estão relacionados a um alto risco de comprometimento cognitivo e demência. O aumento do número de revisões indica que existe uma conexão entre o nível de colesterol sérico e o risco de DA e estudos pré-clínicos indicam o envolvimento do colesterol na produção de proteína amilóide-beta (PREGELG, 2008). O aumento do nível de lipídios pode afetar importantes funções celulares envolvidas no DA, incluindo a flexibilidade da membrana celular, o potencial de redução-oxidação e a agregação de A β (LIM *et al.*, 2014). Em nossa amostra, vimos que há presença de hipercolesterolemia em ambos os grupos e gêneros. As dietas que consistem em um aumento do consumo de gorduras saturadas e trans envolvem uma maior incidência de DA, enquanto as dietas ricas em gorduras saudáveis são protetoras (CREEGAN *et al.*, 2015).

Com relação ao triglicerídeo, houve diferença entre homens e mulheres, onde as mulheres apresentam os triglicerídeos mais elevados. Estudo mostrou que os níveis de triglicerídeos encontram-se inversamente correlacionados com a função executiva em idosos não portadores de demência, mas não afetam a memória, após o controle de idade, educação, gênero, colesterol total, LDL, estado ApoE4, CDR (PARTHASARATHY *et al.*, 2017). Em outro estudo mostrou que no soro de pacientes com DA, a lipoproteína de alta densidade, a atividade da fosfatase alcalina e os níveis de bilirrubina foram menores, enquanto os níveis de lipoproteína de baixa densidade, colesterol total e triglicerídeo foram maiores, sustentando sua interação com a patogênese da doença (VASANTHAREKHA *et al.*, 2016). A diferença nos valores de triglicérides entre gêneros, mostrada no nosso estudo, nos remete a sugerir alguma interação com a questão da redução da neuroproteção exercida pelo processo menopausal. Esse dado corrobora com o estudo de Li *et al.* (2014).

7.4 Análise da Função Cognitiva e Nível de Independência Funcional

Quando observamos a questão da função cognitiva e nível de independência funcional, encontramos em ambos os grupos diferenças reais. Quanto à análise de funcionalidade, onde os idosos do grupo caso são mais dependentes que os encontrados em controle. Os encontrados no grupo controle são considerados independentes mesmo quando apresenta mais baixo escore, este ainda não compromete sua avaliação. (menor score encontrado foi 18 pontos). Os indivíduos do grupo caso apresentam o mesmo comportamento, onde sua atividade funcional sugere ter uma relação diretamente proporcional a seu nível cognitivo

(dependência parcial ou total foi encontrada com scores menores que 15) e quando comparamos os generos para o grupo caso as mulheres do grupo caso são mais comprometidas.

A questão do maior comprometimento cognitivo das mulheres era esperada diante da vasta gama de referências literárias que apoiam a questão da prevalência maior em mulheres (HERRERA *et al.*, 2002; NITRINI *et al.*, 2004; PRINCE *et al.*, 2013, CUSTODIO *et al.*,2017) e a explicação da falta dos efeitos neuroprotetores dos hormônios sexuais (LI *et al.*,2014), que também podem ser esperados pelo polimorfismo dos receptores de estrogênio α em sinergia com o polimorfismo do gene ApoE (THORTON *et al.*,2010), também amparados neste estudo.

Ainda é possível considerar a questão da localização de onde vem uma considerável parte das amostras do grupo caso que se encontram institucionalizados. A questão da institucionalização de idosos se dá pela real dificuldade da família em manter o cuidado domiciliar deste indivíduo, que por muitas vezes apresenta um quadro de fragilidade muito alta na admissão em uma ILPI. Como mostrado em estudo por um déficit de memória e outras funções cognitivas, DA implica o agravamento da incapacidade funcional dos pacientes, tornando-os progressivamente incapazes de realizar atividades diárias, começando a depender de cuidadores (LUZARDO *et al.*,2004). Um estudo com 189 participantes mostrou que o declínio funcional pré-admissão que foram admitidos na Unidade de Cuidados Agudos para Anciões de um hospital acadêmico suíço e com idade igual ou superior a 65 anos onde o desempenho nas atividades básicas da vida diária em casa (autorelatado), na admissão hospitalar e na alta foi observado, em geral ocorreu em 56,1%, 17,5% e 43,4% dos participantes, respectivamente. Em contraste, a melhoria funcional intra-instituição ocorreu em 40,2% dos participantes. Não foram identificados preditores de declínio pré-admissão, enquanto o desempenho pré-admissão nas atividades instrumentais da vida diária foi associado ao declínio na instituição de cuidados (D`ONOFRIO *et al.*,2017) que demonstrou a relação intrínseca da institucionalização com a perda funcional.

Assim, a capacidade funcional tem sido um dos principais componentes de saúde de idosos e é considerada fundamental na avaliação da saúde da população, principalmente para pacientes com doenças incapacitantes como DA. Estudos têm demonstrado que as alterações de desempenho nas Atividades de Vida Diária podem ocorrer tão cedo quanto nas fases iniciais da doença (TALMELI

et al, 2010). Deste modo, os dados apresentados sugerem que há íntima relação da incapacidade funcional com o desenvolvimento do processo demencial.

7.5 Análise da Força Muscular por Preensão Manual

Na comparação entre idosos do mesmo grupo, observa-se que há presença de diferença estatisticamente significativa entre homens do grupo controle e mulheres do grupo caso, sendo que em ambos há maior perda de força esra presente nas mulheres especialmente as do grupo caso, o que já foi discutido em relação à fragilidade encontrada nestes indivíduos e pior resultado cognitivo. Este dado reforça o declínio generalizado da capacidade funcional.

Em um estudo feito pelo Rush Memory and Aging Project em 900 idosos, entre homens e mulheres, com mediana de idade de 75 anos (BOYLE *et al*,2009), a força muscular variou de -1,6 a 3,3 (média = 0,006, DP = 0,66), com maiores escores que refletem maior força. A força muscular foi negativamente associada à idade ($r = -0,35$, $p < 0,001$) e positivamente associada à cognição global ($r = 0,20$, $p < 0,001$). Estes dados corroboram com o nosso estudo, visto que a mediana de idade e a intervenção em ambos os sexos foi parecida. Embora a característica clínica da DA seja declínio cognitivo, os sinais motores que freqüentemente acompanham DA freqüentemente precedem e prevêm o diagnóstico clínico de DA (SCARMEAS *et al.*, 2005; ABBOTE *et al.*, 2004; KNOPMAN *et al.*, 2007). Segundo Wang *et al.* (2006), a perda de força muscular e massa também são comuns no envelhecimento e a fragilidade e o IMC estão associados ao risco de DA. Embora as medidas da fragilidade e do IMC possam ser obtidas de forma econômica, elas não informam sobre o papel da massa muscular versus a força com o risco de DA, e dados recentes sugerem que a força muscular está associada à cognição independente da massa muscular (GUSTAFSON *et al.*, 2003)

Até então, os dados sobre a força muscular e DA ainda são limitados. Um estudo mexicano relatou que a força de aderência era preditiva do declínio cognitivo em mexicano-americanos idosos (ALFARO *et al.*,2006). Em outra coorte do clero católico, foi relatado que a força de aderência estava associada ao incidente DA (BUCHMAN *et al.*,2005)

Os resultados sugerem a ligação direta entre as variáveis força e cognição e a predileção feminina, vista também na comparação entre os grupos caso baseado no gênero, para perda nas três variáveis chave (Independência funcional, cognição e

estadiamento). Sendo uma avaliação sugerida, para integrar o protocolo diagnóstico das demências não se restringindo a DA pela dificuldade de certeza diagnóstica.

7.6 Análise de Parâmetros Ligados a Obesidade

Na análise do IMC os resultados não foram significativamente representativos para as variações entre grupos, apesar de uma tendência feminina de aumento no grupo caso ter sido encontrada. A questão da não apresentação de dados com significância estatística vai de encontro à literatura que afirma relação entre o IMC e o deficit cognitivo (WANG *et al.*,2006; GUSTAFSON *et al.*, 2003; ALBANEZE *et al.*, 2017). A relação entre peso ou IMC e DA tem sido amplamente investigada. De acordo com estudos anteriores, a associação entre o IMC e o risco de desenvolvimento futuro da DA parece depender do ponto de tempo da avaliação do IMC. Embora o IMC mais alto na meia-idade tenha demonstrado ser um fator de risco para o desenvolvimento futuro da DA, o IMC mais alto no final da vida está associado a um risco reduzido (GARCIA *et al.*, 2014, CHUNG *et al.*, 2015). Em contrapartida a perda de peso acelerada na vida adulta foi associada com um risco aumentado de DA (BUCHMAN *et al.*, 2005, HUGHES *et al.*,2009). Este dado corrobora com os apresentados neste estudo, porque apesar de não haver diferença significativa para a maioria das comparações, inclusive para IMC, quando comparamos os grupos caso controle, as mulheres do grupo caso apresentam diferença estatística na análise do peso gordo, sendo o peso menor no grupo caso e na comparação do grupo caso entre si encontramos diferença significativa para as mulheres em relação aos homens em todos os parâmetros avaliados, visto que houve perda de peso e percentual de gordura em indivíduos do grupo caso, principalmente em mulheres que demonstraram pior condição cognitiva.

Até agora, ainda não está claro em que momento o IMC diminui durante o estágio pré-clínico da demência. A partir desses estudos, sugeriu-se que as alterações do IMC podem refletir uma resposta sistêmica à neuropatologia relacionada à DA. Além disso, algumas revisões sugerem que a perda leve de peso nos idosos pode ser um efeito adjuvante de processos de envelhecimento normal associados a exigências metabólicas reduzidas, apetição e diminuição da estatura física e altura (MORLEY *et al.*,2003, DONINI *et al.*,2003). Portanto, ainda não está claro até que ponto as alterações de IMC em DA pode ser atribuído a comorbidades vasculares e metabólicas freqüentemente presentes em populações idosas no que diz respeito a DA “pura”.

7.7 Modelo de regressão logística para os dados Clínicos

Neste resultado os indivíduos com 90 ou mais anos de idade possuem 15 vezes chances mais de apresentar a doença do que os que possuem até 69 anos, que neste caso é a categoria de referência. Os que possuem Dislipidemia possuem 3,166 vezes chances mais de ter a doença. Entretanto, aqueles que praticam atividade física possuem menor chance de apresentar as alterações cognitivas, quando comparado àqueles que não praticam.

Na literatura comparativa foi visto que há uma interrelação da presença de dislipidemia (PARTHASARATHY *et al.*, 2017, VASANTHAREKHA *et al.*, 2016) e a capacidade funcional era diretamente proporcional ao nível cognitivo do indivíduo (HERRERA *et al.*, 2002; NITRINI *et al.*, 2004; PRINCE *et al.*, 2013, CUSTODIO *et al.*, 2017).

Para a prospeção final, vamos entender a implicação deste dado na presença de polimorfismo dos genes estudados.

7.8 Análise da Variância Genotípica e a Interrelação com as Variáveis Clínicas

Nesta fase apresentamos a variância dos genes buscando a interação dos mesmos com o deficit cognitivo e as variáveis clínicas, AIVD, força de preensão e IMC.

7.8.1 Gene ApoE

Foi observada a maior prevalência dos polimorfismos no grupo caso, E3/E4 para o sexo feminino, E3 para o sexo masculino. O gene ApoE é o principal fator de risco genético para DA esporádica e tardia. Três grandes variantes de ApoE existem em seres humanos (ApoE2, ApoE3 e ApoE4), sendo o alelo ApoE4 fortemente associado a DA (BOSCO *et al.*, 2005; CREAN *et al.*, 2011; PANZA *et al.*, 1999). Sendo o sexo feminino o mais prevalente nesta população, os dados deste estudo corroboram com os achados literários já consolidados. Em relação à prevalência do alelo ApoE3 no sexo masculino, a isoforma que conta quase 80% dos alelos na população em geral, é considerada neutra (FRIEDEN & GARAI, 2012). A presença no gênero masculino, só foi vista para o alelo E3, isso nos remete a lembrar de que a variante E4 do gene ApoE é um fator de risco e não uma causa determinante para demência, também a população masculina foi menor que a feminina, este motivo pode sugerir que o “n” seja pouco representativo o que implica o não aparecimento do alelo E4 na amostragem masculina. Existem indivíduos que possuem os dois alelos de ApoE na forma E4 e não apresentam sinais de demência e também indivíduos que apresentam apenas

alelos E2 ou E3, mas encontram-se acometidos pela doença, desta forma justificaria a presença deste alelo na população do grupo caso, bem como a menor proporção do alelo E4 na população do grupo controle. (FRIDMAN *et al.*, 2004).

Apesar de algumas referências apontarem o papel neutro do alelo E3, estudos relacionados à idade de animais mostraram a presença de comprometimento cognitivo relacionado a este alelo em animais mais velhos (BIUNDO *et al.*, 2015). Isso sugere uma interdependência com a idade e tempo de aparecimento dos sinais da doença nos indivíduos. Este dado contribui com a conclusão deste estudo, inclusive quando comparado à expressão alelica com o nível de comprometimento cognitivo espesso nos resultados da CDR. O mesmo se dá na interligação do polimorfismo deste gene em sinergia com outros genes que potencializariam a prevalência da doença na população. Para tal estudamos mais dois genes a fim de fazer esta correlação.

No grupo controle encontramos a maior prevalência do alelo E2 entre homens e mulheres. O alelo ApoE2 mostrou ter efeitos protetores sobre DA (CORDER *et al.*, 1994; PANZA *et al.*, 2000; WEST, REBECK e HYMAN, 1994).

Outra referência encontrada foi a ligação do alelo E4 com uma população de idosos mais jovem (< 80 anos). No estudo de RODRIGUEZ *et al.* (2014), que levantou dados de prevalência de DA em 1000 idosos cubanos por ano, os idosos portadores maiores de 80 anos apresentam 42.1% (18.9-93.8) o alelo E4 e 53.3% (40.6-70.0) não apresentam o alelo. Este dado corrobora com nossa população que tem mediana de idade de mais de 74(65-95) anos, tanto em homens quanto mulheres e o alelo E4 foi prevalente apenas em mulheres. Segundo LIBRE *et al.* 2008, o alelo E4 é mais prevalente em mulheres que também corrobora com os dados aqui apresentados. Algumas evidências sugerem que o ApoE4 desempenha um papel através dos seus efeitos sobre a agregação de A β (BALES *et al.*, 2009; YOUMANS *et al.*, 2012) e a eliminação (BACHMEIER *et al.*, 2014; BELL *et al.*, 2007; CASTELLANO *et al.* , 2011). Também foi proposto que o ApoE4 possa interferir com o transporte de colesterol de astrocitos para compartimentos sinápticos, induzindo perda de sinapse e eventualmente neurodegeneração (PFRIEGER, 2003). Outros mecanismos potencialmente patogênicos propostos incluem efeitos diferenciais das isoformas de ApoE na fosforilação de tau, metabolismo da energia cerebral, neuroinflamação, função neurovascular, neurogênese e plasticidade sináptica (HUANG, 2011; KIM *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2014). Apesar dos amplos esforços de pesquisa, no entanto, o papel exato do

ApoE4 na etiologia da DA continua sem elucidação completa. Estudos em animais ainda estão tentando a busca por melhor explicação da interação E4 e a DA.

Foi visto no primeiro capítulo uma interligação da capacidade funcional dos idosos avaliados (AIVD) entre os grupos, onde se pode visualizar que a perda da capacidade funcional e força de preensão, estava ligada a evolução da perda cognitiva em uma relação diretamente proporcional. Quando levantada a hipótese de ligação de polimorfismos de ApoE com sinais clínicos da demência a importância de se identificar os determinantes genéticos de um envelhecimento livre de incapacidades pode ser resumida em três razões principais: 1) facilitar a identificação de fatores não genéticos responsáveis por variações inexplicadas no fenótipo; 2) descobrir novos sistemas biológicos e mecanismos envolvidos na determinação do envelhecimento bem sucedido; 3) identificar de genes relacionados a uma maior vulnerabilidade e oferecer a portadores desses genes intervenções biológicas, comportamentais e ambientais para tentar melhorar seu processo de envelhecimento (GLATT *et al.*, 2007), deste modo quando abordado a interrelação genética observou-se que a presença do alelo E4 também esta ligado a variável incapacidade funcional (AIVD). Mais recentemente, o gene da apolipoproteína E também tem sido considerado um gene de vulnerabilidade (GENDERS *et al.*, 2000; CHRISTENSEN *et al.*, 2006, e KULMINSK *et al.*, 2008) já que portadores de E4 também apresentam um pior prognóstico em várias outras condições clínicas (CHRISTENSEN *et al.*, 2006). Perda de força de preensão observada no grupo caso também corrobora com a hipótese genética postulada para a variância E4 como um biomarcador de vulnerabilidade para pessoas idosas.

É possível supor, diante do exposto, que indivíduos portadores de E4 tenderiam a acumular mais morbidades ao longo de sua vida e apresentariam um pior desempenho funcional em idades avançadas, incluindo a perda de força. Poucos estudos foram publicados comparando o genótipo da APOE e grau de incapacidade em idosos (ALBER *et al.*, 1995; BADER *et al.*, 1998; BLAZER *et al.*, 2001; MEIZER *et al.*, 2005; KULMINSK *et al.*, 2008; LAN *et al.*, 2009; VERGUESE *et al.*, 2013) e os resultados desses estudos ainda não permitem uma conclusão definitiva sobre a associação do alelo E4 com a incapacidade funcional e a perda cognitiva.

7.8.2 Gene ERS1 (ESR1 / PvuII e XbaI)

Já observamos que as demências são desordens multifatoriais poligênicas determinadas pela interação de fatores genéticos, metabólicos e ambientais. O

distúrbio hormonal associado à menopausa e pós-menopausa tem sido relacionada a distúrbios cognitivos e afetivos e ao risco aumentado para demência incluindo a DA.

Curiosamente, há tempos foi descrito que a distribuição regional dos receptores de estrogênio (ERs) dentro do cérebro é surpreendentemente semelhante à geografia da patologia do cérebro na doença de Alzheimer (MC EWEN *et al*, 1999, SHUGHRUE *et al.*, 1997). O estrogênio atua como um neuroprotetor reduzindo a toxicidade do glutamato e beta amiloide (A β), aumentando a plasticidade sináptica, regulando fatores neurotróficos, facilitando a transcrição e ativação do fator, reduzindo a inflamação no cérebro (CORREIA *et al.*, 2010 e POMPILE *et al.* 2012) e diminuindo a hiperfosforilação de TAU.

O complexo de estrogênio / ER torna-se, portanto, um candidato interessante para descobrir os antecedentes genéticos de DA, como também indicado pelo relacionamento entre estrogênios e ApoE.

Em uma revisão de literatura foi demonstrado que dois dos polimorfismos de um único nucleótido mais amplamente estudados em ESR1 - PvuII (T / C, rs223493) e XbaI (A / G, rs9340799) estando estes possivelmente associados à doença de Alzheimer.

A meta-análise de LUCKHAUS e SAND (2007), indicou que os polimorfismos ESR1 PvuII e XbaI foram confirmados como moduladores da suscetibilidade ao desenvolvimento de DA em indivíduos asiáticos, mas não nos europeus, porém quando o fenótipo foi estendido a outras formas de demência ou comprometimento cognitivo, a associação não foi mais observada.

Na amostragem descrita nesta tese, levantamos a incidência do polimorfismo para ESR1 - PvuII (T / C, rs223493) e XbaI (A / G, rs9340799). Para ambos os polimorfismos a população apresentou um padrão genotípico heterozigoto (Pp – Xx), sendo que na amostra do grupo caso, independente do sexo, observou-se 61,7% o genótipo Pp e 63,8% apresentaram genótipo Xx, já no grupo controle observou-se 67,3% apresentaram genótipo Pp e 50,5% apresentaram genótipo Xx.

A literatura trás que os RFLPs tradicionalmente, são registrados em PvuII como PP versus pp (onde "P" está associado ao alelo "T" e "p" está associado ao alelo "C") e em XbaI como XX versus xx (onde "X" está associado ao alelo "A" e "x" está associado ao alelo "G"). Os alelos "P" e "X" indicam a ausência do site de restrição para cada endonuclease, enquanto as letras minúsculas "p" e "x" indicam a presença do site de restrição. O alelo C de rs2234693 (ou "p") e o alelo G de rs9340799 (ou "x") foram considerados protetores, ou associados à idade tardia no

início de DA. Por outro lado, o genótipo TT de PvuII e o genótipo AA de XbaI foram associados a idade mais precoce no início de DA (JANICK *et al.* 2014).

A frequência de genótipos encontrada para os dois polimorfismos não deixa claro a interrelação desta amostra com a presença da doença, porém pensando em relação à frequência para diagnóstico de demência de início precoce pode-se sugerir, associando com o grupo caso, que a doença de início precoce não foi encontrada nesta amostragem, visto que os indivíduos entrevistados quando não eram previamente diagnosticados (90 % da população), já apresentavam idade mediana de 74 (65-95) anos, além de que o resultado foi sedimentado, quando analisado a frequência genotípica nos níveis evolutivos da doença, onde foi visto a ausência dos genótipos PP e XX.

Quando analisado a razão de chances do desenvolvimento da doença, o comportamento da amostra não condiz com os achados literários para PvuII, pois apontam o genótipo “pp”(OR =3,2) como potencializador da doença em mulheres e em homens o genótipo Pp (OR = 12,6) como altamente ligado ao processo demencial. Já para o polimorfismo Xba I, há correlação com os achados literários que tem o alelo “x” como protetor (OR = 0,412).

Quando analisamos as variáveis clínicas, a expressão do polimorfismo para PvuII (Pp e pp) apresenta relação com a perda de força e XbaI (XX) relacionado ao IMC. Neste caso parece mais sugestivo ao efeito protetor do estrogênio reduzido, afetando a qualidade óssea e muscular, influenciando o aumento do percentual de gordura, alteando assim o IMC, dados já sedimentados na literatura, do que a relação direta com a perda cognitiva. A conclusão é que nesta amostra não há representatividade do gene ligado ao receptor de estrogênio, como atuante exclusivo, sugerindo sim uma via de ação sinérgica à expressão do polimorfismo de ApoE.

7.8.3 Gene PON 1 (rs622 e rs705379)

Quando analisado a hipótese de haver interrelação entre os processos inflamatórios vasculares que produzem microangiopatias e a presença de demência, múltiplos estudos investigaram a influência de alelos específicos para PON1 sobre este tema, no entanto, eles não deram um resultado definitivo (HI *et al.*, 2003; STEFANOVIC *et al.*, 2009; WEHR *et al.*, 2009).

No grupo caso observou-se que para o polimorfismo rs622 a forma mais prevalente foi a selvagem (AA) em ambos os gêneros e no polimorfismo rs705379 a presença do polimorfismo homocigoto mutado (GG) também para ambos os

sexos, não apresentando padronagem diferente entre gêneros.

Segundo RIZWAN *et al.*, 2014 a frequência dos alelos *rs622* varia entre diferentes populações étnicas.

A frequência variável do alelo no presente estudo (48%) mostra semelhança com os reportados da Coreia (30,0%), Japão (33,0%) e diferentes da Índia (29,0%) e Itália (27%), enquanto alta frequência deste alelo foi relatado em estudos realizados na China (65,0%) e em Taiwan (64,0%). Resultados variáveis foram observados para o polimorfismo PON1 *rs662* em pacientes com DA e Demência Vascular. Estudos da Itália, China, Japão, e a Polônia sugeriu que o polimorfismo *rs662* não está associado com DA.

Em RIZWAN *et al.*, 2014 em um estudo sobre a sinergia entre o gene ApoE4 e o polimorfismo de PON1 (*rs622*) em doentes com diagnóstico de demência vascular e DA, a presença de homozigose (AA) não foi vista em pacientes com DA, o que vem de encontro com o resultado aqui demonstrado, sugerindo que a presença de uma demência mista ou outro tipo de demência poderia explicar o resultado contraditório aqui representado.

Em relação ao grupo controle *rs622* a forma mais prevalente foi a heterozigoto (AG) e homozigoto mutado (GG) para o sexo feminino, enquanto para o masculino prevaleceu a heterozigoto (AG). Já no polimorfismo *rs705379* a presença mais prevalente foi do polimorfismo heterozigoto (AG) para o sexo feminino e homozigoto mutado (GG) para o sexo masculino

Poucos estudos atuais trazem como objetivo avaliar a influência no desenvolvimento de demência voltados aos polimorfismos da PON *rs705379*, em uma metanálise recente (YI NIE *et al.*, 2017) existiam dois estudos apenas, que foram baseados na população caucasiana, que correlacionavam o polimorfismo *rs705379* a DA. Os resultados mostraram que o genótipo GG diminuiu o risco de DA (OR = 0,7, 95% CI: 0,56-0,88, $p = .002$), e o alelo A conferiu um aumento da susceptibilidade a DA (OR = 1,21, IC 95%: 1,05-1,39, $P = .009$). A heterogeneidade entre os estudos não foi encontrada, em todas as comparações genéticas, e nenhuma avaliação para viés de publicação foi realizado para os tipos de polimorfismo devido ao pequeno número de estudos. Este dado não corrobora com o estudo aqui apresentado onde polimorfismo GG2 mostrou-se ser fator de risco para a doença (OR=5,063) e o alelo A aparece com maior frequência no grupo controle e contribuindo como fator protetor.

O polimorfismo PON1 Q192R e DA Não houve evidência de associação significativa de Q192 R com DA (n =11) em todas as comparações genéticas em combinações população ou diferentes subgrupos étnicos (caucasianos e Asiáticos ou <65 e ≥ 65 anos). A heterogeneidade significativa foi encontrada apenas no modelo dominante (QQ vs QR p RR; p = .06, I = 44% na população combinada e 0,04, 64% em Asiáticos). Nas análises de sensibilidade excluindo os estudos com desvio de HWE, os resultados permaneceram inalterados em todas as comparações genéticas.

Quando analisado a interrelação com funcionalidade, AA1, AG2 e GG2 aparecem ligados à perda funcional o que sugere que o polimorfismo *rs705379* seja um marcador de vulnerabilidade juntamente com ApoE4.

Conclui-se desta forma que a hipótese, igualmente aos genótipos ligados ao receptor de estrogênio, que também não há uma ligação diretamente proporcional a doença tanto para *rs622* quanto para *rs705379*, segundo os achados literários, mas que a presença do polimorfismo *rs705379* agiria de forma positiva em sinergia com o polimorfismo ApoE4 como biomarcador de vulnerabilidade e provável fator de risco para demência.

7.8.4 Modelo de Regressão Logística para os Dados Genéticos

No modelo geral, observou-se que para cada gene adicional, o paciente tem uma chance 2,182 vezes maior de possuir a doença. No modelo com os pacientes do sexo masculino não foi observada significância, enquanto no caso feminino, constatou-se que para cada gene adicional, o paciente tem uma chance 3,010 vezes maior de possuir a doença, sugerindo de este modo o gênero feminino ser um fator de risco genético.

O resultado corrobora com os achados mostrando que o gênero feminino poderá influenciar positivamente o aparecimento da demência (LIBRE *et al.* 2008; BALES *et al.*, 2009; YOUMANS *et al.*, 2012; BACHMEIER *et al.*, 2014; BELL *et al.*, 2007; CASTELLANO *et al.*, 2011). Outros estudos corroboram com a ideia de que há sinergia entre genes quanto a influência na patogênese da doença (RIZWAN *et al.*, 2014; YI NIE *et al.*, 2017). Aqui também fica clara a interação do gene ApoE tanto na forma E3 e principalmente na forma E4 que a susceptibilidade a doença aumenta na presença destes polimorfismos e que também são mais vistos em mulheres o que sustenta a hipótese trazida pelo modelo de regressão logística, aqui apresentado.

8. CONCLUSÃO

Baseado nos achados concluiu-se que devido ao grande avanço que vem ocorrendo nas técnicas diagnósticas e estratégicas efetivas para a prevenção e tratamento da demência, houve um aumento abrupto do interesse público, clínico e da indústria farmacêutica nessa área, em entender os mecanismos que cercam a patogênese da doença na última década. A doença crônica dislipidemia, é fator de risco no desenvolvimento da doença, que o fator idade deve ser levado em consideração para o diagnóstico. O peso e os padrões de avaliação de obesidade podem ter relação com a patogênese, porem neste trabalho não fica sustentado sua interrelação. O IMC pode ser considerado abaixo do padrão para correlacionar-se com a doença. A capacidade funcional é dependente do fator cognição e agrava a perda de qualidade de vida destes indivíduos e esta hipótese se confirma nos achados genéticos apresentados. A atividade física pode retardar o aparecimento da doença.

Quanto à análise dos aspectos genéticos propostos. O alelo E3 e E4 da ApoE tem relação com a doença e sugere-se que seja dependente do fator idade. O polimorfismo do gene ERS1 pode ser sugerido como marcador de vulnerabilidade no envelhecimento, mas ainda não fica clara, sua via de ação direta e sugere-se que a mesma não haja de forma única e sim em sinergia com a sedimentada via patogênica de ApoE. A hipótese que sedimentaria o vínculo entre a presença clínica de dislipidemia e o aparecimento de polimorfismos para o gene de PON 1, como fatores influenciadores diretos na patogênese da doença não foi confirmada pelos dados vistos neste estudo. Foram observadas prevalências contrárias aos poucos achados para o polimorfismo *rs622* ligado a DA e para o polimorfismo *rs705379*. Como as formas de demência são diversas e as descrições literárias mais ricas se dão a patogênese de DA, poderíamos sugerir duas hipóteses que a influência destes genótipos teria ligação com uma provável demência mista. Diante do fechamento total dos dados desta tese há interação entre a observação clínica e os achados genéticos na descrição da patogênese das demências.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbott RD, White LR, Ross GW, Masaki KH, Curb JD, Petrovitch H (2004). Walking and dementia in physically capable elderly men. *JAMA*. Sep 22;292(12):1447–53
2. Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., et al. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 3, pp.383-421.
3. Allera Toran, C. D., Miranda, R. C., Bentham, W. D., Sohrabji, F., Brown, T. J., Hochberg, R. B., and MacLusky, N. J. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4668 – 4672
4. Alfaro-Acha A, Al Snih S, Raji MA, Kuo YF, Markides KS, Ottenbacher KJ (2006). Handgrip strength and cognitive decline in older Mexican Americans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. Aug; 61 (8):859–65.
5. Albanese E., Davis B., Jonsson P.V., Chang M., Aspelund T., Garcia M. Overweight and obesity in midlife and brain structure and dementia 26 years later the AGES-Reykjavik Study (2015). *Am J Epidemiol.*;18:672–679
6. Ancolio, K., Marambaud, P., Dauch, P., & Checler, F. (1997). Alpha-secretase-derived product of beta-amyloid precursor protein is decreased by presenilin 1 mutations linked to familial Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 69, pp. 2494- 2499.
7. Andersen, K., Launer, L. J., Dewey, M. E., Letenneur, L., Ott, A., Copeland, J. R., et al. (1999). Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group. *Neurology*, 53, pp. 1992-1997.
8. Andersen, K., Launer, L. J., Ott, A., Hoes, A. W., Breteler, M. M., & Hofman, A. (1995). Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease the risk for Alzheimer's disease? The Rotterdam Study. *Neurology*, 45, pp. 1441-1445.
9. Andersen CK, Wittrup-Jensen KU, Lolk A, Andersen K, Kragh-Sorensen P. Ability to perform activities of daily living is the main factor affecting quality of life in patients with dementia. *Health Qual Life Outcomes* (2004); 5:52. doi: 10.1186/1477-7525-2-52
10. Artiga, M. J., Bullido, M. J., Frank, A., Sastre, I., Recuero, M., Garcia, M. A., et al. (1998a). Risk for Alzheimer's disease correlates with transcriptional activity of the APOE gene. *Hum Mol Genet*, 7, pp. 1887-1892.
11. Artiga, M. J., Bullido, M. J., Sastre, I., Recuero, M., Garcia, M. A., Aldudo, J., et al. (1998b). Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. *FEBS Lett*, 421, pp. 105-108.
12. Asai, M., Hattori, C., Szabo, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S., et al. (2003). Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun*, 301, pp. 231-235.
13. Assoc., A. (2004). Basic Facts for Alzheimer's Disease: Alzheimer's Disease Fact Sheet. p.2.

14. Anstey K.J., Cherbuin N., Budge M., Young J. Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. (2011) *Obes Rev.*;12:e426–e437
15. Aviram M, Vaya J. Paraoxonase 1 activities, regulation, and interactions with atherosclerotic lesion. *Curr Opin Lipidol* 2013; 4: 339–44.
16. Azeredo, Z., & Matos, E. (2003). Grau de dependência em doentes que sofreram AVC. *Revista da Faculdade de Medicina de Lisboa*, 3 Série, 8 (4), 199-204
17. Bachmeier C, Shackleton B, Ojo J, Paris D, Mullan M, Crawford F (2014). Apolipoprotein E isoform-specific effects on lipoprotein receptor processing. *NeuroMolecular Medicine*.
18. Baldereschi, M. D., Lepore, V., Bracco, L., Maggi, S., & Grigoletto, F. (1998). Estrogen-replacement therapy and Alzheimer's disease in the Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurology*, 50, pp. 996-1002.
19. Bales KR, Liu F, Wu S, Lin S, Koger D, DeLong C, Paul SM (2009). Human APOE isoform-dependent effects on brain beta-amyloid levels in PDAPP transgenic mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience.*;29:6771–6779
20. Bassan, M., Zamostiano, R., Davidson, A., Pinhasov, A., Giladi, E., Perl, O., et al. (1999). Complete sequence of a novel protein containing a femtomolar-activity-dependent neuroprotective peptide. *J. Neurochem.* 72, 1283–1293
21. Beard, C. M., Waring, S. C., O'Brien, P. C., Kurland, L. T., & Kokmen, E. (1998). Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and Alzheimer's disease: a case-control study in Rochester, Minnesota, 1980 through 1984. *Mayo Clin Proc*, 73, pp. 951-955.
22. Beffert, U., Arguin, C., & Poirier, J. (1999a). The polymorphism in exon 3 of the low density lipoprotein receptor-related protein gene is weakly associated with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 259, pp. 29-32.
23. Beffert, U., Cohn, J. S., Petit-Turcotte, C., Tremblay, M., Aumont, N., Ramassamy, C., et al. (1999c). Apolipoprotein E and beta-amyloid levels in the hippocampus and frontal cortex of Alzheimer's disease subjects are disease-related and apolipoprotein E genotype dependent. *Brain Res*, 843, pp.87-94.
24. Behl, C., Moosmann, B., Manthey, D., & Heck, S. (2000). The female sex hormone oestrogen as neuroprotectant: activities at various levels. *Novartis Found Symp*, 230, 221-34.
25. Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, Bedi GS, Holtzman DM, Deane R, Zlokovic BV(2007). Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.*;27:909–918

26. Beydoun M.A., Beydoun H.A., Wang Y. Obesity and central obesity as risk factors for incident dementia and its subtypes: a systematic review and meta-analysis(2008). *Obes Rev.*;9:204–2
27. Berquó, E. S., & Leite, V. M. (1988). Algumas considerações sobre a demografia da população idosa no Brasil. *Ciência e Cultura*, pp. 679-688.
28. Berriman, J., Serpell, L., & Oberg, K. (2003). Tau filaments from human brain and from in vitro assembly of recombinant protein show cross-beta structure. *Proc Natl Acad Sci USA* , 100, pp. 9034-9038.
29. Bertrand, P., Poirier, J., Oda, T., Finch, C. E., & Pasinetti, G. M. (1995). Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease. *Brain Res Mol Brain Res*, 33, pp. 174-178.
30. Bian, L., Yang, J. D., Guo, T. W., Sun, Y., Duan, S. W., Chen, W. Y., et al. (2004). Insulin-degrading enzyme and Alzheimer disease: a genetic association study in the Han Chinese. *Neurology*, 63, pp. 241-245.
31. Bimonte, H. A., & Denenberg, V. H. (1999). Estradiol facilitates performance as working memory load increases. *Psychoneuroendocrinology*, 24, pp. 161-173.
32. Biundo Fabrizio , Keita Ishiwari, Dolores Del Prete, Luciano D'Adamio (2015).Interaction of ApoE3 and ApoE4 isoforms with an *ITM2b/BRI2* mutation linked to the Alzheimer disease-like Danish dementia: Effects on learning and memory.*Neurobiol Learn Mem.* Dec; 126: 18–30. 10.1016/j.nlm.2015.10.009
33. Bjorkhem, I., Lutjohann, D., Diczfalusy, U., Stahle, L., Ahlborg, G., & Wahren, J. (1998). Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24-S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J Lipid Res* , 39, pp. 1594-1600.
34. Blacker, D., Wilcox, M. A., Laird, N. M., Rodes, L., Horvath, S. M., Go, R. C., et al. (1998). Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* , 19, pp. 357-360.
35. Blennow, K., De Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's Disease. *Lancet* , pp. 387-403.
36. Blomqvist, M. E., Chalmers, K., Andreasen, N., Bogdanovic, N., Wilcock, G. K., Cairns, N. J., et al. (2005). Sequence variants of IDE are associated with the extent of beta-amyloid deposition in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging* , 26, pp. 795-802.
37. Bodovitz, M. L., & Klein, W. L. (1996). Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* , 271, pp.4436-4440.
38. Boeka, AG; Lokken, KL. Neuropsychological performance of a clinical sample of extremely obese individuals. (2008) *Archives of Clinical Neuropsychology*, 23, 467-474,

39. Bongaarts, J. (2009). Human population growth and the demographic transition. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 364, 2985–2990. doi: 10.1098/rstb.2009.0137
40. Borchelt, S., Ratovitski, T., van Lare, J., Lee, M. K., Gonzales, V., Jenkins, N. A., et al. (1997). Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* , 19, pp. 939-945.
41. Borchelt, S., Ratovitski, T., van Lare, J., Lee, M. K., Gonzales, V., Jenkins, N. A., et al. (1997). Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* , 19, pp. 939-945.
42. Borchet, D., Thinakaran, G., & Eckman, C. (1996). Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* , 17 (5), pp. 1005-1013.
43. Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* , 82, pp. 239-259.
44. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* , 72, pp. 248-254.
45. Burger, H. G., Cahir, N., Robertson, D. M., Groome, N. P., Dudley, E., & Green, A. (1998). Serum inhibins A and B fall differentially as FSH rises in perimenopausal women. *Clin Endocrinol* , 48, pp. 809-813.
46. Burns, M., Gaynor, K., Olm, V., Mercken, M., LaFrancois, J., Wang, L., et al. (2003). Presenilin redistribution associated with aberrant cholesterol transport enhances beta-amyloid production in vivo. *J Neurosci* , 23, pp. 5645-5649.
47. Buchman, Boyle Wilson, Bienias, Bennett (2007). Grip strength and the risk of incident Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology*.;29(1–2):66–73
48. Buchman AS, et al (2005). Change in body mass index and risk of incident Alzheimer disease. *Neurology*.;65:892–897. doi:10.1212/01.wnl.0000176061.33817.90.
49. Camargo EC, Weinstein G, Beiser AS, Tan ZS, DeCarli C, Kelly-Hayes M, Kase C, Murabito JM, Seshadri S. (2016). Association of a Physical Function with Clinical and subclinical Brain disease: The Framingham Offspring Study. *J Alzheimers Dis.* Jul 14; 53(4):1597-608.
50. Carlson, G. A., Borchelt, D. R., Dake, A., Turner, S., Danielson, V., Coffin, J. D., et al. (1997). Genetic modification of the phenotypes produced by amyloid precursor protein overexpression in transgenic mice. *Hum Mol Genet* , 6, pp. 1951-1959
51. Combarros O, Cortina-Borja M, Smith AD, Lehmann DJ. Epistasis in sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2009;30 (9): 1333-1349.

52. Carroll, J.C., Rosario, E.R., 2012. The potential use of hormone-based therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 9: 18–34.
53. Castellano JM, Kim J, Stewart FR, Jiang H, DeMattos RB, Patterson BW, Holtzman DM (2011). Human ApoE isoforms differentially regulate brain amyloid-beta peptide clearance. *Science Translational Medicine.*;3:8957
54. Celis J.E., Gromova I., Gromov P., Moreira J.M., Cabezón T., Friis E., Rank F. (2006). Molecular pathology of breast apocrine carcinomas: a protein expression signature specific for benign apocrine metaplasia. *FEBS Lett.* 22;580(12):2935
55. Chaimowicz, F. (1998). *Os idosos brasileiros no século XXI: demografia, saúde e sociedade*. Postgraduate, Belo Horizonte Chartier-Harlin, M. C., Crawford, F., Houlden, H., Warren, A., Hughes, D., Fidani, L., et al. (1991). Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* , 353, pp.844-846.
56. Chand G. B., Dhamala M. (2016b). The salience network dynamics in perceptual decision-making. *Neuroimage* 134 85–93. 10.1016/j.neuroimage.2016.04.018
57. Chen, F., David, D., Ferrari, A., & Gotz, J. (2004). Posttranslational modifications of tau-Role in human tauopathies and modeling in transgenic animals. *Curr Drug Targests* , 5, pp. 503-515.
58. Chen, F., Yang, D. S., Petanceska, S., Yang, A., Tandon, A., Yu, G., et al. (2000). Carboxyl-terminal fragments of Alzheimer beta-amyloid precursor protein accumulate in restricted and unpredicted intracellular compartments in presenilin 1-deficient cells. *J Biol Chem* , 275, pp. 36794-36802.
59. Chuang, Y. F. *et al*(2015). Midlife adiposity predicts earlier onset of Alzheimer's dementia, neuropathology and presymptomatic cerebral amyloid accumulation. *Molecular psychiatry*, 10.1038/mp.129
60. Citron, M., Vigo-Pelfrey, C., Teplow, D. B., Miller, C., Schenk, D., Johnston, J., et al. (1994). Excessive production of amyloid beta-protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer disease mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* , 91, pp. 11993-11997.
61. Citron, M., Westaway, D., Xia, W., & Carlson, G. (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* , 3 (1), pp.67-72.
62. Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., et al. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* , 261, pp.921-923.
63. Cosgrove, K., Mazure, C., & Staley, J. (2007). Evolving knowledge of sex differences in brain structure, function, and chemistry. *Biol Psychiat* , 62 (8), pp. 847-855.

64. Cotman, C., & Berchtold, N. (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* , 25 (6), pp.295-301.
65. Covelli, V. (15 de Maio de 2009). Acesso em 08 de Julho de 2010, disponível em Guide to the Necropsy of the Mouse Division of Protection of Man and Ecosystems: http://eulep.pdn.cam.ac.uk/Necropsy_of_the_Mouse/printable.php
66. Covelli, V. (15 de Maio de 2009). Acesso em 11 de Agosto de 2013, disponível em Guide to the Necropsy of the Mouse Division of Protection of Man and Ecosystems: http://eulep.pdn.cam.ac.uk/Necropsy_of_the_Mouse/printable.php
67. Cox, R., & John-Alder, H. (2005). Testosterone has opposite effects on male growth in lizards (*Sceloporus* spp.) with opposite patterns of sexual size dimorphism. *J Exp Biol* , 208 (Pt24), pp. 4679-4687.
68. Creegan R, Hunt W, McManus A, Rainey-Smith SR. Diet, nutrients and metabolism: cogs in the wheel driving Alzheimer's disease pathology? *Br J Nutr* 2015; 113: 1499–517
69. Custodio, N., García, A., Montesinos, R., Escobar, J., and Bendezú, L. (2008). Prevalencia de demencia en una población urbana de Lima-Perú: un estudio puerta a puerta. *An. Fac. Med.* 69, 233–238. doi: 10.15381/anales.v69i 4.1110
70. Custodio N, Wheelock A, Thumala D and Slachevsky A (2017) Dementia in Latin America: Epidemiological Evidence and Implications for Public Policy. *Front. Aging Neurosci.* 9:221. doi: 10.3389/fnagi.2017.00221
71. Dabbs, M., & Dabbs, J. (2000). *Heroes, rogues, and lovers: testosterone and behavior*. New York: McGraw-Hill.
72. Dhamala M., Rangarajan G., Ding M. (2008a). Analyzing information flow in brain networks with nonparametric Granger causality. *Neuroimage* 41 354–362. 10.1016/j.neuroimage.2008.02.020
73. Daniel, J. M., & Dohanich, G. P. (2001). Acetylcholine mediates the estrogen-induced increase in NMDA receptor binding in CA1 of the hippocampus and the associated improvement in working memory. *J Neurosci* , 21, pp. 6949-6956.
74. Daniel, J. M., Fader, A. J., Spencer, A. L., & Dohanich, G. P. (1997). Estrogen enhances performance of female rats during acquisition of a radial arm maze. *Horm Behav* , 32, pp. 217-225.
75. Dietschy, J. M., & Turley, S. D. (2004). Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* , 45, pp. 1375-1397.
76. Di Paolo G, Kim TW. Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond (2011). *Nat Rev Neurosci*; 12: 284–96.

77. Dong, L. M., & Weisgraber, K. H. (1996). Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins. *J Biol Chem* , 271, pp. 19053-19057.
78. Dong, L. M., Wilson, C., Wardell, M. R., Simmons, T., Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., et al. (1994). Human apolipoprotein E. Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms. *J Biol Chem* , 269, pp. 22358-22365.
79. Donini LM, Savina C, Cannella C(2003). Eating habits and appetite control in the elderly: the anorexia of aging. *International psychogeriatrics/IPA.*;15:73–87. doi: 10.1017/S1041610203008779
80. Drouet, B., Pincon-Raymond, M., Chambaz, J., & Pillot, T. (2000). Molecular basis of Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* , 57 (5), pp. 705-715.
81. Elias M. F., Goodell A. L., Dore G. A. (2012). Hypertension and cognitive functioning: a perspective in historical context. *Hypertension* 60 260–268. 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.186429
82. Endres K, Fahrenholz F. (2012). Regulation of α -secretase ADAM10 expression and activity. *Exp Brain Res.* 217(3-4):343-52.
83. ENS.(2010).EncuestaNacionaldeSalud 2009—2010.Santiago:Minsal.
84. Emmerzaal T.L., Kiliaan A.J., Gustafson D.R. 2003-2013: A decade of body mass index, Alzheimer's disease, and dementia (2015). *J Alzheimers Dis.*;43:739–755
85. Fagan, A. M., Bu, G., Sun, Y., Daugherty, A., & Holtzman, D. M. (1996). Apolipoprotein E-containing high density lipoprotein promotes neurite outgrowth and is a ligand for the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* , 271, pp. 30121-30125.
86. Fagundes, T.A, Pereira, D.A.G, Bueno, K. M. P., Assis, M.G. Incapacidade funcional de idosos com demência.(2017) *Cad. Ter. Ocup. UFSCar, São Carlos*, v. 25, n. 1, p. 159-169, 2017 <http://dx.doi.org/10.4322/0104-4931>.
87. Faraco G., Iadecola C. (2013). Hypertension: a harbinger of stroke and dementia. *Hypertension* 62 810–817. 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01063
88. Farrer LA, Myers RH, Cupples LA, St George-Hyslop PH, Bird TD, Rossor MN et al. Transmission and age-at-onset patterns in familial Alzheimer's disease: evidence for heterogeneity(1990). *Neurology.*;40:395-403
89. Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., et al. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *Jama* , 278, pp. 1349-1356.

90. Fassbender, K., Simons, M., & Bergmann, C. (2001). Simvastatin strongly reduces Alzheimer's disease A β 42 and A β 40 levels in vitro and in vivo. *Acad Sci USA* , pp. 5856-5861.
91. Fati Nourhashémi SASG-GERJ-LAHGBV. Is There a Relationship Between Fat-Free Soft Tissue Mass and Low Cognitive Function? Results From a Study of 7,105 Women(2002).;50:1796–1801
92. Felsenstein, K. M., Hunihan, L. W., & Roberts, S. B. (1994). Altered cleavage and secretion of a recombinant beta-APP bearing the Swedish familial Alzheimer's disease mutation. *Nat Genet* , 6, pp. 251-255.
93. Fernandes, C., Pinto-Duarte, A., Ribeiro, J., & Sebastião, A. (2008). Postsynaptic action of brain-derived neurotrophic factor attenuates alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in hippocampal interneurons. *J Neurosci* , 28 (21), pp. 5611-5618.
94. Firmo JOA, Barreto SM, Lima-Costa MF (2003). The Bambui Health and Aging Study (BHAS): factors associated with the treatment of hypertension in older adults in the community. *Cad. Saúde Pública*;19:817-27
95. Foley P. Lipids in Alzheimer's disease: a century-old story(2010). *Biochim Biophys Acta*; 1801: 750–3.
96. Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D. A., Sym, M., Apfeld, J., et al. (2002). aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* , 3, pp. 85-97.
97. Franklin SS, Pio JR, Wong ND, Larson MG, Leip EP, Vasan RS, Levy D. Predictors of new-onset diastolic and systolic hypertension: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2005;111:1121-27
98. Fridman C, Gregório CP, Neto ED, Ojopi EPB. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. *Rev Psiq Clin*. 2004;31:19-25
99. Friedewald, W. T., Levy, R. I., & Fredrickson, D. S. (1972). Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma,without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* , 18, pp. 499-502.
100. Friedland, R. P., Fritsch, T., Smyth, K., Koss, E., Lerner, A., Chen, C., et al. (2001). Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members. *Proc Natl Acad Sci USA* , 98 (6), pp. 3440-3445.
101. Fuentes, P., and Albala, C. (2014). Aging and dementia in Chile. *Dement. Neuropsychol*.8,317–322.doi:10.1590/s1980-57642014dn84000003

102. Fugger, H. N., Cunningham, S. G., Rissman, E. F., & Foster, T. C. (1998). Sex differences in the activational effect of ERalpha on spatial learning. *Horm Behav* , 34, pp. 163-170.
103. Garcia-Ptacek S, Faxen-Irving G, Cermakova P, Eriksdotter M, Religa D(2014). Body mass index in dementia. *European journal of clinical nutrition*.;68:1204–1209. doi: 10.1038/ejcn..199
104. Goswami B, Tayal D, Gupta N and Mallika V. (2009). Paraoxonase: a multifaceted biomolecule. *Clin Chim Acta*; 410: 1-12
105. Gordon, I., Grauer, E., Genis, I., Sehayek, E., Michaelson, D. M. (1995) Memory deficits and cholinergic impairments in apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci. Lett.* 199, 1–4.
106. Gorelick P. B., Nyenhuis D. (2012). Blood pressure and treatment of persons with hypertension as it relates to cognitive outcomes including executive function. *J. Am. Hypertens.* 6 309–315. 10.1016/j.jash.2012.08.004
107. Gorospe E.C., Dave J.K. The risk of dementia with increased body mass index (2007). *Age Ageing*.;36:23–29
108. Gosselet F., Saint-Pol J., Candela P., Fenart L. (2013). Amyloid- β Peptides, Alzheimer's Disease and the Blood-Brain Barrier. *Curr Alzheimer Res.*
109. Green, P. S., Yang, S. H., & Simpkins, J. W. (2000). Neuroprotective effects of phenolic A ring o estrogens. *Novartis Found Symp*, 230, pp.202-213.
110. Green, P., Bales, K., Paul, S., & Bu, G. (2005). Estrogen therapy fails to alter amyloid deposition in the PDAPP model of Alzheimer's disease. *Endocrinology* , 146, pp. 2774-2781.
111. Greenfield, J., Leung, L., Cai, D., Kaasik, K., Gross, R., Rodriguez-Boulan, E., et al. (2002). Estrogen lowers Alzheimer beta-amyloid generation by stimulating trans-Golgi network vesicle biogenesis. *J Biol Chem* , 277, pp.12128-12136.
112. Gunstad, J. Improved memory function 12 weeks after bariatric surgery. (2010)*Surg Obes Relat*, 1-7.
113. Gustafson D.R., Backman K., Waern M., Ostling S., Guo X., Zandi P. Adiposity indicators and dementia over 32 years in Sweden (2009). *Neurology*. 73:1559–1566
114. Gutierrez B.A.O., Silva H. S., Guimarães C., Campino A.C .Impacto econômico da doença de Alzheimer no Brasil: é possível melhorar a assistência e reduzir custos? (2014). *Ciência & Saúde Coletiva*, 19 (11), pp 4479-4486.
115. Guo, Q., Fu, W., & Xie, J. (1998). Par-4 is a mediator of neuronal degeneration associated with the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Nat Med* , 4 (8), pp. 957-962.
116. Guo, Z., Cupples, L. A., Kurz, A., Auerbach, S. H., Volicer, L., Chui, H., et al. (2000). Head injury and the risk of AD in the MIRAGE study. *Neurology* , 54, pp.

117. Hachinski V., Iadecola C., Petersen R. C., Breteler M. M., Nyenhuis D. L., Black S. E., et al. (2006). National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Canadian Stroke Network vascular cognitive impairment harmonization standards. *Stroke* 37 2220–2241. 10.1161/01.STR.0000237236.88823.47
118. Hajjar I., Wharton W., Mack W. J., Levey A. I., Goldstein F. C. (2016). Racial disparity in cognitive and functional disability in hypertension and all-cause mortality. *Am. J. Hypertens.* 29 185–193. 10.1093/ajh/hpv084
119. Hanson AJ, Bayer JL, Baker LD, Cholerton B, VanFossen B, Trittschuh E, Rissman RA, Donohue MC, Moghadam SH, Plymate SR, Craft S. Differential effects of meal challenges on cognition, metabolism, and biomarkers for apolipoprotein E varepsilon4 carriers and adults with mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis* 2015; 48: 205–18
120. Harr, S. D., Uint, L., Hollister, R., Hyman, B. T., & Mendez, A. J. (1996). Brain expression of apolipoproteins E, J, and A-I in Alzheimer's disease. *J Neurochem* , 66, pp. 2429-2435.
121. Havel, R., & Kane, J. (1989). Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins. In: C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly, & D. Valle, *The Metabolic basics of inherited disease*. (pp. 1129-1138). New York, NY, USA: McGraw-Hill.
122. Henderson, V. W., Paganini-Hill, A., Emanuel, C. K., Dunn, M. E., and Buckwalter, J. G. (1994) *Arch. Neurol.* 51, 896 –900.
123. Herrera E Jr, Caramelli P, Silveira AS, Nitrini R (2002). Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* Apr-Jun; 16(2):103-8.
124. Hooghiemstra AM, Ramakers IHGB, Sistermans N, Pijnenburg YAL, Aalten P, Hamel REG, Melis RJF, Verhey FRJ, Olde Rikkert MGM, Scheltens P, van der Flier WM (2017). Gait Speed and Grip Strength Reflect Cognitive Impairment and Are Modestly Related to Incident Cognitive Decline in Memory Clinic Patients With Subjective Cognitive Decline and Mild Cognitive Impairment: Findings From the 4C Study.; 4C Study Group. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* Jun 1;72(6):846-854.
125. Hogervorst, E., Bandelow, S., Combrinck, M., & Smith, A. (2004). Low free testosterone is an independent risk factor for Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*, 39 (11-12), pp. 1633-1669.
126. Houlden, H., Crook, R., Backhovens, H., Prihar, G., Baker, M., Hutton, M., et al. (1998). ApoE genotype is a risk factor in nonpresenilin early-onset Alzheimer's disease families. *Am J Med Genet* , 81, pp. 117-121.

127. Hughes TF, Borenstein AR, Schofield E, Wu Y, Larson EB (2009). Association between late-life body mass index and dementia: The Kame Project. *Neurology*;72:1741–1746. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181a60a58
128. Jackson AS, Pollock ML (1985). Practical assessment of body composition. *The Physician and sport medicine*. 13: 256-26.
129. Jaffe, A. B., Toran-Allerand, C. D., Greengard, P., & Gandy, S. E. (1994). Estrogen regulates metabolism of Alzheimer amyloid beta precursor protein. *J Biol Chem* , 269, pp. 13065-13068.
130. J. Cui, Y. Shen, R. Li, Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain, *Trends Mol. Med.* 19 (3) (2013) 197–209
131. Jellinger, K. A., & Baner, C. (1998). Senile dementia with tangles (tangle predominant form of senile dementia). *Brain Pathol* , 8, pp.367-376.
132. Johnson K. C., Margolis K. L., Espeland M. A., Colenda C. C., Fillit H., Manson J. E., et al. (2008). A prospective study of the effect of hypertension and baseline blood pressure on cognitive decline and dementia in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study. *J. Am. Geriatr. Soc.* 56 1449–1458. 10.1111/j.1532-5415.2008.01806.
133. Johnson DK, Wilkins CH, Morris JC. Accelerated Weight Loss May Precede Diagnosis in Alzheimer Disease. *Arch Neurol.* (2006) September 1;63(9):1312–1317
134. Jurevics, H. A., & Morell, P. (1994). Sources of cholesterol for kidney and nerve during development. *J Lipid Res* , 35, pp. 112-120.
135. Katzman, R. (1993). Education and the prevalence of dementia and Alzheimer's disease. *Neurology* , 43, pp. 13-20.
136. Katz S, Ford AB., Moskowitz RW., Jackson BA., Jaff MW. Studied of illness in the aged. The index ADL: a standardized measure of biological and psychosocial function. *JAMA*, 1963.185(12):914-9.
137. Kim J, Yoon H, Basak J, Kim J(2014). Apolipoprotein E in synaptic plasticity and Alzheimer's disease: Potential cellular and molecular mechanisms. *Molecules and Cells*.;37:767–776.
138. Kivipelto, M., Helkala, E. L., Laakso, M. P., Hanninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., et al. (2001). Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *Bmj* , 322, pp. 1447-1451.

139. Kivipelto M., Ngandu T., Fratiglioni L., Viitanen M., Kareholt I., Winblad B. Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease (2005). *Arch Neurol.*;62:1556–1560
140. Klimkowicz-Mrowiec A, Marona M, Spisak K, et al. Paraoxonase 1 gene polymorphisms do not influence the response to treatment in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2011;32:26–31
141. Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W., & Fahrenholz, F. (2001). Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha-secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci USA* , 98, pp. 5815-5820.
142. Knopman DS, Edland SD, Cha RH, Petersen RC, Rocca WA (2007). Incident dementia in women is preceded weight loss for at least a decade. *Neurology.*;69(8):739–746
143. Laws, S. M., Hone, E., Taddei, K., Harper, C., Dean, B., McClean, C., et al. (2002). Variation at the APOE -491 promoter locus is associated with altered brain levels of apolipoprotein E. *Mol Psychiatry* , 7, pp. 886-890.
144. Lee, S. J., Lenton, E. A., Sexton, L., & Cooke, I. D. (1988). The effect of age on the cyclical patterns of plasma LH, FSH, estradiol and progesterone in women with regular menstrual cycles. *Hum Reprod* , 3, pp. 851-855.
145. Li X., Liang Y., Chen Y., Zhang J., Wei D., Chen K., et al. (2015). Disrupted frontoparietal network mediates white matter structure dysfunction associated with cognitive decline in hypertension patients. *J. Neurosci.* 35 10015–10024. 10.1523/JNEUROSCI.5113-14.
146. Llibre J, Ferri C, Acosta D, et al(2008). Prevalence of dementia in Latin America, India, and China: a population-based cross-sectional survey. *Lancet*;372:464-474
147. Li Rena, Meharvan Singh (2014). Sex Differences in Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Front Neuroendocrinol.* Aug; 35(3): 385–403.
148. Lim WL, Martins IJ, Martins RN. The involvement of lipids in Alzheimer's disease. (2014) *J Genet Genom*; 41: 261–74
149. Lutjohann, D., Breuer, O., Ahlborg, G., Nennesmo, I., Siden, A., Diczfalusy, U., et al. (1996). Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc Natl Acad Sci USA* , pp. 9799-9804.
150. Luzardo AR, Waldman BF(2004). Atenção ao familiar cuidador do idoso com doença de Alzheimer. *Acta Sci Health Sci.*;26(1):135-45
151. Maffucci, J., & Gore, A. (2006). Age-related changes in hormones and their

receptors in animal models of female reproductive senescence.

152. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, et al. Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1998;139:341–9
153. Marsha, M. M., Walkera, R., Curtissa, L., & Bankaa, C. L. (1999). Protection against atherosclerosis by estrogen is independent of plasma cholesterol levels in LDL receptor-deficient mice. *The Journal of Lipid Research* , 40, pp.893-900.
154. Miller, M. M., Hyder, S. M., Assayag, R., Panarella, S. R., Tousignant, P., & Franklin, K. B. (1999). Estrogen modulates spontaneous alternation and the cholinergic phenotype in the basal forebrain. *Neuroscience* , 91, pp.1143-1153.
155. Miller, N. (1982). Coronary atherosclerosis and plasma lipoproteins: epidemiology and pathophysiologic considerations. *J Cardiovasc Pharmacol* , 4, pp.S190-195.
156. Ministério da Saúde. Saúde Brasil 2011: uma análise da situação de saúde e a vigilância da saúde da mulher. Brasília: Ministério da Saúde. 2012
157. Moffat, S., & Hampson, E. (1996). A curvilinear relationship between testosterone and spatial cognition in humans: possible influence of hand preference. *Psychoneuroendocrinology* , 21 (3), pp.323-337.
158. Moffat, S., Zonderman, A., Metter, E., Kawas, C., Blackman, M., Harman, S., et al. (2004). Free testosterone and risk for Alzheimer disease in older men. *Neurology* , 62 (2), pp.188-193.
159. Moon JH. Endocrine risk factors for cognitive impairment. *Endocrinol Metab* 2016; 31: 185–92
160. Morley JE (2003). Anorexia and weight loss in older persons. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences.*;58:131–137. doi: 10.1093/gerona/58.2.M131
161. Nitrini, R. (1999). Epidemiologia da doença de Alzheimer no Brasil. *Rev. Psiq. Clin.*26 (5).
162. Nitrini, R., Bottino, C. M., Albala, C., Custodio Capuñay, N. S., Ketzoian, C., Llibre Rodriguez, J. J., et al. (2009). Prevalence of dementia in Latin America: a collaborative study of population-based cohorts. *Int. Psychogeriatr.* 21, 622–630.doi:10.1017/S1041610209009430
163. Nitrini,R.,Caramelli,P.,Herrera,E.Jr.,Bahia,V.S.,Caixeta,L.F.,Radanovic,M., et al. (2004). Incidence of dementia in a community-dwelling Brazilian population.*AlzheimerDis.Assoc.Disord.*18,241–246
164. Norton S, Matthews FE, Barnes DE, Yaffe K, Brayne C. Potential for primary

prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data (2014). *Lancet Neurol.*;13(8):788–794. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70136-X

165. Organização Mundial da Saúde. Alzheimer's disease. In: Mental health, related diseases. [acessado em 16 mar 2007a]. Disponível em: http://www.afro.who.int/mentalhealth/related_diseases/alzheimer_disease.html
166. Organização Mundial da Saúde. Alzheimer's disease. In: Alzheimer's disease: The Brain Killer. [acessado em 16 mar 2007b]. Disponível em: http://www.afro.who.int/en/Section1174/Section1199/Section1567_6740.html
167. Osono, Y., Woollet, L. A., Herz, J., & Dietschy, J. M. (1995). Role of the low density lipoprotein receptor in the flux of cholesterol through the plasma and across the tissues of the mouse. *J Clin Invest*, 95, pp. 1124-1132.
168. Oveisgharna S., Hachinski V. (2010). Hypertension, executive dysfunction, and progression to dementia. *Arch. Neurol.* 67 187–192. 10.1001/archneurol.2009.312
169. Paganini-Hill, A., & Henderson, V. W. (1996). Estrogen replacement therapy and risk of Alzheimer disease. *Arch Intern Med*, 156, pp. 2213-227.
170. Papassotiropoulos, A., Lutjohann, D., Bagli, M., Locatelli, S., Jessen, F., Buschfort, R., et al. (2002). 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia. *J Psychiatr Res*, 36, pp. 27-32.
171. Pappolla, M. A., Bryant-Thomas, T. K., Helbert, D., Pacheco, J., Fabra Garcia, M., Manjon, M., et al. (2003). Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology*, 61, pp. 199-205.
172. Parthasarathy, V., Frazier, D. T., Bettcher, B. M., Jastrzab, L., Chao, L., Reed, B., Kramer, J. H. (2017). Triglycerides are negatively correlated with cognitive function in nondemented aging adults. *Neuropsychology*, 31(6), 682-688.
173. Pedditizi E., Peters R., Beckett N. The risk of overweight/obesity in mid-life and late life for the development of dementia: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies (2016). *Age Ageing*;45:14–21
174. Pericak-Vance, M. A., Yamaoka, L. H., Haynes, C. S., Speer, M. C., Haines, J. L., Gaskell, P. C., et al. (1988). Genetic linkage studies in Alzheimer's disease families. *Exp Neurol*, 3, pp. 271-279.
175. Pfrieger FW(2003). Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cellular and Molecular Life Sciences*.;60:1158–1171
176. Pi Y, Zhang L, Chang K, et al. Lack of an association between Paraoxonase 1 gene polymorphisms (Q192R, L55M) and Alzheimer's disease: a meta-analysis.

177. Plump, A., Smith, J., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J., et al. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 71, pp. 343-353.
178. Pregelj P (2008). Involvement of cholesterol in the pathogenesis of Alzheimer's disease: role of statins. *Psychiatr Danub*, 2008 Jun;20(2):162-7.
179. Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., and Ferri, C.P. (2013). The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's Dement*, 9, 63.e2–75.e2. doi:10.1016/j.jalz.2012.11.007
180. Qiu, C., Backman, L., Winblad, B., Aguero-Torres, H., & Fratiglioni, L. (2001). The influence of education on clinically diagnosed dementia incidence and mortality data from the Kungsholmen Project. *Arch Neurol*, 58, pp. 2034-2039
181. Qizilbash N., Gregson J., Johnson M.E., Pearce N., Douglas I., Wing K. BMI and risk of dementia in two million people over two decades: a retrospective cohort study (2015). *Lancet Diabetes Endocrinol.*;3:431–436.
182. Rabinowicz, T., Dean, D., Petetot, J., & de Courten-Myers, G. (1999). *Gender differences in the human cerebral cortex: more neurons in males; more processes in females*. Lausanne, Switzerland: Journal of Child Neurology.
183. Reed, W., Clark, M., Parker, P., Raouf, S., Arguedas, N., Monk, D., et al. (2006). Physiological effects on demography: a long-term experimental study of testosterone's effects on fitness. *Am Nat*, 167 (5), pp. 667-683.
184. Reis LA, Moreira JSS, Duarte SFP. Risco de queda, capacidade funcional e respiratória em idosos residentes em instituições de longa permanência (2015). *Rev Neurocienc*. [Internet];23(3) [acesso em 08 ago 2016]. Disponível: <http://dx.doi.org/10.4181/RNC.2015.23.03.1071.08p>
185. Rizwan Alam, Manjari Tripathi, DM Nasim Mansoori et al (2014). Synergistic Epistasis of Paraoxonase 1(rs662 and rs85460) and Apolipoprotein E4 Genes in Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*, Vol. 29(8) 769-776.
186. Rosengren A., Skoog I., Gustafson D., Wilhelmsen L. Body mass index, other cardiovascular risk factors, and hospitalization for dementia (2005). *Arch Intern Med.*;165:321–32

187. Savage, M., Trusko, S., Howland, D., Pinsker, L., Mistretta, S., Reaume, A., et al. (1998). Turnover of amyloid beta-protein in mouse brain and acute reduction of its level by phorbol ester. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society For Neuroscience.* , 18, pp. 1743-1752.
188. Schonknecht, P., Pantel, J., Klinga, K., Jensen, M., Hartmann, T., Salbach, B., et al. (2001). Reduced cerebrospinal fluid estradiol levels are associated with increased beta-amyloid levels in female patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* , 307, pp. 122-124.
189. Schumacher, M., Guennoun, R., Ghomari, A., Massaad, C., Robert, F., El-Etr, M., et al. (2007). Novel perspectives for progesterone in hormone replacement therapy, with special reference to the nervous system. *Endocr Rev* , 28, pp. 387-439.
190. Shumaker, S. A., Legault, C., Rapp, S. R., Thal, L., Wallace, R. B., & Ockene, J.K. (2003). Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA* , 289, pp. 2651-2662.
191. Singer, C. A., Figueroa-Masot, X. A., Batchelor, R. H., & Dorsa, D. M. (1999). The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neuroscience* , 19, pp. 2455-2463.
192. Snyder HM, Corriveau RA, Craft S, Faber JE, Greenberg SM, Knopman D, et al. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia including Alzheimer's disease (2015). *Alzheimer's Dement.*;11(6):710–717. doi: 10.1016/j.jalz..10.008
193. Swaab, D., & Garcia-Falgueras, A. (2009). Sexual differentiation of the human brain in relation to gender identity and sexual orientation. *Funct Neurol* , 24 (1), pp. 17-28.
194. Talmelli LF, Gratão AC, Kusumota L, Rodrigues RA.(2010) Functional independence level and cognitive deficit in elderly individuals with Alzheimer's disease. *Rev Esc Enferm USP.* Dec;44(4):933-9
195. Ten Kate M, Barkhof F, Boccardi M, et al. Clinical validity of medial temporal atrophy as a biomarker for Alzheimer's disease in the context of a structured 5-phase development framework. *Neurobiol Aging* 2017; 52: 167–82
196. Trompieri N., Fachine. B.R.A. O Processo de envelhecimento: As principais alterações que acontecem com o idoso ao passa dos anos (2012). Interscienceplace. Edição 20, volume 1, artigo nº 7, Março. D.O.I: <http://dx.doi.org/10.6020/1679-9844/2007> - pp 106 de 194
197. LI, Y. Overweight is associated with decreased cognitive functioning among school-age children and adolescents (2008). *Obesity*, 16, 1809-1815,

198. Utermann, G., Kindermann, I., Kaffarnik, H., & Steinmetz, A. (1984). Apolipoprotein E phenotypes and hyperlipidemia. *Hum Genet*, 65, pp.232-236.
199. Vasan RS, Larson MG, Leip EP, Kannel WB, Levy D. Assessment of frequency of progression to hypertension in non-hypertensive participants in the Framingham Heart Study: a cohort study. *Lancet* 2001;358:1682-86
200. Vasantharekha R, Priyanka HP, Swarnalingam T, Srinivasan AV, Thyaga Rajan S.(2016) Interrelationship between Mini-Mental State Examination scores and biochemical parameters in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease *Geriatr Gerontol Int.* Dec 6. doi: 10.1111/ggi.12957
201. Vicario A., Martinez C. D., Baretto D., Casale A. D., Nicolosi L. (2005). Hypertension and cognitive decline: impact on executive function. *J. Clin. Hypertens.* 7 598–604. 10.1111/j.1524-6175.2005.04498.x
202. Wang L, Larson EB, Bowen JD, van Belle G. Performance-based physical function and future dementia in older people. *Arch Intern Med.* 2006;166:1115–20
203. Wehr H, Bednarska-Makaruk M, Graban A, et al. Paraoxonase activity and dementia. *J Neurol Sci* 2009;283:107–8
204. Whitmer R.A., Gunderson E.P., Barrett-Connor E., Quesenberry C.P., Jr., Yaffe K. Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study(2005). *BMJ.*;330:1360
205. World Health Organization, and Alzheimer's Disease International. (2012). *Dementia: A Public Health Priority*. Geneva: World Health Organization (WHO).
206. WHO, S. G. (1996). *Research on the menopause in the 1990s*. World Health Organ Tech Rep Ser.
207. WHO. (2003). *World Health Statistical Information System (WHOSIS) according 2003 Database*. Acesso em 13 de Julho de 2010, disponível em <http://www.who.int/whosis/en/index.html>
208. Xu H., Wang R., Zhang Y.W., Zhang X. (2006). Estrogen, beta-amyloid metabolism/trafficking, and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1089:324-42.
209. Xu, H., Gouras, G., Greenfield, J., Vincent, B., Naslund, J., Mazzei, L., et al. (1998). Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer β -amyloid peptides. *Nature Med*, 4, pp. 447-451.
210. Xu, P. T., Gilbert, J. R., Qiu, H. L., Ervin, J., Rothrock-Christian, T. R., Hulette, C., et al. (1999). Specific regional transcription of apolipoprotein E in human brain neurons. *Am J Pathol*, 154, pp. 601-611.

10. ANEXO