

ANDREA LESSA BENEDET

**ASSOCIAÇÃO ENTRE ESTIMATIVAS DE ANCESTRALIDADE GENÔMICA E A
OCORRÊNCIA E SEVERIDADE DA DOENÇA DE ALZHEIMER.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção ao grau de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Otávio de Tolêdo Nóbrega

BRASÍLIA - DF

2011

*Para meu pai,
inspiração dos meus
objetivos, e minha mãe,
destino da minha
gratidão.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Gabriel e Anelise, por toda a dedicação e carinho e pelo entusiasmo com o qual me mostraram o prazer da busca constante pelo aprendizado; a eles, que me ensinaram os reais valores da vida.

Ao Armando, por ter sido um companheiro amoroso e ter me ajudado de forma carinhosa a amadurecer. Por toda a racionalidade e tranquilidade ao me guiar e me trazer paz nos momentos difíceis.

Ao meu irmão Gustavo, por me mostrar o quão maravilhosamente surpreendentes as pessoas podem ser.

Aos meus avós, Raimundo e Alzene, por serem exemplos de união, respeito, perseverança e força. Por serem quem são e pela grande família que construíram.

Aos meus familiares, por todo o apoio dado em todos estes anos, facilitando a passagem por árduas experiências.

A todos os meus amigos, por tornarem a minha vida mais alegre, em especial à Alinne, Kissia, Maralise, Mariana, Marluce, Rayanna e Tainá por estarem presentes em momentos decisivos.

Ao querido professor Dr. Antônio Sebben e ao Prof. Dr. Leandro Ambrósio, por toda paciência e extroversão que me iniciaram no meio acadêmico.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Otávio de Tolêdo Nóbrega, por ter aberto as portas para mim e por toda a orientação que me deu, principalmente nos momentos de aflição.

Aos colegas de equipe Alause, Clayton, Vinícius, Einstein, Larissa, Túlio, Prof. Dra. Janete e ao Prof. Dr. Rinaldo, por todo empenho e companheirismo que tornaram possível a realização dessa pesquisa.

A todos os meus colegas de laboratório, por todas as risadas que me proporcionaram e por terem feito do trabalho um momento de diversão. Agradeço especialmente à Ana, Bárbara, Betulia, Clarissa, Débora, Flávia, Felipe, Iara,

Jéssica, Luis Felipe, Nídia, Ramon, Shelly, Tailce e Virgílio por terem compartilhado conhecimento, almoços e bolos de aniversário.

Às estagiárias Adriane, Dayanne e Wilcelly, por toda disposição e seriedade na execução dos experimentos.

Aos amigos de profissão Carlos Alexandre e Fernando Santana, por terem me dado suporte e mostrado o “caminho das pedras”. Por serem simplesmente amigos verdadeiros.

A todos os professores pelos quais cruzei o caminho e pude tentar absorver o que eles tinham de melhor a oferecer.

A todos os pacientes e familiares, fonte e objetivo de nosso trabalho, que gentil e pacientemente aceitaram fazer parte dessa jornada.

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma demência que afeta milhões de pessoas no mundo todo. Entre os estudos que buscam desvendar a patofisiologia da DA, os principais são baseados em estudos de associação, realizados com amostra originada de uma única população, gerando dados que dificilmente podem ser extrapolados para a população em geral. Esse pode ser um viés que precisa ser considerado. Com o intuito de verificar se existem diferenças na prevalência de DA de acordo com as proporções genéticas de ancestralidade europeia, ameríndia e africana, uma amostra de indivíduos brasileiros foi genotipada para 12 marcadores informativos de ancestralidade. A amostra era composta por 120 pacientes com DA e 412 controles cognitivamente saudáveis. As proporções individuais de ancestralidade europeia, africana e ameríndia foram comparadas com o respectivo diagnóstico do paciente. As proporções de ancestralidade também foram correlacionadas aos valores referentes à diferença entre a pontuação final e inicial obtidas no Mini-exame do estado mental e no *Clinical Dementia Rating*. Os resultados demonstraram que uma grande proporção de ancestralidade ameríndia foi observada em pacientes sem DA ou associada a um menor declínio cognitivo em pacientes com DA. Tais resultados sugerem que a arquitetura alélica ameríndia possa conferir proteção ao desenvolvimento da DA, enquanto maiores proporções de ancestralidade europeia e africana seriam mais predisponentes ao desenvolvimento deste tipo de demência.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer. Ancestralidade genética. Marcadores de ancestralidade. Miscigenação. Doenças complexas.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a widespread dementia that affects millions of people. Among the studies aiming at the AD's pathophysiology, there are usually association studies that are restricted to samples originating from a single population, generating data usually hard to extrapolate to populations abroad. Dissembling genetic origins can be a bias that should be considered. Intending to ascertain if there are differences in AD prevalence according to levels of genetic heritage from parental populations (European, African and Amerindian), 120 AD patients and 412 cognitively healthy controls from the Brazilian highly admixed population were genotyped for 12 ancestry informative markers. Proportions of individual African, Amerindian and European ancestries were compared across the diagnostic status of subjects. These ancestry proportions were also correlated to the difference among final and initial scores of Mini-Mental State Examination and Clinical Dementia Rating. Our results showed that a higher Amerindian ancestry proportion was found among control subjects, and that less cognitive decline was observed among those AD patients with greater Amerindian content. Our results suggest that the Amerindian allelic architecture could confer protection against the onset of Alzheimer's disease, whereas African and European background could be comparatively more predisposing of this form of dementia.

Key-words: Alzheimer's disease. Dementia. Genetic ancestry. Ancestry markers. Admixture. Complex disease.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIM -	<i>Ancestry informative marker</i> (Marcador Informativo de Ancestralidade)
ALD -	<i>Admixture linkage disequilibrium</i> (Miscigenação por Desequilíbrio de Ligação)
ApoE -	Apolipoproteína E
APP -	<i>Amyloid precursor protein</i> (Proteína precursora amiloide)
A β -	Proteína beta amiloide
CA -	Circunferência Abdominal
CDR -	<i>Clinical Dementia Rating</i>
CDR1 -	CDR inicial
CDR2 -	CDR final
CLU -	Clusterina
CMI -	Centro de Medicina do Idoso
CR1 -	<i>Complement Receptor 1</i> (Receptor Complemento 1)
DA -	Doença de Alzheimer
DCL -	Demência por Corpos de Lewi
dCDR -	diferença entre CDR final e inicial
DF -	Distrito Federal
DFT -	Demência Fronto-Temporal
dMEEM -	diferença entre o MEEM final e inicial
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
DV -	Demência Vascular
ENF -	Emaranhados neurofibrilares
EUA -	Estados Unidos da América
FM -	Faculdade de Medicina
HIV -	Vírus da Imunodeficiência Humana
HUB -	Hospital da Universidade de Brasília

HUCB -	Hospital da Universidade Católica de Brasília
LD -	<i>Linkage disequilibrium</i> (Desequilíbrio de Ligação)
MALD -	<i>Mapping by admixture linkage disequilibrium</i>
MEEM -	Mini Exame do Estado Mental
MEEM1 -	MEEM inicial
MEEM2 -	MEEM final
PA -	Proteína amiloide
PAD -	Pressão arterial diastólica
PAS -	Pressão arterial sistólica
PCR -	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da Polimerase)
Picalm -	<i>Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein</i>
PS1 -	Pré-senilina 1
PS2 -	Pré-senilina 2
RA -	Regiões Administrativas
SNP -	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Polimorfismo de base única)
T4 -	Tiroxina
TSH -	Hormônio Tireotrófico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO ENVELHECIMENTO	10
1.2 DOENÇA DE ALZHEIMER	11
1.3 ESTUDOS POPULACIONAIS E DOENÇA DE ALZHEIMER	15
1.4 ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO E MISCIGENAÇÃO	16
1.5 ESTIMATIVA DE ANCESTRALIDADE INDIVIDUAL	17
1.6 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E MALD	18
1.7 ESTUDO POPULACIONAL BRASILEIRO	19
1.8 ESTUDO DA POPULAÇÃO DO DISTRITO FEDERAL.....	20
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 AMOSTRA	23
3.2 COLETA DE DADOS	23
3.3 SELEÇÃO DE MARCADORES E GENOTIPAGEM	24
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
3.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	27
4. RESULTADOS	28
5. DISCUSSÃO	31
5.1 COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DIAGNÓSTICOS	31
5.2 ANÁLISE DA CONTRIBUIÇÃO ANCESTRAL.....	32
5.3 SELEÇÃO DA AMOSTRA	33
5.4 ESTIMATIVA DE ANCESTRALIDADE.....	33
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5.6 CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS	35
6. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
APÊNDICE	49

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO ENVELHECIMENTO

Estudos sobre desenvolvimento populacional vêm demonstrando uma grande redução da taxa de natalidade em países de alta e média renda desde o final do século XX. O resultado desse comportamento populacional, aliado ao gradativo aumento da expectativa de vida, é o crescente número de pessoas com 60 anos ou mais. Nos Estados Unidos da América (EUA) a expectativa é de que em 30 anos, a contar do ano 2000, a população maior de 65 anos aumente 7,2%, passando a ser de 71 milhões em 2030 (CASTELLANI, 2010). Segundo dados do *Centro Latino Americano y Caribeño de Demografía*, a população de latino-americanos com mais de 65 anos, corresponde a mais de 39 milhões de pessoas, e as previsões pra 2030 indicam um aumento de mais de 100%, passando esta quantidade a ser de 82 milhões. O Brasil têm acompanhado o perfil demográfico de países de alta renda, tendo uma população superior a 14 milhões de pessoas com 65 anos ou mais, o que corresponde a aproximadamente 8% da população total do país (IBGE, 2010), e estima-se que em 2030 essa mesma população corresponda a aproximadamente 13% do contingente total (IBGE, 2008). As expectativas globais são de que em 2030 a população idosa chegue a 973 milhões, mais de 130% além do que era em 2000 (CASTELANI, 2010).

É de conhecimento geral que o avançar da idade traz consigo diversas manifestações fisiológicas resultantes da degeneração tecidual, que por vezes proporciona o surgimento de enfermidades crônicas como câncer, artrite, aterosclerose, hipertensão, enfisemas, doenças neurodegenerativas, entre outras, as quais comprometem a saúde e a qualidade de vida do idoso (ROE, 1984; LIMA-COSTA, 2003). Dados da PNAD – IBGE de 2008 mostram que quase 80% da população brasileira com 65 anos ou mais relata possuir pelo menos uma doença crônica. Dentre as doenças crônicas em idosos, as demências são as que apresentam maior prevalência em vários países do mundo, conforme revisão feita por Lopes e Bottino (2002) e estima-se que existam 36 milhões de pessoas com demência no mundo (WORLD ALZHEIMER REPORT, 2011).

Demência pode ser definida como síndrome caracterizada por declínio de memória associado ao déficit irreversível de pelo menos uma função cognitiva

(linguagem, gnosias, praxias ou funções executivas) com intensidade suficiente para interferir no desempenho social ou laboral do indivíduo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000). Vários são os tipos de demências, dentre as quais se destacam doença de Alzheimer (DA), demência frontotemporal (DFT), demência vascular (DV) e demência por corpos de Lewi (DCL).

Pesquisas epidemiológicas têm relatado uma prevalência da DA com relação às demais demências em pessoas com 65 anos ou mais, nos diversos países do mundo (NITRINI, 2009; BOWIRAT, 2002; LOPES;BOTTINO, 2002).Vale ressaltar que a incidência da DA aumenta a partir de 65 anos de idade, sendo duplicada a cada intervalo de dez anos (HERBERT, 1995).

1.2 DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA foi relatada pela primeira vez em 1906 por Alois Alzheimer, médico que descreveu o caso de uma paciente chamada de August D., de 51 anos. Os sintomas observados por Alzheimer foram: dificuldades de compreensão, memória reduzida, afasia, desorientação, paranoia, alucinação auditiva e debilidade psico-social. Após 4 anos da observação da doença, August D. veio a óbito. Com a observação histológica cerebral, Alzheimer relatou presença de emaranhados neurofibrilares e placas amiloides. Àquele momento, Alzheimer chamou a doença de pré-senil, à qual poucos anos depois o psiquiatra Emil Kraepelin deu o epônimo de doença de Alzheimer (MAURER, 1997).

A doença de Alzheimer é neurodegenerativa, progressiva e irreversível e, como provável resultado das alterações histopatológicas, há uma perda gradativa da memória recente e prejuízo de alguma outra função cognitiva, sendo o agravo da falta de memória um dos primeiros sinais da doença. Essa demência é categorizada nos estágios leve, moderado e grave, os quais são sempre progressivos e refletem o grau de comprometimento cognitivo. Além disso, com o avançar do tempo e estudo de novos casos, a DA passou a ser classificada também de acordo com a época de início da doença, ou seja, DA de início precoce (antes dos 65 anos) ou de início tardio, embora pela descrição inicial essa classificação nunca tenha existido (CASTELANI, 2010). Nos casos precoces, é frequente a observação de manifestações da doença em parentes próximos, sendo nessa situação também chamada de DA familiar (BIRD, 2010).

Os sintomas iniciais da DA podem ter poucas variações dependendo da região cerebral que está sendo afetada, uma vez que não há um padrão de evolução neuropatológico. Porém, de maneira geral, as capacidades mentais gradualmente diminuem e as mudanças de personalidade aparecem, seguindo então por uma deterioração das funções da linguagem (afasia), da visão e da associação das funções sensório-motoras (apraxia e agnosia) (CASTELLANI, 2010; BRAAK, 1999). Embora a velocidade de decaimento e a duração da doença sejam variáveis, tais manifestações terminam por alterar o desempenho das atividades diárias, o que invariavelmente submete o paciente a um estado de dependência essencial e constante de um cuidador. Com o avançar da doença alguns sintomas como depressão, alucinação, agitação e perda de peso podem estar associados. Além destes, na fase terminal podem ocorrer convulsões, bem como outras anormalidades neurológicas e aumento de tônus muscular, mioclonias ou distúrbio da marcha (MCKHANN, 1984; GALLUCCI, 2005).

O diagnóstico da DA é complexo, inespecífico e dificilmente é feito no estágio inicial da doença. É baseado no estudo da vida pregressa do paciente, em exames laboratoriais e de imagem e em manifestações clínicas excludentes das demais demências. Primeiramente é determinado clinicamente a presença de demência através de testes de rastreio que indiquem perda cognitiva, como o Mini Exame de Estado Mental (MEEM), o Teste do Relógio e testes de fluência verbal (CARAMELLI, 2003; NITRINI, 2005). Estes testes apontam quais funções neurais estão sendo mais afetadas e normalmente seguem os critérios da DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - Fourth Edition*) para detecção de demências. Além dos testes cognitivos de rastreio, a avaliação das atividades diárias também deve ser feita, uma vez que durante a evolução do quadro demencial as atividades instrumentais, como cozinhar e dirigir, são prejudicadas antes das atividades básicas, como higiene pessoal (CARAMELLI, 2003). À respeito dos testes de rastreio, vale salientar que estes podem sofrer influência de aspectos sócio-culturais e dessa forma a experiência e sensibilidade do profissional que faz uso dos mesmos é de extrema importância para o diagnóstico correto.

Depois de determinada a presença de demência, a indicação de DA geralmente ocorre mediante o uso de critérios diagnósticos que seguem o protocolo do *National Institute of Neurological Disorders and Stroke- Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS – ADRDA). Para tanto, exames laboratoriais

e de imagem são úteis para corroborar ou descartar a presença de algumas doenças. Com base nas informações fornecidas pelos exames fisiológicos e pelos testes cognitivos e seguindo os critérios do NINCDS – ADLDA, os possíveis diagnósticos são: DA possível, DA provável e DA definitiva. O diagnóstico de DA definitiva pode ser dado apenas mediante necropsia, pois é necessário que haja congruência entre os dados do estudo histopatológico e do diagnóstico clínico (CUMMINGS, 2004).

Na doença de Alzheimer, do ponto de vista histopatológico, observa-se uma atrofia cortical difusa, resultante da perda neuronal e um aumento dos sulcos e ventrículos (DINIZ, 2001). Além disso, há principalmente uma combinação da presença de placas amiloides ou senis (PA) e dos emaranhados neurofibrilares (ENF) (NELSON, 2009; BRAAK, 1999; CASTELLANI, 2009; SMITH, 1999; GALIMBERTI, 2010). As PAs são mais específicas da DA, enquanto que os ENF parecem ter um papel maior na indução de neurodegeneração (NELSON, 2009).

Placas amiloides são deposições neurais extracelulares de um peptídeo de 40 ou 42 aminoácidos chamado peptídeo β -amiloide ($A\beta$), o qual é um produto metabólico natural da clivagem de uma proteína de membrana chamada Proteína Precursora Amiloide (*Amyloid precursor protein* - APP) por uma enzima, a β -secretase (CASTELLANI, 2008; COLE, 2007; THINAKARAN, 2008). Vários estudos propuseram ser esse acúmulo específico de proteínas o gerador dos sintomas da DA, porém um estudo mais recente sugeriu ser o contrário, ou seja, o acúmulo das placas seriam resultados da manifestação da doença (CASTELLANI, 2009)

ENF são caracterizados por um acúmulo neuronal intracelular anormal da proteína tau. A proteína tau, em células normais, é responsável por estabilizar microtúbulos, os quais estão envolvidos no transporte de substâncias entre os compartimentos celulares (BRAAK, 1999; GALIMBERTI, 2010). Apesar de não se ter entendimento preciso de seu processo metabólico, há casos em que a proteína tau é hiperfosforilada, acumulando-se nas células e funcionando de maneira anormal, o que causa desestabilização dos microtúbulos e obstrução do transporte axonal. Todo esse processo provavelmente ocasiona um mal funcionamento sináptico, um metabolismo proteico inapropriado, que deve culminar na morte dos neurônios por declínio de suas funções (BRAAK, 1999).

A DA é uma doença complexa devido ao grande número de variáveis que influenciam na sua ocorrência e desenvolvimento. Além de causas ambientais que

podem ter influência na sua manifestação, como nível de escolaridade, nutrição, contaminação viral, etc., (ALMKVIST, 1999; CASTELLANI, 2010; MCKEE, 2009) as causas genéticas também compõem uma parcela grande de contribuição. Inúmeros estudos de associação têm sido realizados com o intuito de desvendar a causa genética que desencadeia o processo degenerativo, e como resultado, alguns genes já foram e/ou estão sendo descritos. Contudo, todos os genes encontrados são tratados como coadjuvantes, potencializadores ou predisponentes, nenhum efetivamente causador. Dentre os mais conhecidos, os genes da APP e pré-senilina 1 e 2 (PS1 e PS2) têm revelado maior influência no surgimento precoce da DA familiar, enquanto os genes da ApoE e os recém descobertos Picalm, CLU e CR1 possuem maior relação com os casos tardios da DA (BIRD, 2010; RAUX, 2005; AVRAMOPOULOS, 2009; ROGAEVA, 2007).

O gene da APP foi inicialmente estudado em portadores da Síndrome de Down, pois constatou-se que os mesmos apresentavam sinais típicos de DA, então desconfiou-se que o fato do cromossomo 21 estar em maior quantidade seria um indicativo de que a DA poderia ter um gene causal nesse local (GALIMBERTI, 2010). A partir desse achado observou-se que uma maior expressão de determinada variante desse gene estaria relacionada à deposição das proteínas amiloides no cérebro. Como já mencionado, a APP é uma proteína de membrana e uma de suas formas de clivagem gera a proteína A β que é encontrada em acúmulo no cérebro de pacientes com DA (THINAKARAN, 2008; CASTELLANI, 2008; HAASS, 2007).

Também relacionados com a DA precoce, os genes PS1 e PS2 codificam proteínas de membrana as quais, quando mutadas, são responsáveis por aumentar a concentração extracelular da proteína A β . Estima-se que 18 a 55% dos casos familiares de DA precoce são ocasionados por alterações desses genes (CHANG-SOOK, 1999; ZEKANOWSKY, 2003).

A apolipoproteína E é uma proteína plasmática transportadora de lipídios e seu gene encontra-se no cromossomo 19. Esse gene possui três variantes principais, das quais o alelo E4 é observado com maior frequência em pacientes que desenvolvem DA de início tardio (BERTRAM, 2008; CORDER, 1993; MORRIS, 2010). Acredita-se que a afinidade física existente entre a ApoE e a proteína A β desempenha uma papel importante na patogênese da DA e também que a formação das placas senis é dependente da dosagem de ApoE (MORRIS, 2010; KIM, 2009; BERTRAM, 2008; CORDER, 1993).

Além da ApoE, três genes há pouco descobertos, CLU, CR1 e PICALM, também merecem destaque uma vez que houve uma significativa evidência de que haja associação destes com a doença de Alzheimer (MORAES, 2011; HAROLD, 2009; LAMBERT, 2009). O gene CLU é codante de uma apolipoproteína cerebral chamada Clusterina ou ApoJ (JENNE, 1992) que, assim como a ApoE, está presente nas placas amiloides (MCGEER, 1992; HAROLD, 2009). Além disso a Clusterina (JENNE, 1992) demonstra aumentar a toxicidade da proteína A β in vivo (DEMATTOS, 2002). Picalm é o nome dado ao gene que codifica uma proteína relacionada à endocitose, o que é essencial para o transporte de substâncias celulares, inclusive neurotransmissores na sinapse (YAO, 2005; HAROLD, 2009). Sendo assim, há a possibilidade de que alterações na função desse gene venha a resultar em perturbações no funcionamento da sinapse, aumentando o risco de desenvolvimento de DA (MORAES, 2011; HAROLD, 2009). E por fim, o gene CR1 é relacionado à produção de uma proteína receptora do sistema complemento, porém sua relação com a DA ainda é desconhecida (LAMBERT, 2009).

1.3 ESTUDOS POPULACIONAIS E DOENÇA DE ALZHEIMER

Diferenças culturais, educacionais ou socioeconômicas parecem contribuir para as diferenças na prevalência de demência entre populações (FROEHLICH, 2001). Tratando-se especificamente da doença de Alzheimer, estudos epidemiológicos poucas vezes relatam diferenças de incidência ou prevalência entre populações, e quando o fazem geralmente não investigam as reais causas das diferenças encontradas, deixando apenas questionamentos e especulações à respeito.

Dentre os estudos que identificaram diferenças étnicas com relação à DA, Miller e colaboradores observaram que afro-americanos e latinos apresentaram uma sobrevivência maior que os americanos brancos. Esses achados não foram explicados por idade, gênero, nível educacional, estado civil, situação de vida e score cognitivo (METHA, 2008) deixando em aberto a possibilidade de que fatores ambientais e genéticos tenham alguma influência nesse fenótipo.

Além dessas, pesquisas relacionadas à ApoE verificaram que seus alelos e2, e3 e e4 são fatores de risco variáveis nas diferentes etnias (VENKETASUBRAMANIAN, 2010). O alelo e4 é um conhecido fator de risco para o

desenvolvimento da DA em caucasianos e hispânicos, sendo o risco diminuído em afro-americanos e nulo em nigerianos. Além disso, o alelo e2 parece ser minimamente protetivo em caucasianos e ser indiferente ou mais predisponente em afro-americanos (VENKETASUBRAMANIAN, 2010; TANG, 1996; MURREL, 2006; OGUNNIYI, 2000). Ainda assim não é claro se a diferença encontrada é decorrente de variações metodológicas ou ambientais.

O único trabalho encontrado que utilizou marcadores genéticos de ancestralidade foi feito por Schlesinger (2011), onde procurou-se determinar se haveria alguma relação entre a ancestralidade africana determinada geneticamente e alterações neuropatológicas associadas à demência. Como resultado o grupo sugeriu que a ancestralidade africana confere proteção para a neuropatologia da DA ao reduzir o acúmulo de b-amiloide quando comparada à ancestralidade europeia.

Tais dados nos indicam que provavelmente existam variações étnicas que influenciam no surgimento e desenvolvimento da DA, porém resta investigar se essa variação da incidência da DA é decorrente da influência ambiental e/ou da expressão gênica, as quais são variáveis entre populações distintas.

1.4 ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO E MISCIGENAÇÃO

Como dito anteriormente, as principais pesquisas genéticas sobre a doença de Alzheimer são baseadas em estudos de associação, no qual um gene suspeito e que esteja em maior frequência entre os pacientes com DA passa a ser considerado um possível fator causal. Estudos de caso-controle podem ser uma estratégia eficiente na busca por genes causais em doenças complexas. Entretanto, sabe-se que frequências diferentes entre as amostras nem sempre são relacionadas à genética de determinado fenótipo e sim são provenientes de estratificações populacionais (TIAN, 2006; CHOULDRY, 2006; ENOCH, 2006) pois, se um subgrupo tiver alta prevalência de determinada doença, então esse grupo será super representado entre os casos se comparado com os controles. E ainda, se qualquer alelo estiver mais frequente nesse subgrupo este será erroneamente associado a essa doença (CHOULDRY, 2006).

Essas associações espúrias são quase sempre decorrentes da estrutura genética da população em estudo e muitas vezes não podem ser avaliadas ou sequer percebidas apenas por informações fornecidas pelos objetos de estudo

(TIAN, 2006). Esse erro é bem marcante quando populações miscigenadas compõem a amostra, como em estudos com as populações da América Central e do Sul.

Quando populações de origens distintas são estudadas, uma grande diferença na frequência alélica dessa amostra pode gerar um grande fator de confusão (KOSOY, 2008). Estimativas de ancestralidade individual tornam-se uma estratégia eficiente para tentar minimizar esse efeito pois permitem conhecer a estrutura genética da população estudada.

1.5 ESTIMATIVA DE ANCESTRALIDADE INDIVIDUAL

A estrutura genética de uma população é uma reflexão dos eventos demográficos e evolutivos ocorridos num dado local, como por exemplo migrações, miscigenações, entre outros, e traz consigo marcas dessa história de deriva genética e de seleção natural (PASHOU, 2007). Essa estrutura genética pode ser estimada com base no entendimento da distribuição da diversidade humana em diferentes populações (ROYAL, 2010).

A estimativa de ancestralidade pode ser feita através do uso de marcadores haplotípicos, encontrados no DNA mitocondrial ou no cromossomo Y, ou pode ser adquirida com o uso de marcadores de cromossomos autossômicos (ROYAL, 2010). Os marcadores autossômicos são muitas vezes polimorfismos de base única (SNPs) bi-alélicos, mas podem também ser polimorfismos do tipo inserção-deleção (LONG, 2004). Independente da classe do marcador, todos devem possuir frequências alélicas significativamente diferentes entre grupos populacionais distintos para serem considerados marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) (SHRIVER, 1997; KERSBERGEN, 2009).

Os AIMs oferecem um alto poder de inferência individual da proporção de miscigenação (HOGGART, 2003) quando comparados a um grupo randômico de marcadores autossômicos (ROYAL, 2010) e podem ser utilizados como ferramentas de controle para minimizar o efeito de estratificação populacional em estudos de associação ou no estudo de genes candidatos, quer seja entre populações de continentes diferentes ou em populações miscigenadas (NASSIR, 2009; PASHOU, 2007; HOGGART, 2003; MCKEIGUE, 2000). A estimativa de ancestralidade individual também nos permite avaliar a influência das variações étnicas no

desenvolvimento de doenças, bem como auxiliar em estudos que buscam identificar se um determinado fenótipo tem maior influência genética ou ambiental (MCKEIGUE, 2000).

1.6 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E MALD

A estimativa de ancestralidade individual pode nos fornecer indícios do quanto a herança genética de uma dada população interfere no desenvolvimento de doenças. Essa informação é de grande valia em estudos que visam mapear doenças através do desequilíbrio de ligação que ocorre entre genes. Tais estudos, denominados em inglês como *mapping by admixture linkage disequilibrium* (MALD), se baseiam na premissa de que quando duas populações se misturam, um desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium* - LD) é formado inicialmente entre todos os loci gênicos que possuem grandes diferenças de frequências alélicas entre as populações parentais (SELDIN, 2002), o que é conhecido como desequilíbrio de ligação por miscigenação (*admixture linkage disequilibrium* – ALD) (SMITH, 2005).

LD é o nome dado a um arranjo não randômico que ocorre entre alelos próximos de um dado *locus* (REICH, 2001; LYNN, 1995) resultando na formação de blocos gênicos, os haplótipos (WEISS, 2002), os quais possuem vários polimorfismos que tendem a não se segregar ao longo das gerações. Sendo assim, podemos utilizar esse recurso ao procurar por genes influentes em dada característica, uma vez que os vários polimorfismos de um haplótipo podem ser representados por apenas um deles, o que reduz a complexidade e os custos das pesquisas na área (WEISS, 2002). Além disso, é viável utilizar esse princípio de maneira inversa, ou seja, uma vez encontrada uma associação entre um alelo e determinado fenótipo, é possível verificar quais outros sítios polimórficos encontram-se associados a este alelo por LD, e assim encontrar uma associação entre outra(s) variante(s) do haplótipo que seja(m) verdadeiramente causal(is) do fenótipo de interesse.

Portanto, MALD é uma ferramenta que permite a localização de alelos causais através da busca por haplótipos que possuam diferenças substanciais entre grupos étnicos, o que ocorre em doenças que possuem incidência variável entre populações. Um dos passos que deve ser seguido durante o desenvolvimento dessa abordagem é a investigação das diferenças populacionais entre casos e controles

através do uso de AIMS, seguido de um acesso individual ao genoma em busca de regiões cromossômicas comuns na população parental que tenha maior incidência da doença e finalmente, a procura do alelo causal dentro dos haplótipos encontrados através de estudos de associação, baseados em polimorfismos presentes em alta densidade (MCKEIGUE, 1998; REICH, 2004; O'BRIEN, 2005). O esperado é que, se uma população parental possuir maior predisposição genética a uma dada doença, então a frequência de seus alelos será maior nos indivíduos afetados do que nos não afetados e assim esta técnica será capaz de identificar o causador do fenótipo (MCKEIGUE, 1998).

Essa metodologia também é favorecida em casos de doenças multifatoriais com incidências similares nas populações parentais, nas quais as frequências gênicas dos fatores causais sejam compensadas por influências socioeconômicas e/ou ambientais (O'BRIEN, 2005). Esse pode ser o caso da demência de Alzheimer.

1.7 ESTUDO POPULACIONAL BRASILEIRO

No início da colonização Brasil, nossos descobridores portugueses entraram em contato com nativos indígenas que aqui habitavam. Logo esta população foi feita escrava para que a exploração de recursos naturais pudesse ser realizada. Nesse processo houve a primeira mistura de etnias, formando o que Darcy Ribeiro (1995) cita em seu livro como mamelucos.

Anos depois, com o cultivo da cana-de-açúcar e a produção de engenhos, a mão de obra passou a ficar escassa. A partir desse momento, negros foram trazidos da África, mais precisamente da costa ocidental, para servirem de escravos (RIBEIRO, 2005). Entre tantos abusos sofridos pelos escravos, um deles foi a exploração sexual das mulheres pelos seus Senhores de Engenho. Como resultado desse hábito, originaram-se os mulatos; houve também uma mistura entre os povos indígenas e os africanos, deixando como descendentes os curibocas (RIBEIRO, 2005)..

Por último vieram os imigrantes, em sua maioria fugidos de guerras em seus países de origem, que formaram colônias agrícolas principalmente na região sul do Brasil. Esses imigrantes eram formados por italianos, espanhóis, alemães e japoneses (RIBEIRO, 2005).

Com o passar dos tempos, o encontro dos vários povos propiciou a formação de uma população tão miscigenada como jamais vista, onde já não era possível distinguir visualmente a ascendência de cada indivíduo. Confirmando essa afirmação, estudo recente demonstrou não haver correlação entre autodenominação de cor da pele e a ancestralidade genômica de cada indivíduo (LEITE, 2011). Além desse, outros estudos reafirmaram o que conta a história e com o uso de marcadores de DNA mitocondrial (o qual só é transmitido pela mãe) verificaram que brancos brasileiros possuem grande contribuição matrilinear ameríndia e africana, enquanto a linhagem paterna (estudada com marcadores do cromossomo Y) possui maior contribuição portuguesa (ALVES-SILVA, 2000). Lins e colaboradores também estudaram o perfil genético da população brasileira com o uso de AIMS, e encontraram a seguinte composição: 77% ancestralidade europeia, 14% africana e 8% ameríndia (LINS, 2009).

Diante de tais considerações compreendemos a importância de não negligenciar o fato de que populações miscigenadas possuem grande diversidade genômica, o que impede que a população seja considerada geneticamente homogênea e requerendo uma atenção especial na realização de estudos de associação.

1.8 ESTUDO DA POPULAÇÃO DO DISTRITO FEDERAL

O Distrito Federal (DF) é uma unidade federativa composta por 30 regiões administrativas, também chamadas de cidades satélites, e é Brasília a sua capital. Possui atualmente mais de 2,5 milhões de habitantes, dos quais 36% possuem entre 20 e 40 anos e apenas 7,9% são idosos com mais de 60 anos (PNAD, 2009). Devido a atipicidade da formação da capital nacional, mais de 50% da população residente no DF não é natural desse local (PNAD, 2010).

Com a intenção de transferir a capital do Brasil para o centro do território nacional, Brasília teve sua construção iniciada na década de 50 e contou com o trabalho de mais de 30 mil operários vindos de todas as regiões do país. Em 1960 a capital foi inaugurada, já possuindo 150 mil habitantes, entre os quais servidores públicos e operários (LIRA, 2011). A partir daí, o fluxo migratório foi o principal fator consolidador da nova capital até a década de 80, quando o fluxo reduziu-se e desviou-se para as cidades do entorno do DF (FARIAS, 2008).

Esses acontecimentos explicam parcialmente o fato de mais da metade da população do DF ser de outros estados brasileiros e nos indica que a maioria dos idosos hoje residentes na capital são provenientes de outras regiões do Brasil.

2. OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho são:

- Analisar, por meio de marcadores genômicos de ancestralidade, o padrão de ancestralidade genética de uma amostra populacional do Distrito Federal (DF – Brasil), e verificar se esse padrão difere entre pessoas com e sem a doença de Alzheimer.

- Avaliar indicadores de evolução cognitiva obtidos dos indivíduos diagnosticados com a demência de Alzheimer conforme as estimativas de ancestralidade europeia, ameríndia e africana observadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRA

O presente estudo representa uma análise transversal de dados de uma coorte aberta de avaliação do perfil cognitivo de uma amostra populacional de Brasília – DF. A pesquisa foi realizada no Centro de Medicina do Idoso (CMI) do Hospital Universitário da Universidade de Brasília (HUB) e no Hospital Universitário da Universidade Católica de Brasília (HUCB), tendo início em 2009 e término em 2011.

Para participar do estudo, cada voluntário, ou cuidador responsável, assinou o termo de consentimento aprovado por comissão de ética competente. Além disso, todos participantes deveriam ter 60 anos ou mais e comparecer em todos os atendimentos clínicos. Foram excluídos os pacientes diagnosticados com alguma demência diferente da doença de Alzheimer.

Foram acompanhados 630 pacientes, dos quais 120 foram diagnosticados com DA, 412 foram considerados pacientes controles por serem cognitivamente saudáveis e os 98 restantes foram excluídos.

3.2 COLETA DE DADOS

Os atendimentos foram realizados por equipe multidisciplinar formada por membros do corpo clínico do HUB e do HUCB assim como profissionais com formação laboratorial. Todos os pacientes foram submetidos a uma versão brasileira validada do Mini-exame do estado mental (MEEM) em pelo menos dois momentos da pesquisa, ao ingressar (MEEM1) e ao final (MEEM2) do acompanhamento. O diagnóstico de provável ou possível DA foi feito seguindo os critérios do NINCDS/ADRDA com base na consulta com o paciente e em seus registros médicos. O grau de comprometimento cognitivo dos pacientes com DA foi determinado também por meio da escala de estadiamento das demências (CDR), sendo este realizado também em dois momentos (CDR1 e CDR2), da mesma forma como foi com o MEEM. Assim sendo, a diferença entre os valores finais e iniciais do MEEM (dMEEM) e do CDR (dCDR) foram utilizados nas análises estatísticas.

Dados adicionais como idade (anos), gênero, circunferência abdominal (CA; cm), genótipo da ApoE, pressão arterial sistólica (PAS; mmHg) e pressão arterial diastólica (PAD; mmHg) também foram obtidos. Para análises laboratoriais, Foi realizada punção venosa utilizando o sistema vacutainer com EDTA e a partir do sangue total foi feita a extração de DNA genômico através de kits comerciais padronizados (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Brasil).

3.3 SELEÇÃO DE MARCADORES E GENOTIPAGEM

Para estimar a ancestralidade genômica, foram utilizados 11 SNPs informativos de ancestralidade e um marcador tipo inserção/deleção, todos selecionados da literatura e testados na população brasileira (GENTIL, 2007; GENTIL, 2009; MORENO-LIMA, 2007) . Além disso, todos possuem diferenças de frequência (delta) maior que 0,7 para os três eixos (africanos x europeus, europeus x ameríndios e ameríndios x africanos), conforme consta na tabela 1.

Tabela 1: Descrição dos AIMs: seus alelos, posições cromossômicas e frequências nas populações parentais (europeia (EUR), africana (AFR) and ameríndia (AMR)).

Locus	Posição		Frequências		
	Cromossômica	Alelos	EUR	AFR	AMR
rs730570	14q32	A	0.860	0.185	0.100
rs3796384	3p14	C	0.154	0.783	0.875
rs803733	9q33	C	0.880	0.015	0.411
rs1426654	15q21	C	0.000	0.980	0.950
rs734780	15q26	C	0.070	0.710	0.854
rs2814778	1q23	C	0.998	0.001	1.000
rs1129038	15q13	C	0.224	0.995	0.983
rs1240709	1p36.3	A	0.794	0.036	0.103
rs2278354	5p15.2	G	0.120	0.704	0.839
rs2065160	1q32	C	0,078	0.512	0.850
rs4305737	6q24	A	0.250	0.929	1.000
rs3138521	1q25	Inserção	0.282	0.858	0.061

Fonte: Shriver (2003); Smith (2004).

Para genotipagem dos SNPs foi utilizada uma técnica baseada na extensão de uma única base que permite a amplificação simultânea de vários fragmentos por PCR, seguido da análise de eletroferogramas.

Para a amplificação em multiplex por meio de PCR foi utilizado o Qiagen Multiplex PCR kit (Qiagen, Brasil). Os iniciadores foram arranjados em 2 grupos como apresentado na tabela 2. A termociclagem foi feita no Applied Biosystems® Veriti™ Dx Thermal Cycler (Applied Biosystems, US) com temperatura de desnaturação de 95°C por 15 minutos, seguido por 39 ciclos a 94°C por 30 segundos, 57°C por 90 segundos e 72°C por 1 minuto, concluindo o programa em 10 minutos de extensão a 72°C.

Após a amplificação os produtos passaram por um processo purificação para que o excesso de iniciadores e desoxirribonucleotídeos fossem degradados. Para tanto foi adicionada a 3µL do produto de PCR, uma mistura com 1 U EXO I, 1 U de CIAP e tampão CIAP (1X). Esse conteúdo foi incubado durante 60 minutos a 37°C seguido de 15 minutos a 75°C.

Para o minisequenciamento, cada multiplex foi genotipado através de uma reação de extensão de única base usando o SNaPshot™ Multiplex System (Applied Biosystems), com a reação em volume final de 5,0 µL e iniciadores nas concentrações disponibilizadas na tabela 2. A termociclagem foi feita com alteração no protocolo sugerido pelo fabricante, sendo 2 minutos de desnaturação a 96°C, seguido de 30 ciclos de 96°C por 10 segundos, anelamento a 58°C durante 10 segundos e extensão a 60°C durante 20 segundos.

Para concluir o processamento das amostras foi realizada uma segunda purificação para remoção dos grupos fosforil das extremidades 5' dos dNTPs fluorescentes. Esta foi feita com a adição de 1U de CIAP e de tampão CIAP 1X a 5 µL do produto da reação anterior, sendo então incubada durante 60 minutos a 37°C seguida por 15 minutos a 85°C.

Para realização da eletroforese, uma mistura com 1 µL do amplicon final, 8,83 µL de formamida Hi-Di e 0,17 µL de Liz120 Size Standard (Applied Biosystems) foi inserida no seqüenciador automático ABI PRISM® 3130XL (Applied Biosystems), sendo ABI 3700 POP 7 o polímero utilizado. As análises foram feitas com o programa GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems).

O marcador do tipo inserção-deleção foi genotipado através de uma reação de PCR com volume total de 10 µL como segue: tampão Taq polimerase 1X, 0,25 mM dNTP, 0,16 mg/µL BSA, 1,5 µM MgCl₂, 1 U Taq polimerase e 10-40 ng DNA. Para termociclagem as amostras foram submetidas a 5 min a 95°C, seguidas por 29

ciclos de 95°C por 1min, 54°C por 1min e 72°C por 1 min, e finalmente 72°C por 20 min para extensão final. Genótipos foram visualizados com eletroforese em gel de agarose a 2%.

A genotipagem da ApoE foi realizada usando PCR baseada no sistema multiplex refratário a mutação (adaptado de DONOHOE, et al. 1999) seguido por eletroforese em gel de agarose a 1,6%.

Tabela 2: Concentração dos primers utilizadas no PCR e nas reações de extensão de única-base (SNapShot) para genotipagem dos AIMS e seus respectivos grupos de multiplex.

Primers	[] PCR (μ M)	[] SNapShot (μ M)	Grupo Multiplex
rs730570	0.2	0.55	1
rs3796384	0.2	0.7	1
rs803733	0.4	0.8	1
rs1426654	0.2	0.4	1
rs734780	0.3	0.8	1
rs2814778	0.2	0.7	2
rs1129038	0.2	0.8	2
rs1240709	0.2	0.55	2
rs2278354	0.2	0.55	2
rs2065160	0.2	0.55	2
rs4305737	0.2	0.65	2
rs3138521	0.5	-	-

Fonte: a autora; Pedrosa (2006).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com os genótipos obtidos para os AIMS e utilizando frequências alélicas em populações parentais (africanas (AFR), europeias (EUR) e ameríndias (AMR)) (tabela 1), as proporções individuais de ancestralidade foram estimadas com método de máxima verossimilhança através do programa IAE3CI (TSAI, 2005).

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi realizado para verificar a normalidade da distribuição dos dados obtidos nas diversas variáveis. Para averiguar a homogeneidade entre grupos diagnósticos, o teste de qui-quadrado foi utilizado para

comparar frequências (gênero e ApoE) enquanto o teste de Mann-Whitney, para comparar médias das demais variáveis.

Para analisar as possíveis diferenças nas proporções ancestrais entre pacientes com e sem DA, foi executado o teste de Mann-Whitney. Entretanto, para investigar possíveis relações entre gravidade do declínio cognitivo dos pacientes com DA e suas proporções de ancestralidade, foi utilizado o teste ANCOVA. Nele, as médias do MEEM, ou CDR, foram comparadas entre quartis de cada grupo ancestral, excluindo possíveis interferências da presença do alelo e4 da ApoE e do estágio inicial do MEEM. Para ancestralidade ameríndia, a qual não obteve distribuição normal, foi utilizado o teste de correlação de Spearman para que fosse feita análise similar à ANCOVA. Além disso, o teste de correlação de Pearson foi realizado para as ancestralidades europeia e Africana, para que fosse possível uma comparação com o teste de Spearman.

Para todos os testes, foi considerado significativo p-valor < 0,05. Os cálculos estatísticos foram realizados no programa SPSS, versão 19 (SPSS Inc., Chicago, IL).

3.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os procedimentos propostos no âmbito deste projeto que envolvem coleta de material de pacientes foram submetidos ao Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina (FM) da Universidade de Brasília, sob número de protocolo 016/2009. As abordagens utilizadas neste projeto não implicaram riscos aos pacientes envolvidos pois são inerentes à rotina ambulatorial que seguem. Para coleta de material, os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido de que suas amostras seriam utilizadas somente para o projeto em questão e a identificação das amostras seria feita de maneira que a identidade do paciente fosse preservada.

4. RESULTADOS

Durante o período de estudo, 532 pacientes completaram a pesquisa, fornecendo informações sobre características físicas, comportamentais e clínicas, além do genótipo determinado para ApoE e 12 AIMS.

Depois da realização dos testes de significância que compararam as médias dos valores obtidos para cada variável entre pacientes com e sem DA, foi observado que a amostra era homogênea para tamanho da CA e para o valor da PAS, como visto na tabela 3. Entretanto existem diferenças entre os grupos para as variáveis gênero, idade e PAD, sendo o grupo controle mais jovem, com PAD maior e sendo super-representado por mulheres.

Quanto à ApoE, portadores do alelo e4 eram mais frequentes entre os pacientes com DA (47,5%) do que entre os demais pacientes (19,7%). Dos 12 AIMS, 7 possuíam frequências que seguiam o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 3: Comparação das variáveis contínuas e categóricas entre pacientes com e sem DA.

Variáveis	DA (n= 120)			Normais (n= 412)			Total (n=532)			p*
	Mediana	Moda	Min/Max	Mediana	Moda	Min/Max	Mediana	Moda	Min/Max	
Idade (anos)	79	77	59/90	69	74	53/96	72	74	53/96	<.001
CA (cm)	93.3	93.3	69/128	90.4	90.3	59/131	91	90.3	59/131	0.53
PAS (mmHg)	130	120	100/200	140	140	70/210	135	140	70/210	0.80
PAD (mmHg)	80	80	60/110	80	80	40/120	80	80	40/120	<.01
MEEM1	13	12	0/28	24	25	9/30	-	-	-	-
MEEM2	9	0	0/26	23	24	13/30	-	-	-	-
CDR1	3	3	0/4	-	-	-	-	-	-	-
CDR2	3	3	2/4	-	-	-	-	-	-	-
	n	%		n	%		n	%		p*
Homens	41	34.2		48	11.6		89	16.7		<.001
Portadores de e4	57	47.5		81	19.7		138	25.9		<.001

* Significância verificada pelo teste de Mann-Whitney test.

* Significância verificada pelo teste Qui-quadrado.

Fonte: a autora.

A análise de ancestralidade genômica demonstrou que a amostra é composta por indivíduos que possuem em média 56% de ancestralidade genética europeia, 30% africana e 13% ameríndia (figura 1). Quando foi feita a comparação das médias de proporções de ancestralidade entre os grupos diagnósticos, todas as proporções foram significativamente diferentes entre si (tabela 4).

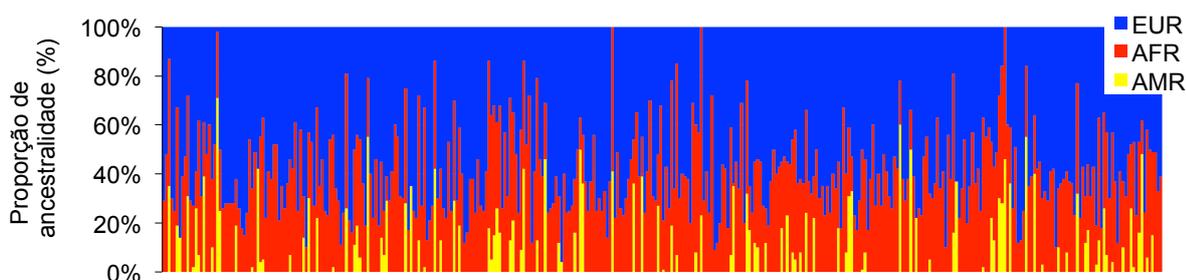


Figura 1: Distribuição das proporções individuais de miscigenação.
Fonte: a autora.

Tabela 4: Comparação dos níveis de ancestralidade genética entre grupos diagnósticos.

Ancestralidade	AD			Normal			p^*
	Mediana (%)	Moda	Min/Max	Mediana (%)	Moda	Min/Max	
Europeia	62	74	0/96	57	56	0/98	0.001
Africana	33.5	26	0/77	29	0	0/100	0.005
Ameríndia	0	0	0/71	11	0	0/73	<.001

* Significância verificada pelo teste de Mann-Whitney.

Fonte: a autora.

Na análise comparativa das médias de dMEEM ou dCDR entre quartis de ancestralidade europeia ou africana, não houve diferença significativa entre os valores obtidos, mesmo excluindo as possíveis interferências geradas pelos valores iniciais de MEEM ou CDR, respectivamente, e pela presença do alelo e4. No teste de correlação entre os valores de dMEEM, ou dCDR, e as respectivas proporções individuais de cada ancestralidade (figura 2) obteve-se relação significativa apenas entre dMEEM e ancestralidade ameríndia ($r = 0.1$; $p = 0.03$).

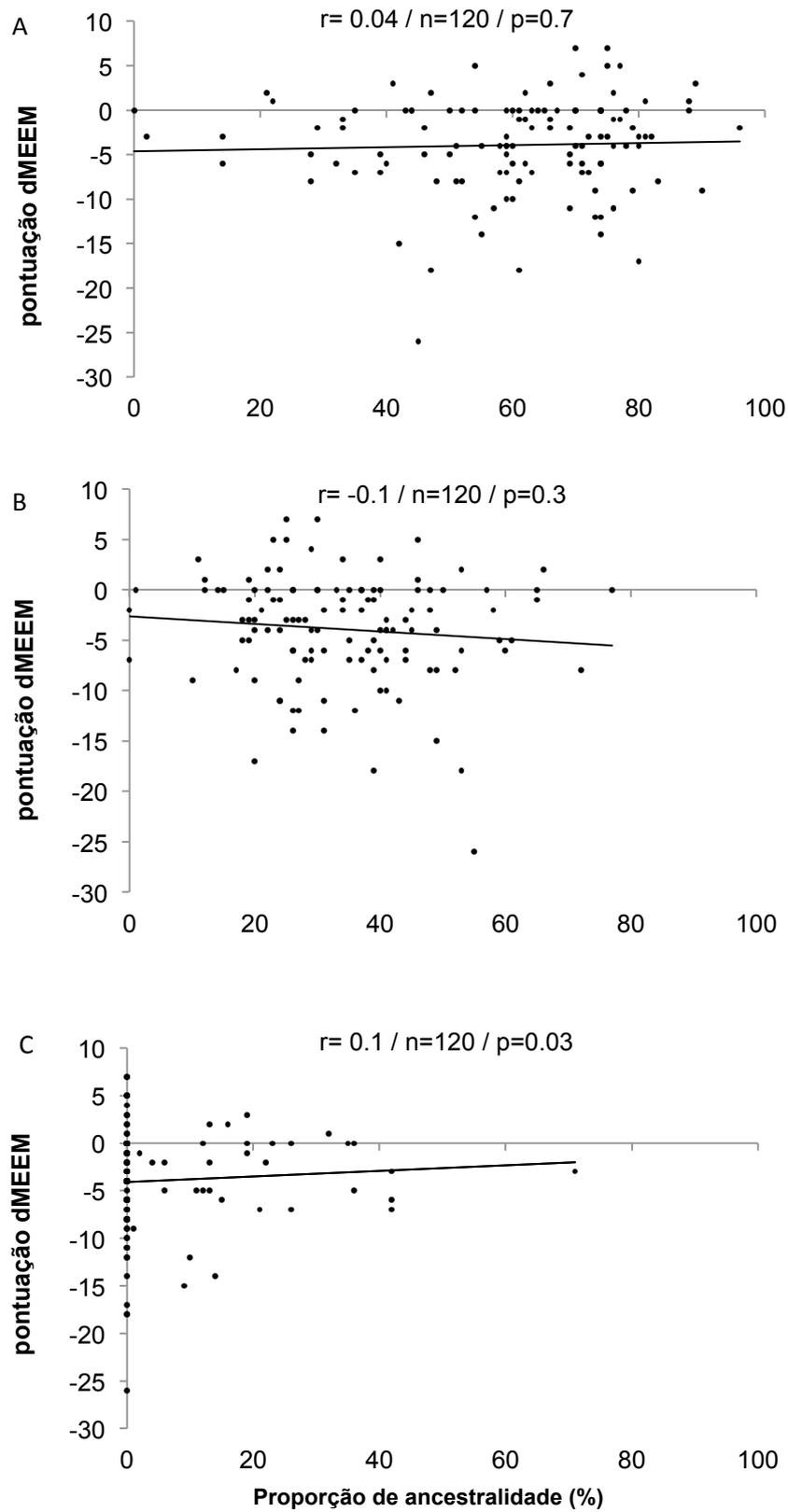


Figura 2: Correlação entre as pontuações obtidas nos dMEEM e as proporções genéticas de ancestralidade europeia (A), africana (B) e ameríndia (C) dos pacientes com DA.

Fonte: a autora.

5. DISCUSSÃO

5.1 COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DIAGNÓSTICOS

Quando comparados, os grupos de pacientes com e sem DA apresentaram algumas diferenças significantes entre si que devem ser consideradas. A primeira delas refere-se às diferenças numéricas de homens e mulheres, havendo uma grande quantidade de mulheres no grupo controle. Esse grande número de mulheres nesse grupo pode ter sido decorrente de um aspecto cultural relacionado à auto percepção da mulher com relação à saúde, a qual tende a considerar sua saúde ruim e assim recorre com maior frequência aos centros de assistência (BARRETO, 2004; PARAHYBA, 2006; WORLD ALZHEIMER REPORT, 2011). Além disso, outro fator que pode ter colaborado para a diferença observada é que mulheres brasileiras possuem uma expectativa de vida maior que os homens (PARAHYBA, 2006).

Com o intuito de detectar formas iniciais de demência, a idade mínima determinada para ingresso no estudo foi 60 anos. Entretanto a DA de início tardio se manifesta com maior frequência a partir dos 65 anos, quando seus sintomas são mais evidentes (QIU, 2009; ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2009). Esses fatores podem parcialmente explicar a diferença significativa de idade observada entre os pacientes dos grupos diagnósticos, sendo os pacientes com a doença os de mais idade.

Outra variável que diferiu entre os grupos foi a PAD, sendo a média de seus valores menor nos pacientes com DA. Entretanto, nossos resultados são discordantes dos obtidos por Morris e colaboradores (MORRIS, 2000), o qual sugeriu, a partir de um estudo bi-racial com idosos, que há um aumento na prevalência de DA em pessoas com alta PAD. Sendo assim, os valores das PADs encontrados aqui podem não ter grande influência em nossas análises de correlação uma vez que PAD baixa não é um fator de risco para o desenvolvimento da DA.

As discrepâncias mencionadas dessas variáveis geram consideráveis fatores de confusão que merecem papel importante na análise dos dados. Contudo, os valores obtidos para tais variáveis geraram regressões logísticas com declives não homogêneos, o que passou a ser um entrave à execução da análise de covariância

(KUTNER, 2005), impedindo-nos de controlar os efeitos oriundos dessas variáveis.

5.2 ANÁLISE DA CONTRIBUIÇÃO ANCESTRAL

O presente estudo mostrou que existem diferenças significativas nas proporções de ancestralidade genética entre o grupo de pacientes com e sem DA, sendo que os pacientes com DA apresentam proporções maiores de ancestralidade europeia e africana que os pacientes controles. Por outro lado, adultos cognitivamente saudáveis possuíam proporções maiores de ancestralidade ameríndia, característica que pode indicar que a arquitetura alélica ameríndia pode conferir algum tipo de proteção ao desenvolvimento da DA, enquanto a “bagagem” fornecida pelas ancestralidades europeia e africana poderia ter fatores predisponentes à DA. O único trabalho publicado sobre o assunto, que utiliza AIMS para investigar associações entre origens genéticas e DA, foi feito por Schlesinger e colaboradores (2011). Estes reportaram que a ancestralidade africana é protetiva com relação ao desenvolvimento da DA e de neuropatologias relacionadas. Entretanto, este trabalho fez análises nas quais os indivíduos foram categorizados em europeus (somente) e indivíduos miscigenados (os quais foram chamados de africanos), o que pode ter camuflado o efeito da contribuição alélica ameríndia.

Outra análise realizada foi a averiguação sobre uma possível relação entre alterações do estado cognitivo e a ancestralidade genética. É bem estabelecido na literatura que o MEEM é um teste de rastreio que detecta prejuízo cognitivo, além de permitir a avaliação da evolução do quadro clínico do paciente quando seus valores são obtidos em dois momentos e comparados entre si (DOODY, 2010). Portanto, através da correlação entre as proporções individuais de ancestralidade e a diferença dos valores obtidos nos dois testes do MEEM, ou CDR, foi encontrada associação entre altas proporções de ancestralidade ameríndia e menor declínio na pontuação do MEEM, durante o período de estudo. Dessa forma, é possível supor que o genoma ameríndio fornece uma melhor capacidade de melhorar, ou reparar, a atividade cerebral. Entretanto, não há dados disponíveis na literatura que suportem tal hipótese. O único estudo encontrado que se refere à valores de MEEM obtidos por indígenas, foi feito por Weiner e colaboradores (2003), o qual relatou que indígenas Americanos, ou americanos com $\geq 50\%$ de ancestralidade ameríndia,

possuíam pontuações maiores no MEEM quando comparados à americanos brancos. Contudo, esse resultado demonstrou apenas uma tendência já que a diferença obtida não foi estatisticamente significativa. Quanto ao CDR, nenhuma associação foi encontrada, porém isto pode dever-se ao fato do CDR ter baixa sensibilidade para detectar alterações cognitivas num curto período de tempo, como o ocorrido no presente estudo.

5.3 SELEÇÃO DA AMOSTRA

A amostra selecionada no presente estudo é formada por pacientes provenientes de dois centros médicos localizados em diferentes regiões do Distrito Federal: o Centro de Medicina do Idoso (CMI) e o Hospital da Universidade Católica de Brasília (HUCB). O CMI é um serviço público de saúde considerado centro regional de referência em geriatria e pertence ao Hospital da Universidade de Brasília, localizada região central da capital federal. O HUCB é um hospital com serviço de baixo custo, sendo subsidiado pela Universidade Católica de Brasília, no qual são realizadas inúmeras pesquisas na área da saúde e localiza-se na cidade de Taguatinga-DF. Devido ao custo reduzido do serviço de saúde em ambos os locais, e à excelência dos profissionais de saúde, os pacientes que buscam acompanhamento médico são oriundos de diferentes regiões administrativas (RAs) do DF, portanto o aspecto cultural é diversificado.

Sabendo que a capital nacional foi construída há pouco mais de 50 anos, podemos predizer que a maior parte da amostra estuda é proveniente de outras unidades federativas já que todos os pacientes possuem mais de 60 anos. Esse perfil cultural e ancestral heterogêneo é um fator positivo ao estudo, uma vez que a grande variabilidade genética da amostra reflete melhor o perfil atual da população brasileira.

5.4 ESTIMATIVA DE ANCESTRALIDADE

Segundo Royal (2010), a precisão dos métodos de inferência de ancestralidade dependem (1) de como a variação dos padrões genéticos são distribuídos geograficamente, (2) do tipo e número de marcadores genéticos

utilizados, (3) de quais populações são utilizadas como referência e (4) do método estatístico utilizado na análise dos dados gerados.

Conforme já mencionado, a população brasileira foi formada pela miscigenação da população ameríndia (nativa do Brasil), europeia (composta principalmente por colonizadores portugueses, italianos, espanhóis e alemães) e africana (escravos trazidos do Senegal, Gana e Camarões) (RIBEIRO, 1995). Essas populações formam 3 grupos intercontinentais com características diversas que estão reunidas na população brasileira. Lins (2010) demonstrou haver diferença na proporção da composição genética da população brasileira entre as cinco regiões (norte, nordeste, centro-oeste, sudeste e sul), as quais provavelmente refletem a maneira como a ocupação do espaço geográfico sucedeu. Dado que a população do estudo é formada por idosos residentes no Distrito Federal – Brasil – que tiveram sua origem em outros estados da federação, podemos pressupor que amostra tende a refletir a composição genética da população brasileira.

Os AIMs escolhidos são SNPs autossômicos, e por isso fornecem mais informação sobre a ancestralidade individual tendo em vista que representam uma proporção muito maior da história de um genoma se comparado com marcadores haploides de DNA mitocondrial ou do cromossomo Y, por exemplo (ROYAL, 2010). Além disso, os marcadores foram previamente utilizados em outros trabalhos, sendo inclusive testados na população brasileira e demonstraram ser eficientes em gerar informações genéticas sobre populações miscigenadas por três origens parentais (LINS, 2009). Todos os marcadores escolhidos possuem um δ - valor absoluto da diferença de frequência alélica entre duas populações – maior que 0,7. O presente valor de δ é maior que o mínimo recomendado de 0,3 (STEPHENS, 1994; SHRIVER, 1997). Foram utilizados 12 AIMs, entretanto não há relato de um número mínimo de marcadores exigidos para realização de análise de Máxima-Verossimilhança, adotada no presente estudo.

Quanto à origem dos AIMs, Lins e colaboradores (2010) relataram que os marcadores utilizados não correspondem exatamente às populações parentais brasileiras, principalmente em relação à ancestralidade europeia e ameríndia, cujos marcadores são representativos de nativos norte-americanos. Entretanto as diferenças de frequências alélicas entre a população parental real e a considerada parental para o estudo são pequenas e não interferem na definição de

ancestralidade à nível continental (LINS, 2010).

Nossas análises indicaram que a amostra é composta em média por 56% de ancestralidade genética europeia, 30% africana e 13% ameríndia (Figura 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Pena (2011) e Leite (2011) nos quais as contribuições médias de cada ancestralidade variavam 60,1% a 79,5% para europeia, 10.3% a 29.3% para africana e 7,3% a 18.55% para ameríndia. Nesses estudos a amostra era composta por grupos de indivíduos de diferentes regiões brasileiras, o que difere ligeiramente do presente trabalho, no qual a amostra é formada pela mistura de todas essas unidades.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos durante o estudo foram primeiramente avaliados quanto a sua normalidade através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Para o grupo de pacientes com demência os dados das variáveis idade, gênero, circunferência abdominal (CA), proporção de ancestralidade ameríndia e as pressões arteriais diastólica (PAD) e sistólica (PAS) não foram considerados normais. No grupo controle nenhuma variável seguiu o padrão de normalidade. Partindo desse resultado, as primeiras análises feitas foram as comparações de médias e frequências entre os grupos diagnósticos. Para tal fim, testes como Mann-Whitney e Qui-quadrado foram realizados. Foi observada diferença significativa ($p < 0.05$) entre as variáveis gênero, idade, ApoE e pressão arterial diastólica, conforme discutido previamente no manuscrito.

Para verificar a existência de relação entre o diagnóstico e as proporções genéticas de ancestralidade, minimizando os efeitos das co-variáveis (ApoE, gênero, idade, CA, PAD, PAS), tentou-se aplicar o teste ANCOVA. Para que a execução da ANCOVA seja possível, os dados devem seguir os pressupostos de normalidade. Tentando contornar o problema da não normalidade de alguns dados, utilizamos a transformação de BOX-COX, segundo a fórmula abaixo (KUTNER, 2005):

$$y^{(\lambda)} = \frac{(y^\lambda - 1)}{\lambda} \text{ para } \lambda \neq 0;$$

$$y^{(\lambda)} = \log(y^\lambda) \text{ para } \lambda = 0.$$

Foram testados 31 λ diferentes e com nenhuma das transformações os dados foram considerados normais. Sendo assim, essa análise teve que ser rejeitada.

Devido à impossibilidade de remover a influência das co-variáveis, o teste de Mann-Whitney comparou as proporções genéticas de ancestralidade individual com o diagnóstico dado. Obteve-se então, uma diferença significativa entre todas as ancestralidades e o diagnóstico de DA. Verificando as médias de ancestralidade em cada grupo verificamos que a ancestralidade europeia e africana estão em maior proporção nos pacientes com DA, enquanto a ancestralidade ameríndia está em menor proporção quando comparado ao grupo controle.

Querendo verificar se a progressão da doença de Alzheimer era influenciada pela arquitetura genética de alguma população parental, correlacionamos a variação da aferição dos dois testes de MEEM (dMEEM= MEEM final – MEEM inicial) e CDR (dCDR= CDR final – CDR inicial) com cada variável ancestral. Como passo inicial à análise, o teste de Kolmogorov-Smirnov demonstrou que apenas a distribuição das proporções de ancestralidade ameríndia não foram consideradas normais para os grupo de portadores de DA, o que gerou a necessidade de analisar essa variável com testes diferentes das demais.

As ancestralidades europeia e africana foram analisadas com o teste ANCOVA. Para que isso fosse possível, as proporções individuais de cada um dos dois grupos ancestrais foram divididas em quartis. Esse agrupamento em quartis nos permite observar a influência da proporção de cada variável no fenótipo já que os indivíduos não podem ser classificados de acordo com apenas uma origem ancestral. A ANCOVA irá então verificar se há diferenças entre as médias dos valores de d.MEEM ou dCDR em cada um desses quartis. Nessa análise os quartis foram considerados as variáveis independentes, o dMEEM ou dCDR a variável dependente. Há relatos na literatura da influência do alelo e4 da ApoE na manifestação e progressão da DA (TANG, 1996; CONSENTINO, 2008; MORTIMER, 2009; MORRIS, 2010) e por isso a presença desse alelo foi considerada uma co-variável, assim desprezamos seu efeito no resultado da análise. O mesmo foi feito para o MEEM ou CDR inicial, dessa forma consideramos o fato dos pacientes ingressarem na pesquisa em estágios de declínio cognitivo diferentes entre si. Não

foi encontrada nenhuma associação significativa, nos levando a crer que a ascendência europeia ou ameríndia não têm nenhuma influência no desempenho cognitivo de pessoas com demência de Alzheimer.

Como as proporções de ancestralidade ameríndia entre os pacientes demenciais não são normais, a ANCOVA não era uma ferramenta apropriada para o estudo, sendo feita uma análise similar pelo teste de correlação de Spearman. Entretanto, como o teste de correlação não permite a inserção de co-variáveis, não verificamos o efeito das demais variáveis obtidas. Como resultado, obteve-se relação significativa com dMEEM, mostrando que uma maior relação ancestral com a população ameríndia confere ao doente de Alzheimer um declínio menor de sua capacidade cognitiva ao avançar da doença.

Apenas a título de facilitar a comparação entre os valores de coeficientes de correlação e de significância entre os 3 grupos de ancestralidade, o teste de correlação de Pearson foi feito para as ancestralidades europeia e africana.

5.6 CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS

É importante salientar que nosso desenho de estudo não descarta possíveis interferências referentes ao legado cultural inerente à origem ancestral dos indivíduos estudados. Porém, fica claro a necessidade de ter conhecimento do perfil genético da amostra em estudo para que sejam avaliadas as interferências inerentes à arquitetura alélica de determinado grupo ancestral.

Apesar deste trabalho poder fornecer uma contribuição importante ao controlar a influência do alelo e4 da ApoE, as interferências relacionadas à farmacoterapia não foram consideradas. Além disso, como estudo descritivo que utiliza amostra de conveniência, não é possível que se determine interferências causais sobre as variáveis analisadas. Portanto, devido à natureza da amostra, que pode possuir algum viés de auto-seleção, é recomendada cautela quando forem feitas extrapolações à população em geral.

6. CONCLUSÃO

A análise dos dados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- a estrutura genética herdada das populações ameríndias encontra-se mais presente nas pessoas que não apresentam a demência de Alzheimer, o que pode indicar que uma maior proporção de ancestralidade genômica ameríndia diminui a predisposição ao desenvolvimento da doença em questão.

- uma maior proporção de ancestralidade ameríndia está relacionada à menores variações nos resultados do MEEM ao longo da progressão da doença de Alzheimer, o que representa um menor declínio cognitivo quando comparado às pessoas com menores proporções de genes ameríndios no genoma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMKVIST, O. et al. (1999) Early diagnosis of Alzheimer dementia based on clinical and biological factors. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 249: Suppl. 3 III/3–III/9.

ALVES-SILVA, J. et al. (2000) The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. *Am. J. Hum. Genet*. 67: 444–461.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION (2009) Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's & Dementia*. 5 (3).

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV-TR)* 4. ed. Washington: American Psychiatric Association, 2000. 943 p.

AVRAMOPOULOS, D. (2009) Genetics of Alzheimer's disease: recent advances. *Genome Medicine*. 1:34.

BARRETO, S.M. et al. (2004) Gender inequalities in health among older brazilian adults. *Rev Panam Salud Publica*. 16:110-117.

BERTRAM, L. et al. (2008) Genome-wide Association Analysis Reveals Putative Alzheimer's Disease Susceptibility Loci in Addition to APOE. *The American Journal of Human Genetics*. 83: 623–632.

BIRD, T. D. Alzheimer Disease Overview (2010) *GeneReviews*. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1161/> Acesso em: 2011.

BOWIRAT, A. et al. (2002) Genetic and Environmental Risk Factors for Alzheimer's Disease in Israeli Arabs. *Journal of Molecular Neuroscience*. 19:239–245.

BRAAK, E. et al. (1999) Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 249: Suppl. 3 III/14–III/22.

CARAMELLI, P.; BARBOSA, M.T. (2002) Como diagnosticar as quatro usas mais freqüentes de demência? *Rev Bras Psiquiatr.* 24(Supl I): 7-10.

CASTELLANI, R. J. et al. (2008) Alzheimer's disease pathology as a host response. *J Neuropathol Exp Neurol.* 67(6): 523–53.

CASTELLANI, R. J. et al. (2009) Reexamining Alzheimer's Disease: Evidence for a Protective Role for Amyloid- Protein Precursor and Amyloid. *J Alzheimers Dis.* 18(2): 447–452.

CASTELLANI, R. J. et al. (2010) Alzheimer Disease. *Dis Mon.* 56(9): 484–546.

CENTRO LATINOAMERICANO Y CARIBEÑO DE DEMOGRAFÍA. *Indicadores Sociodemográficos.* Disponível em:
www.eclad.org/celade/proyecciones/basedatos_BD.htm Acesso em:2009.

CHANG-SOOK, H. et al. (1999) Contrasting Role of Presenilin-1 and Presenilin-2 in Neuronal Differentiation In Vitro. *The Journal of Neuroscience.* 19(2): 637–643

CHOULDHRY, S. et al. (2006) Population stratification confounds genetic association studies among Latinos. *Hum Genet.* 118: 652–664

COLE, S. L.; VASSAR, R. (2007) The Alzheimer's disease β -secretase enzyme, BACE1. *Molecular Neurodegeneration.* 2:22.

COLLINS-SCHRAMM, H.E. et al. (2002) Ethnic-Difference Markers for Use in Mapping by Admixture Linkage Disequilibrium. *Am. J. Hum. Genet.* 70:737–750

CORDER, E. H. (1993) Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Alele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families. *Science.* 261;921-923.

COSENTINO, S. et al (2008) APOE epsilon 4 allele predicts faster cognitive decline in mild Alzheimer disease. *Neurology.* 70(19 Pt 2): 1842-9.

CUMMINGS, J.L. (2004) Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 351:56-67.

DEMATOS, R.B. et al. (2002) Clusterin promotes amyloid plaque formation and is critical for neuritic toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci*. 99(16): 10843–10848

DINIZ, B.S.O.; TAVARES JÚNIOR, A.R. (2001) As bases biológicas da doença de Alzheimer. *Rev. Méd. Minas Gerais*. 11(2): 92-97.

DONOHUE, G.G. et al. (1999) Rapid identification of apolipoprotein e genotypes by multiplex amplification refractory mutation system pcr and capillary gel electrophoresis. *Clin Chem*. 45:143-146

DOODY, R.S. et al. (2010) Predicting progression of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2:2.

DRIES, D. (2009) Genetic Ancestry, Population Admixture, and the Genetic Epidemiology of Complex Disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2:540-543.

DRINEAS, P. et al. (2010) Inferring Geographic Coordinates of Origin for Europeans Using Small Panels of Ancestry Informative Markers. *PLoS ONE*. 5(8): e11892.

ENOCH, M. et al. (2006). Using ancestry-informative markers to define populations and detect population stratification. *Journal of Psychopharmacology*. 20(4): 19-26.

FARIAS, Y. S. Migrantes no distrito federal: quem são? De onde vem? Por que vem? In: *Encontro de Formação da Pastoral no Migrante*, 2008, Brasília. Disponível em: <http://www.csem.org.br/artigos_port.html>. Acessado em: 10/2011.

FROELICH, T.E. et al. (2001) Dementia and Race: Are there differences between African Americans and Caucasians. *J Am Ger Soc*. 49:477-484.

GALIMBERTI, D. et al. (2010) Genetics and biology of Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. *Int J Clin Exp Med*. 3(2):129-143.

GALLUCCI, N.J. et al. (2005) Diagnóstico diferencial das demências. **Revista de Psiquiatria Clínica**. 32:119-30.

GENTIL, P. et al. (2007) Physical activity, cdx-2 genotype, and bmd. **Int J Sports Med**. 28:1065-1069.

GENTIL, P. et al. (2009) Vitamin-d-receptor genotypes and bone-mineral density in postmenopausal women: Interaction with physical activity. **J Aging Phys Act**. 17:31-45.

HAASS, C.; SELKOE, D. J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid b-peptide. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 8; 101-112.

HAROLD, D. et al. (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. **Nature Genetics**.

HEBERT, L.E. et al. (1995) Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population. **JAMA**. 273:1354-9.

HOGGART, C.J. et al. (2003) Control of Confounding of Genetic Associations in Stratified Populations. **Am. J. Hum. Genet**. 72:1492–1504

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). (2008) **Síntese de indicadores sociais: uma análise das condições de vida da população brasileira**. Disponível em: www.ibge.gov.br . Acesso em: 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). (2010) **Características da População e dos Domicílios do Censo Demográfico 2010**. Disponível em: www.ibge.gov.br . Acesso em: 2011.

JENNE, D.E.; TSCHOPP, J. (1992) Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein. **Trends in Biochemical Sciences**. 17(4); 154-159.

JORDE, L. (1995) Linkage Disequilibrium as a Gene- Mapping Tool. **Am.J. Hum. Genet**. 56:11-14.

KERSBERGEN, P. et al. (2009) Developing a set of ancestry-sensitive DNA markers reflecting continental origins of humans. *BMC Genetics*.10:69.

KIM, J. et al. (2009) The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron*. 63; 287-303.

KOSOY, R. et al. (2008) Ancestry Informative Marker Sets for Determining Continental Origin and Admixture Proportions in Common Populations in America. *Human mutation*. 0:1-10.

KUTNER, M.H. et al. (2005) *Applied linear statistical model*. New York (NY), McGraw-Hill Irwin, ed 5.

LAMBERT, J. et al. (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*.

LEITE, T.K.M. et al. (2011) Genomic Ancestry, Self-Reported "Color" and Quantitative Measures of Skin Pigmentation in Brazilian Admixed Siblings. *PLoS ONE*. 6(11): e27162.

LIMA-COSTA, L. et al. (2003) Condições de saúde, capacidade funcional, uso de serviços de saúde e gastos com medicamentos da população idosa brasileira: um estudo descritivo baseado na Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios. *Cad. Saúde Pública*. 19(3):735-743.

LINS, T.C. et al. (2009) TagSNP transferability and relative loss of variability prediction from HapMap to an admixed population. *J Biomed Sci*. 16:73.

LINS, T.C. et al. (2010) Genetic Composition of Brazilian Population Samples Based on a Set of Twenty Eight Ancestry Informative SNPs. *American journal of human biology*. 22:187–192

LIRA, M. R. *Processo Histórico da Organização do Distrito Federal*. Disponível em: <http://www.coladaweb.com/historia-do-brasil>. Acesso em: 10/2011.

LOPES, M. A.; BOTTINO, C.M.C (2002) prevalência de demência em diversas regiões do mundo. **Arq Neuropsiquiatr.** 60(1):61-69.

MAURER, K. et al. (1997) Auguste D and Alzheimer's disease. **Lancet.** 349: 1546–49.

MCGEER, P.L. et al. (1992) Distribution of clusterin in Alzheimer brain tissue. **Brain Research.** 579 (2); 337-341.

MCKEE, A.C. et al. (2009) Chronic Traumatic Encephalopathy in Athletes: Progressive Tauopathy following Repetitive Head Injury. **J Neuropathol Exp Neurol.** 68(7): 709–735.

MCKEIGUE, P.M. (1998) Mapping Genes That Underlie Ethnic Differences in Disease Risk: Methods for Detecting Linkage in Admixed Populations, by Conditioning on Parental Admixture. **Am. J. Hum. Genet.** 63:241–251

MCKEIGUE, P.M. et al. (2000) Estimation of admixture and detection of linkage in admixed populations by a Bayesian approach: application to African-American populations. **Ann. Hum. Genet.** 64, 171–186

MCKHANN, G. et al. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. **Neurology.** 34(7):939-44.

METHA, K.M. et al. (2008) Race/ethnic differences in Alzheimer disease survival in US Alzheimer Disease Centers. **Neurology.** 70(14): 1163–1170.

MORAES, C.F. et al. (2011) Lessons from genome-wide association studies findings in Alzheimer's disease. **Psychogeriatrics.** doi:10.1111/j.1479-8301.2011.00378.x
pyg_37

MORENO LIMA, R. et al. (2007) Lack of association between vitamin d receptor genotypes and haplotypes with fat-free mass in postmenopausal Brazilian women. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** 62:966-972.

MORRIS, M.C. et al. (2000) The cross-sectional association between blood pressure and alzheimer's disease in a biracial community population of older persons. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** 55:M130-136.

MORRIS, J. C. et al. (2010) APOE Predicts A but not Tau Alzheimer's Pathology in Cognitively Normal Aging. **Ann Neurol.** 67(1): 122–131.

MORTIMER, J.A. et al (2010) The Effect of APOE- ϵ 4 on Dementia is Mediated by Alzheimer Neuropathology. **Alzheimer Dis Assoc Disord.** 23(2): 152–157.

MURRELL, R. et al. (2006) Association of apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease in African Americans. **Arch Neurol.** 63: 431–434.

NASSIR, R. et al. (2009) An ancestry informative marker set for determining continental origin: validation and extension using human genome diversity panels. **BMC Genetics.** 10:39

NELSON, P. T. et al. (2009) Neuropathology and Cognitive Impairment in Alzheimer Disease: A Complex but Coherent Relationship. **J Neuropathol Exp Neurol.** 68(1): 1–14.

NITRINI, R. et al. (2005) Diagnóstico da Doença de Alzheimer no Brasil. **Arq Neuropsiquiatr.** 63(3-A):713-719.

NITRINI, R. et al. (2009) Prevalence of dementia in Latin America: a collaborative study of population-based cohorts. **International Psychogeriatrics.** 21:4,622–630.

OGUNNIYI, A. et al. (2000) Epidemiology of dementia in Nigeria: results from the Indianapolis-Ibadan study. **Eur J Neurol.** 7(5): 485-90.

PARAYBA, M.I. (2006) **Desigualdades de genero em saúde entre idosos no Brasil.** Trabalho apresentado no XV Encontro Nacional de Estudos Populacionais, ABEP. Caxambú (MG), Brasil. pp 11.

PASHOU, P. et al. (2007) PCA-Correlated SNPs for Structure Identification in Worldwide Human Populations. **PLoS Genet.** 3(9): e160.

PATTERSON, N. et al. (2004) Methods for High-Density Admixture Mapping of Disease Genes. ***Am. J. Hum. Genet.*** 74:979–1000.

PFAFF, C. L. et al. (2004) Information on ancestry from genetic markers. ***Genetic epidemiology.*** 26(4): 305-15.

PEDROSA, M. A. F. **Composição genética de quatro populações remanescentes de quilombos do Brasil com base em microssatélites e marcadores de ancestralidade.** Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2006. p.

PENA, S.D. et al. (2011) The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. ***PLoS One.*** 6:e17063.

PESQUISA NACIONAL POR AMOSTRA DE DOMICÍLIOS (PNAD). (2009) ***Síntese de Indicadores 2009.*** Disponível em: www.ibge.gov.br . Acesso em: 2011.

PESQUISA NACIONAL POR AMOSTRA DE DOMICÍLIOS (PNAD). (2010) ***Resultados Preliminares do Universo do Censo Demográfico 2010.*** Disponível em: www.ibge.gov.br . Acesso em: 2011.

QIU, C. et al. (2009) Epidemiology of alzheimer's disease: Occurrence, determinants, and strategies toward intervention. ***Dialogues Clin Neurosci.*** 11:111-128.

RAUX, G. et al.(2005) Molecular diagnosis of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease: an update. ***Med Genet.*** 42:793–795

REICH, D.E. et al. (2001) Linkage disequilibrium in the human genome. ***Nature.*** 411;199.

RIBEIRO, D. (1995) ***O povo brasileiro: a formação e o sentido do Brasil.*** São Paulo: Companhia das Letras.

ROE, D.A. (1984) Therapeutic significance of drug-nutrient interactions in the elderly. ***Pharmacol Rev.*** 36(2 Suppl), 109S-122S.

- ROGAEVA, E. et al. (2007) The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer's Disease. *Nat Genet.* 39(2): 168–177.
- ROSENBERG, N. A. et al.(2003) Informativeness of Genetic Markers for Inference of Ancestry. *Am. J. Hum. Genet.* 73:1402–1422
- ROYAL, C.D. et al. (2010) Inferring Genetic Ancestry: Opportunities, Challenges, and Implications. *The American Journal of Human Genetics.* 86: 661–673.
- SCHLESINGER, D. et al. (2011) African ancestry protects against Alzheimer's disease-related neuropathology. *Molecular Psychiatry* , 1–7.
- SHRIVER, M.D. et al. (1997) Ethnic-Affiliation Estimation by Use of Population-Specific DNA Markers. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 957-964.
- SHRIVER, M.D. et al (2003) Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. *Hum Genet.* 112:387-399.
- SMITH, M. A. C. (1999) Doença de Alzheimer. *Rev Bras Psiquiatr.* 21:SI13
- SMITH, M.W. et al. (2004) A high-density admixture map for disease gene discovery in African Americans. *Am J Hum Genet.* 74:1001-1013.
- SMITH, M.W.; O'BRIEN, S.T. (2005). Mapping by admixture linkage disequilibrium: advances, limitations and guidelines. *Nature reviews genetics.* 6(8): 623-32.
- STEPHENS, J.C. et al.(1994) Mapping by admixture linkage disequilibrium in human populations: limits and guidelines. *Am J Hum Genet.* 55:809–824.
- TANG, M.X. et al. (1996) Relative risk of Alzheimer disease and age-at-onset distributions, based on APOE genotypes among elderly African Americans, Caucasians, and Hispanics in New York City. *Am J Hum Genet.* 58(3): 574–584.
- TANG, M. et al. (1998) The APOE- ϵ 4 Allele and the Risk of Alzheimer Disease

Among African Americans, Whites, and Hispanics. **JAMA**. 279(10):751-755.

THINAKARAN, G. et al. (2008) Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing and Function. **Journal of Biological Chemistry**. 283 (44): 29615–29619.

TIAN, C. et al. (2008) Accounting for ancestry: population substructure and genome-wide association studies. **Human Molecular Genetics**. 17(2): R143–R150

TRUZZI, A.; LAKS, J. (2005) Doença de Alzheimer esporádica de início precoce. **Rev. Psiq. Clín.** 32 (1); 43-46

TSAI, H.J. et al. (2005) Comparison of three methods to estimate genetic ancestry and control for stratification in genetic association studies among admixed populations. **Hum Genet**. 118:424-433.

VENKETASUBRAMANIAN, N. et al. (2010) Interethnic differences in dementia epidemiology: global and Asia-Pacific perspectives. **Dement Geriatr Cogn Disord**. 30(6):492-8.

WEINER, M.F. et al. (2003) Comparison of alzheimer's disease in native americans and whites. **Int Psychogeriatr**. 15:367-375.

WEISS, K.M.; CLARK, A.G. (2002) Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. **Trends in Genetics**. 18(1):19-24.

WORLD ALZHEIMER REPORT (2011). **Alzheimer's Disease International**. 2009. Anuário.

YAO, P.J. et al. (2005) Synaptic distribution of the endocytic accessory proteins AP180 and CALM. **J Comp Neurol**. 481(1):58-69.

ZEKANOWSKY, C. et al. (2003) Mutations in presenilin 1, presenilin 2 and amyloid precursor protein genes in patients with early-onset Alzheimer's disease in Poland. **Exp Neurol**. 184(2): 991-6.

APÊNDICE

Amerindian genetic ancestry protects against Alzheimer's disease.

(Artigo submetido ao periódico *Neurodegenerative Diseases*)

Comprovante de Recebimento pelo periódico *Neurodegenerative Diseases*

De: ndd@karger.ch
Assunto: **Neurodegenerative Diseases Submission Received**
Data: 25 de novembro de 2011 13:50:00 BRST
Para: Andrea Lessa Benedet

Dear Ms. Benedet:

Thank you for submitting your manuscript entitled "Amerindian genetic ancestry protects against Alzheimer's disease." to "Neurodegenerative Diseases"; the submission number is: 2534. Your submission will now be checked by the editorial office, and you will receive a confirmation mail from the editorial office soon. This step will also activate your personal user-id and password, enabling you to login to the system to check the status of your manuscript.

If you have any queries please send an email to: ndd@karger.ch.

With kind regards,

Editorial Office

Amerindian genetic ancestry protects against Alzheimer's disease.

Andrea L. Benedet^a, Clayton F. Moraes^a, Einstein F. Camargos^a, Vinícius C. Souza^b, Túlio C. Lins^c, Adriane D. Henriques^d, Dayanne G. S. Carmo^e, Wilcelly Machado-Silva^d, Cláudio Córdova^f, Rinaldo W. Pereira^{c,f,g}, Otávio T. Nóbrega^{a,b}.

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil; ^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil; ^cPrograma de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil; ^dGraduação em Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil; ^eGraduação em Enfermagem, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil; ^fPrograma de Pós Graduação em Educação Física, Universidade Católica de Brasília, DF, Brazil; ^gPrograma de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Category: original article

Running head: ancestry and Alzheimer's disease

***Corresponding author:** Otávio T. Nóbrega

Address: Campus Universitário Darcy Ribeiro

Asa Norte, Brasília – DF, 70910-900

Brazil

Phone (+55 61) 3107 1916 — E-mail: nobrega@pq.cnpq.br; otavionobrega@unb.br

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a widespread dementia that affects millions of people. Among the studies aiming at the AD's pathophysiology, there are usually association studies that are restricted to samples originating from a single population, generating data usually hard to extrapolate to populations abroad. Dissembling genetic origins can be a bias that should be considered. Intending to ascertain if there are differences in AD prevalence according to levels of genetic heritage from parental populations (European, African and Amerindian), 120 AD patients and 412 cognitively healthy controls from the Brazilian highly admixed population were genotyped for 12 ancestry informative markers. Proportions of individual African, Amerindian and European ancestries were compared across the diagnostic status of subjects. These ancestry proportions were also correlated to the difference among final and initial scores of Mini-Mental State Examination (dMMSE) and Clinical Dementia Rating (dCDR). Our results showed that a higher Amerindian ancestry proportion was found among control subjects, and that less cognitive decline was observed among those AD patients with greater Amerindian content. Our results suggest that the Amerindian allelic architecture could confer protection against the onset of Alzheimer's disease, whereas African and European background could be comparatively more predisposing of this form of dementia.

Key terms: Alzheimer's disease, dementia, genetic ancestry, ancestry markers, admixture, complex disease.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common progressive neurodegenerative disorder affecting nearly 27.7 million people worldwide [1]. This disease is characterized by memory loss along with injury of any other cognitive function [2-6] and may exhibit early- or late-onset forms depending (mainly) on intrinsic pathophysiological mechanisms [2]. Considered a complex phenotype, late-onset AD's etiology largely relies on modifiable factors (e.g., literacy level) and non-modifiable (e.g., genetic architecture) [2, 5, 7]. Regardless of the technology employed (from single gene to genome-wide centered), most of the classic AD related genetic risk factors were identified by the 'association study' approach, in which the frequency of a specific genotype is compared among affected and non-affected people. Although useful, this approach has methodological biases mostly in stratified population [8]. When spurious associations arise from non-perceived genetic structure within an admixed population [9, 10].

For traits that display differential risk among populations with different genetic background (e.g., Europeans and Africans), estimating ancestry proportions is a strategy that can help increase knowledge about genetic structure of complex traits [9-14]. Ancestry informative markers (AIMs) have been used to ascertain the structure of the main continental populations, thus placing ancestry estimates as the uttermost correction factor in genetic association studies, especially in studies with admixed populations such as the Latin Americans [8, 14-16]. Moreover, AIMs are a strategy that can be used to map susceptibility variants that might be differently distributed with respect to ancestry within admixed groups [10, 12, 17]

Some studies have linked ethnic differences between patients with late-onset AD in several populations, and these reports range from differences in incidence rates to differences

in the manifestation of Alzheimer's dementia [18-21]. However, these studies were under the influence of various confounding factors due to cross-cultural, -educational and -social aspects. Until now, one single report sought to investigate the relationship between genomic ancestry and the AD phenotype [22] rendering evidence that sub-Saharan African ancestry tends to be protective against AD onset.

Most association studies performed with the highly admixed Brazilian population do not consider ancestry estimates either as main or co-variables to assess difference in backgrounds. To investigate if any of the parental populations to the Brazilian contingent provides a possible predisposition to the onset of the late form of Alzheimer's disease, we analyzed ancestry levels of well-characterized AD patients and controls in a sample of Brazilian outpatients for ambulatory care.

Methods

Subjects

The present study represents a cross-sectional analysis of data from an ongoing open cohort initiative for cognitive assessments. It was performed between 2009 and 2011 and subjects were enrolled after clinically accompanied for a minimum time span of one year, either at the Medical Center for the Aged at Universidade de Brasília or at the Ambulatory for Elderly Care at Universidade Católica de Brasília, both institutions located the Brazilian Federal District. This city has the important feature of being a planned city built to bring the administrative capital from the coast to the midwest of Brazil, giving rise to a migration process has being taking place for the last 50 years. For that reason, the capital's elderly population is considered an expression of the genetic diversity of all Brazilian regions. This diversity was tough to be non-uniformly distributed among different states of the Country

meanwhile the genetic ancestry of these populations is more homogeneous than was expected, as demonstrated by Pena and co-workers[23].

To participate of this research, each volunteer or responsible caregiver provided written informed consent approved by the Institutional Review Board. Project enrollment eligibility criteria consisted on being aged 60 years or older and to fulfill clinical assessments. Exclusion criteria were being affected for any form of dementia different from Alzheimer's Disease, including cases of mixed dementia. After the recruiting stage, 630 volunteers were clinically assessed, from whom 120 individuals were diagnosed with Alzheimer's Disease (AD) whereas 412 subjects were identified as non-demented, cognitively healthy subjects. The remaining 98 exhibited other cognitive disorders and were ruled out.

Data collection

All assessments were executed by a clinician and accompanied by pharmacists. All patients were assessed with a validated Brazilian Portuguese version of the Mini-Mental State Examination (MMSE), and the scores considered for analysis were those obtained at admission in the cohort and at the most recently obtained prior to this analysis. The diagnosis of probable or possible AD was made according to NINCDS/ADRDA criteria in all samples and was determined by the clinician on the basis of consultation with the patient, review of medical records and/or interview with a knowledgeable informant. The Clinical Dementia Rating Scale (CDR) score was measured only for demented patients and also twice, at the same moment that the MMSE was performed. The difference between initial and final MMSE (dMMSE) and CDR (dCDR) was used in statistical analysis.

Additional data as gender, age (years), waist circumference (WC; cm), systolic (SBP; mmHg) and diastolic (DBP; mmHg) blood pressure were also collected. For laboratory

experiments, peripheral venous blood samples were collected into EDTA-containing tube and DNA extraction was performed using standard extraction kits (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Brazil).

Markers selection and genotyping

For individual genetic estimates, 12 autosomal AIMs that reported large allele frequency differences ($\delta > 0,7$) among Europeans, Africans and Native American populations were selected. Eleven of those AIMs (rs730570; rs3796384; rs803733; rs1426654; rs734780; rs2814778; rs1129038; rs1240709; rs2278354; rs2065160; rs4305737) are single nucleotide polymorphisms (SNPs) and one is an insertion-deletion (InDel) variation (rs3138521). All AIMs were developed for previous cross sectional studies [24-26] and their informativeness have been evaluated in Brazilian population [27]. For SNPs' genotyping, fragments were analyzed by a single base extension procedure followed by capillary electrophoresis. Briefly, DNA fragments encompassing the polymorphic site and sized 100 to 200 pb were amplified by standard polymerase chain reaction (PCR) using the Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen, Brazil). All primers used are reproduced in the electronic Table A. Multiplex reactions were optimized with primers segregated into two sets, (set 1: rs730570; rs3796384; rs803733; rs1426654; rs734780 / set 2: rs2814778; rs1129038; rs1240709; rs2278354; rs2065160; rs4305737) according to the size of the single-base sequencing primer, and co-amplified in an Applied Biosystems® Veriti™ Dx Thermal Cycler (Applied Biosystems, US) using the following cycles: denaturation at 95°C for 15 min, followed by 39 cycles of 30 s at 94°C, 90 s at 57°C, 60 s at 72°C, and final extension step at 72°C for 10 min. Following amplification, products were purified by adding 1 U Exo and 1 U CIAP to 3µL PCR product in 1X CIAP reaction buffer to eliminate non-incorporated dNTPs and primers. This mixture was incubated

for 60 min at 37°C following 15 min at 75°C.

For minisequencing, each multiplex was genotyped by single-base extension reaction using the SNaPshot Multiplex System kit (Applied Biosystems, US) with primers concentrations as described on the electronic Table B. A second purification step was carried out by mixing 1 U CIAP to with 5 μ L of the single-base extension reaction corrected to 1X CIAP reaction buffer, which was incubated for 1 min at 37°C and 15 s at 85°C. Following addition 1 μ L of purified products to 8.83 μ L Hi-Di formamide and 0.17 μ L GS120 Liz internal size standard, capillary electrophoresis was carried on an ABI Prism 3130XL genetic analyzer (Applied Biosystems, US) using ABI 3700 POP 7 polymer. The obtained data were analyzed in the GeneMapper software (Applied Biosystems, US).

For genotyping the Indel marker, a PCR was performed on 10 μ L as follows: 1X Taq polymerase buffer, 0.25 mM dNTP, 0.16 mg/ μ L BSA, 1.5 μ M MgCl₂, 1 U Taq polymerase and 10-40 ng DNA. For thermocycling the samples were submitted a 5 min at 95°C, then 29 cycles of 95°C for 1min, 54°C for 1min and 72°C for 1 min and finally 72°C for 20 min for final extension. Genotypes were assessed directly after a 2% agarose electrophoresis gel. To genotype Apolipoprotein E (Apo E) for statistic control, determining the classic e2, e3 and e4 alleles was performed using a polymerase chain reaction (PCR) based on a multiplex refractory mutation system (adapted from Donohoe et al [28]) followed by electrophoresis in a 1.6% agarose gel.

Statistical analysis

Individual genetic ancestry was estimated by IAE3CI program with an algorithm based on maximum likelihood estimation (MLE) [29]. This program uses allele frequencies from the parental populations (European (EUR), African (AFR) and Native American (AMR)).

Allelic frequencies were retrieved via genomic mapping in multiple panels of unrelated ethnic samples [30-32].

Cases were labeled as positive (affected) or negative (non-affected) regarding clinical diagnose of AD. The Kolmogorov-Smirnov test was performed to check for normal distribution of the variables. The Student's *t* test and the Chi-square test were performed for comparison of classic clinical and anthropometric data across subjects affected and non-affected by AD. For the non-normally distributed ancestry scores, the Mann-Whitney test was used to compare these traits between affected and non-affected. To test the correlation between the magnitude of change in MMSE and CDR scores across ancestry levels (quartiles), an analysis of co-variance (ANCOVA) was performed using the e4-carrier status and either the initial MMSE or initial CDR as covariables. For this, the homogeneity of the regression was first tested and then Levene's test was used to verify the homogeneity of the variances. This correlation was also assessed using the Pearson's test. The Spearman's test was utilized when ANCOVA could not be performed. For all tests, a p-value of < 0.05 was considered statistically significant. The software SPSS, version 19 (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for statistical calculations.

Results

From 2009 through 2011, 532 were eligible for and completed the study. All subjects were genotyped for Apo E and 12 AIMS, besides having information about physical, behavioral and clinical features.

To ascertain the homogeneity between groups, significance tests were used to compare means for each variable. As seen in Table 1, waist circumference and systolic blood pressure means were considered equal in both groups. Nonetheless, differences in gender, age and

DBP were significant, with the control group being younger, higher in diastolic pressure and overrepresented with women.

As expected, carriers of the e4 allele were more frequent in AD patients (47.5%) than in cognitively normal subjects (19.7%). Allelic frequencies of the 12 genotyped AIMs in the parental populations were described by Lins et al [27]. Seven genotyped markers were in Hardy-Weinberg equilibrium (data not shown).

To verify if there were differences in ancestry proportions among normal and AD patients, the non-parametric Mann-Whitney test was performed and significant differences were observed for all ancestries analyzed. European and African ancestry proportions were significantly higher for AD patients whilst the Amerindian ancestry proportion was lower (Table 2).

To assess the possible interplay between severity of cognitive decline in AD subjects and ancestry proportions, a parametric assay and a correlation test were used to compare variations in MMSE and CDR scores across quartiles of each background investigated, excluding the possible interference of the baseline scores and of the presence of the e4 allele in the results. All requirements to perform ANCOVA were achieved, except for Amerindian ancestry, which needed the Spearman's test to accomplish a similar assay. For the other ancestries, the Pearson correlation test was run as well (Figure 1). The only significant association found in these analyses was between dMMSE and Amerindian ancestry ($r = 0.1$; $p = 0.03$). This positive correlation indicates that a higher proportion of Amerindian ancestry may lead to lower decline in MMSE. No similar trend could be observed for CDR scores.

Discussion

The present study has shown that there are significant differences in genetic ancestry proportions between AD patients and non-cognitively impaired subjects, with AD patients having higher European and African ancestry proportions than normal subjects. On the other hand, cognitively normal older adults displayed a greater proportion of Amerindian ancestry, which could indicate that Amerindian allelic architecture could confer protection against the development of the disease, whereas African and European background could be more predictive of evolving this form of dementia. The only research published so far that uses AIMs to investigate association between genetic origins and AD, was made by Schlesinger and co-workers [22]. According to their report, African ancestry protects against Alzheimer's disease-related neuropathology. Nonetheless, their analysis was designed to differentiate European-only ancestry from admixed individuals, which could have hidden the Amerindian contribution. Moreover, our design do not rule out possible interference of the cultural legacy inherent to the overall background of the subjects in study.

The MMSE test is a well-known screening test to detect cognitive impairment. Differences in MMSE scores observed in two moments can be clinically useful to verify cognitive improvement or decline, and can also indicate when a cognitive disorder surfaces [33]. Here we used the difference between the final and the initial MMSE statuses to check if ancestry proportions could be related to any cognitive change. A higher proportion of Amerindian ancestry was associated to smaller decline in MMSE scores throughout one year of follow up. Thus, we can suppose that Amerindian genome gives better capacity to improve the brain activity. There is no data available in the literature that can support this assumption. Weiner and co-workers [34] studied American natives and reported that subjects with Native American heritage $\geq 50\%$ had higher scores in MMSE when compared to subjects with less than 50% of Native American heritage; however this difference was not statistically

significant. A similar analysis employing the CDR test, used for staging the severity of the demented condition, revealed that none of the ancestries seemed related to the levels of variations in CDR scores. Despite apparently counterintuitive, the fact that differences in the MMSE test were not paralleled by variation in CDR scores when the Amerindian ancestry was analyzed probably derived from the lower sensibility of CDR to detect small cognitive variations in a short period of time, as occurred here.

Differences in gender distribution between affected and non-affected individuals probably derived from cultural aspects concerning women's health perception [1, 35, 36]. It could also be due to a higher life expectancy of Brazilian women [36]. Late onset Alzheimer's disease typically occurs after 65 years [37, 38], when symptoms are more evident. Trying to detect initial forms of dementia, our cohort involved individuals aged 60 year or older. These in part could explain the difference in age and gender observed between normal and demented groups. Despite these discrepancies renders important confounding factor, age and gender generated regressions with non-homogeneous slopes, and could not be controlled in our analysis of covariance [39]. Another variable found to be different among groups is DBP, that is lower in AD affected individuals. Meanwhile our results are discordant with those of Morris [40], who found in a biracial study with older people, that there is a suggestion of increased AD prevalence among persons with high diastolic pressure. Thus, founded results could not have great influence in our correlations analysis once lower DBP is not a risk factor for AD development.

Concerning the ancestry markers, those selected in this study were previously tested for Brazilian population [27]. After genotyping, some of them were revealed in Hardy-Weinberg disequilibrium, what may reflect the high degree of stratification of our population owing to the recent formation of the admixed Brazilian contingent [27, 41, 42]. A bias akin to almost all Brazilian-based genetic ancestry studies concerns that Amerindian informative

markers usually reflect the native North American population. Wang [43] showed that, when natives from Americas are compared among each other, the North America Natives is the group that most differs with Eastern South America Natives. Meanwhile we reinforce that the AIMS utilized here have high allelic frequency differences between parental populations, so this can reduce the present bias.

There are important limitations to acknowledge in this study. As a descriptive study using a convenience sample, it cannot draw causal inferences about the variables under consideration. Furthermore, the nature of our sample, which is likely to include a degree of self-selection bias, may preclude generalization of our descriptive and inferential data to the overall population. Moreover, despite this study tends to pose a contribution by controlling the influence of the important e4 allele of the Apo E gene, other remarkable interferences as those related to the pharmacotherapy and the sociocultural background of the individuals were not considered herein.

Conclusions

Our findings suggest that Amerindians could have a protective genetic architecture that can help avoiding the development of AD. We also reported that AD patients with higher proportions of Amerindian ancestry have lower decrease in cognitive function scored by MMSE. Therefore, more investigations are necessary to confirm this hypothesis and perhaps find in Amerindian population the cause and/or a target for this form of dementia.

Acknowledgments

This work was supported by FAPDF (grant # 193.000.449-2008), Finatec/UnB (grant #

5563/2009) and DPP/UnB (UnBDoc 121696/2011) to O.T. Nóbrega. Dr. R.W. Pereira was supported by a fellowship for productivity in research from CNPq.

References

- 1 International. AsD: World alzheimer report, 2011, 3.
- 2 Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA: Alzheimer disease. *Dis Mon* 2010;56:484-546.
- 3 Kertesz A, Mohs RC: Cognition; in Gauthier S (ed) *Clinical diagnosis and management of alzheimer's disease*. London, Martin Dunitz, 2001, pp 179-196.
- 4 Caramelli P, Barbosa MT: Como diagnosticar as quatro causas mais frequentes de demência. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 2002;24:7-10.
- 5 Almkvist O, Winblad B: Early diagnosis of alzheimer dementia based on clinical and biological factors. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1999;249 Suppl 3:3-9.
- 6 Smith MA: Alzheimer disease. *Int Rev Neurobiol* 1998;42:1-54.
- 7 McKee AC, Cantu RC, Nowinski CJ, Hedley-Whyte ET, Gavett BE, Budson AE, Santini VE, Lee HS, Kubilus CA, Stern RA: Chronic traumatic encephalopathy in athletes: Progressive tauopathy after repetitive head injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009;68:709-735.
- 8 Choudhry S, Coyle NE, Tang H, Salari K, Lind D, Clark SL, Tsai HJ, Naqvi M, Phong A, Ung N, Matallana H, Avila PC, Casal J, Torres A, Nazario S, Castro R, Battle NC, Perez-Stable EJ, Kwok PY, Sheppard D, Shriver MD, Rodriguez-Cintron W, Risch N, Ziv E, Burchard EG: Population stratification confounds genetic association studies among latinos. *Hum Genet* 2006;118:652-664.
- 9 Tian C, Gregersen PK, Seldin MF: Accounting for ancestry: Population substructure and genome-wide association studies. *Hum Mol Genet* 2008;17:R143-150.

- 10 Paschou P, Ziv E, Burchard EG, Choudhry S, Rodriguez-Cintron W, Mahoney MW, Drineas P: Pca-correlated snps for structure identification in worldwide human populations. *PLoS Genet* 2007;3:1672-1686.
- 11 Shriver MD, Smith MW, Jin L, Marcini A, Akey JM, Deka R, Ferrell RE: Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. *Am J Hum Genet* 1997;60:957-964.
- 12 McKeigue PM, Carpenter JR, Parra EJ, Shriver MD: Estimation of admixture and detection of linkage in admixed populations by a bayesian approach: Application to african-american populations. *Ann Hum Genet* 2000;64:171-186.
- 13 Drineas P, Lewis J, Paschou P: Inferring geographic coordinates of origin for europeans using small panels of ancestry informative markers. *PLoS One* 2010;5:e11892.
- 14 Nassir R, Kosoy R, Tian C, White PA, Butler LM, Silva G, Kittles R, Alarcon-Riquelme ME, Gregersen PK, Belmont JW, De La Vega FM, Seldin MF: An ancestry informative marker set for determining continental origin: Validation and extension using human genome diversity panels. *BMC Genet* 2009;10:39.
- 15 Kosoy R, Nassir R, Tian C, White PA, Butler LM, Silva G, Kittles R, Alarcon-Riquelme ME, Gregersen PK, Belmont JW, De La Vega FM, Seldin MF: Ancestry informative marker sets for determining continental origin and admixture proportions in common populations in america. *Hum Mutat* 2009;30:69-78.
- 16 Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD: Color and genomic ancestry in brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:177-182.

- 17 Royal CD, Novembre J, Fullerton SM, Goldstein DB, Long JC, Bamshad MJ, Clark AG: Inferring genetic ancestry: Opportunities, challenges, and implications. *Am J Hum Genet* 2010;86:661-673.
- 18 Venketasubramanian N, Sahadevan S, Kua EH, Chen CP, Ng TP: Interethnic differences in dementia epidemiology: Global and asia-pacific perspectives. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2010;30:492-498.
- 19 Tang MX, Maestre G, Tsai WY, Liu XH, Feng L, Chung WY, Chun M, Schofield P, Stern Y, Tycko B, Mayeux R: Relative risk of alzheimer disease and age-at-onset distributions, based on apoe genotypes among elderly african americans, caucasians, and hispanics in new york city. *Am J Hum Genet* 1996;58:574-584.
- 20 Murrell JR, Price B, Lane KA, Baiyewu O, Gureje O, Ogunniyi A, Unverzagt FW, Smith-Gamble V, Gao S, Hendrie HC, Hall KS: Association of apolipoprotein e genotype and alzheimer disease in african americans. *Arch Neurol* 2006;63:431-434.
- 21 Ogunniyi A, Baiyewu O, Gureje O, Hall KS, Unverzagt F, Siu SH, Gao S, Farlow M, Oluwole OS, Komolafe O, Hendrie HC: Epidemiology of dementia in nigeria: Results from the indianapolis-ibadan study. *Eur J Neurol* 2000;7:485-490.
- 22 Schlesinger D, Grinberg LT, Alba JG, Naslavsky MS, Licinio L, Farfel JM, Suemoto CK, de Lucena Ferretti RE, Leite RE, de Andrade MP, Dos Santos AC, Brentani H, Pasqualucci CA, Nitrini R, Jacob-Filho W, Zatz M: African ancestry protects against alzheimer's disease-related neuropathology. *Mol Psychiatry* 2011
- 23 Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, Kohlrausch F, Magno LA, Montenegro RC, Moraes MO, de Moraes ME, de Moraes MR, Ojopi EB, Perini JA, Racciopi C, Ribeiro-Dos-Santos AK, Rios-Santos F, Romano-Silva MA,

Sortica VA, Suarez-Kurtz G: The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011;6:e17063.

24 Gentil P, Lima RM, Lins TC, Abreu BS, Pereira RW, Oliveira RJ: Physical activity, cdx-2 genotype, and bmd. *Int J Sports Med* 2007;28:1065-1069.

25 Gentil P, de Lima Lins TC, Lima RM, de Abreu BS, Grattapaglia D, Bottaro M, de Oliveira RJ, Pereira RW: Vitamin-d-receptor genotypes and bone-mineral density in postmenopausal women: Interaction with physical activity. *J Aging Phys Act* 2009;17:31-45.

26 Moreno Lima R, Silva de Abreu B, Gentil P, Cesar de Lima Lins T, Grattapaglia D, Pereira RW, Jaco de Oliveira R: Lack of association between vitamin d receptor genotypes and haplotypes with fat-free mass in postmenopausal brazilian women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007;62:966-972.

27 Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Grattapaglia D, Pereira RW: Genetic composition of brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative snps. *Am J Hum Biol* 2009;22:187-192.

28 Donohoe GG, Salomaki A, Lehtimaki T, Pulkki K, Kairisto V: Rapid identification of apolipoprotein e genotypes by multiplex amplification refractory mutation system pcr and capillary gel electrophoresis. *Clin Chem* 1999;45:143-146.

29 Tsai HJ, Choudhry S, Naqvi M, Rodriguez-Cintron W, Burchard EG, Ziv E: Comparison of three methods to estimate genetic ancestry and control for stratification in genetic association studies among admixed populations. *Hum Genet* 2005;118:424-433.

30 Bonilla C, Parra EJ, Pfaff CL, Dios S, Marshall JA, Hamman RF, Ferrell RE, Hoggart CL, McKeigue PM, Shriver MD: Admixture in the hispanics of the san luis valley, colorado, and its implications for complex trait gene mapping. *Ann Hum Genet* 2004;68:139-153.

- 31 Fernandez JR, Shriver MD, Beasley TM, Rafla-Demetrious N, Parra E, Albu J, Nicklas B, Ryan AS, McKeigue PM, Hoggart CL, Weinsier RL, Allison DB: Association of african genetic admixture with resting metabolic rate and obesity among women. *Obes Res* 2003;11:904-911.
- 32 Shriver MD, Mei R, Parra EJ, Sonpar V, Halder I, Tishkoff SA, Schurr TG, Zhadanov SI, Osipova LP, Brutsaert TD, Friedlaender J, Jorde LB, Watkins WS, Bamshad MJ, Gutierrez G, Loi H, Matsuzaki H, Kittles RA, Argyropoulos G, Fernandez JR, Akey JM, Jones KW: Large-scale snp analysis reveals clustered and continuous patterns of human genetic variation. *Hum Genomics* 2005;2:81-89.
- 33 Doody RS, Pavlik V, Massman P, Rountree S, Darby E, Chan W: Predicting progression of alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2010;2:2.
- 34 Weiner MF, Rosenberg RN, Svetlik D, Hynan LS, Womack KB, White C, 3rd, Good S, Fuller C, Wharton D, Richter R: Comparison of alzheimer's disease in native americans and whites. *Int Psychogeriatr* 2003;15:367-375.
- 35 Barreto SM, Giatti L, Kalache A: Gender inequalities in health among older brazilian adults. *Rev Panam Salud Publica* 2004;16:110-117.
- 36 Parayba MI: Desigualdades de genero em saúde entre idosos no brasil. Caxambú (MG), 2006, pp 11.
- 37 Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E: Epidemiology of alzheimer's disease: Occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci* 2009;11:111-128.
- 38 Alzheimer's Association: Alzheimer's Disease Facts and Figures, Alzheimer's & Dementia 2009; 5 (3).

- 39 Kutner MH, et al: Applied linear statistical model, ed 5. New York (NY), McGraw-Hill Irwin, 2005.
- 40 Morris MC, Scherr PA, Hebert LE, Bennett DA, Wilson RS, Glynn RJ, Evans DA: The cross-sectional association between blood pressure and alzheimer's disease in a biracial community population of older persons. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2000;55:M130-136.
- 41 Falush D, Stephens M, Pritchard JK: Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 2003;164:1567-1587.
- 42 Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P: Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 2000;155:945-959.
- 43 Wang S, Lewis CM, Jakobsson M, Ramachandran S, Ray N, Bedoya G, Rojas W, Parra MV, Molina JA, Gallo C, Mazzotti G, Poletti G, Hill K, Hurtado AM, Labuda D, Klitz W, Barrantes R, Bortolini MC, Salzano FM, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT, Llop E, Rothhammer F, Excoffier L, Feldman MW, Rosenberg NA, Ruiz-Linares A: Genetic variation and population structure in native americans. *PLoS Genet* 2007;3:e185.
- 44 Shriver MD, Parra EJ, Dios S, Bonilla C, Norton H, Jovel C, Pfaff C, Jones C, Massac A, Cameron N, Baron A, Jackson T, Argyropoulos G, Jin L, Hoggart CJ, McKeigue PM, Kittles RA: Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. *Hum Genet* 2003;112:387-399.
- 45 Smith MW, Patterson N, Lautenberger JA, Truelove AL, McDonald GJ, Waliszewska A, Kessing BD, Malasky MJ, Scafe C, Le E, De Jager PL, Mignault AA, Yi Z, De The G, Essex M, Sankale JL, Moore JH, Poku K, Phair JP, Goedert JJ, Vlahov D, Williams SM, Tishkoff SA, Winkler CA, De La Vega FM, Woodage T, Sninsky JJ, Hafler DA, Altshuler D,

Gilbert DA, O'Brien SJ, Reich D: A high-density admixture map for disease gene discovery in african americans. *Am J Hum Genet* 2004;74:1001-1013.

46 Pedrosa MAF: Composição genética de quatro populações remanescentes de quilombos do brasil com base em microssatélites e marcadores de ancestralidade.: *Biologia Celular*. Brasília, Universidade de Brasília, 2006, Master,

TABLES

Table A: Description of the ancestry informative markers, their alleles, chromosome positions and frequencies in parental population (European (EUR), African (AFR) and Amerindian (AMR)).

Locus	Chromosome position	Alleles	Frequencies		
			EUR	AFR	AMR
rs730570	14q32	A	0.860	0.185	0.100
rs3796384	3p14	C	0.154	0.783	0.875
rs803733	9q33	C	0.880	0.015	0.411
rs1426654	15q21	C	0.000	0.980	0.950
rs734780	15q26	C	0.070	0.710	0.854
rs2814778	1q23	C	0.998	0.001	1.000
rs1129038	15q13	C	0.224	0.995	0.983
rs1240709	1p36.3	A	0.794	0.036	0.103
rs2278354	5p15.2	G	0.120	0.704	0.839
rs2065160	1q32	C	0.078	0.512	0.850
rs4305737	6q24	A	0.250	0.929	1.000
rs3138521	1q25	Insertion	0.282	0.858	0.061

Font: Shriver [44]; Smith [45].

Table B: Concentration of primers used at PCR and single-base extension reactions for genotyping ancestry informative markers and their respective multiplex sets.

Primers	at PCR (μM)	at single-base extension (μM)	Multiplex Set
rs730570	0.2	0.55	1
rs3796384	0.2	0.7	1
rs803733	0.4	0.8	1
rs1426654	0.2	0.4	1
rs734780	0.3	0.8	1
rs2814778	0.2	0.7	2
rs1129038	0.2	0.8	2
rs1240709	0.2	0.55	2
rs2278354	0.2	0.55	2
rs2065160	0.2	0.55	2
rs4305737	0.2	0.65	2
rs3138521	0.5	-	-

Font: the author; Pedrosa [46].

Table 1: Comparison of continuous and categorical variables across AD patients and non-demented subjects.

Variable	AD (n= 120)			Normal (n= 412)			Total (n=532)			p^*
	Median	Mode	Min/Max	Median	Mode	Min/Max	Median	Mode	Min/Max	
Age (years)	79	77	59/90	69	74	53/96	72	74	53/96	<.001
WC (cm)	93.3	93.3	69/128	90.4	90.3	59/131	91	90.3	59/131	0.53
SBP (mmHg)	130	120	100/200	140	140	70/210	135	140	70/210	0.80
DBP (mmHg)	80	80	60/110	80	80	40/120	80	80	40/120	<.01
	n	%		n	%		n	%		p^+
Male	41	34.2		48	11.6		89	16.7		<.001
e4 carriers	57	47.5		81	19.7		138	25.9		<.001

* Significance verified by the Mann-Whitney test. ⁺ Significance verified the Chi-Square test.

Table 2: Comparison of mean levels of genetic ancestry between groups.

Ancestry	AD			Normal			p^*
	Median (%)	Mode	Min/Max	Median (%)	Mode	Min/Max	
European	62	74	0/96	57	56	0/98	0.001
African	33.5	26	0/77	29	0	0/100	0.005
Amerindian	0	0	0/71	11	0	0/73	<.001

* Significance verified by the Mann-Whitney test.

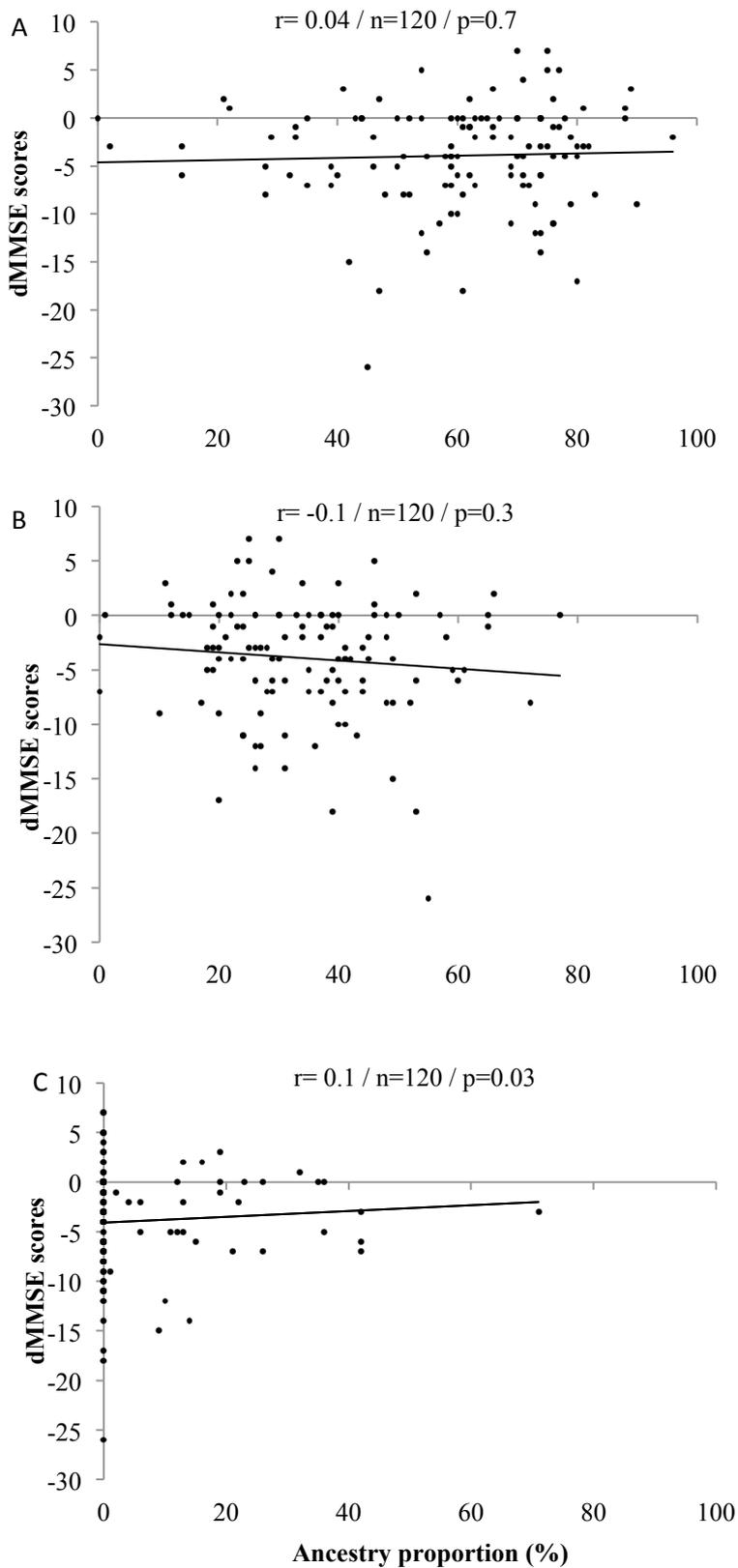


Figure 1: Correlation of dMMSE scores from AD patients with genetic proportions from European (A), African (B) and Amerindian (C) ancestries.