

# POLIMORFISMO DA APOLIPOPROTEÍNA E NOS FAMILIARES EM PRIMEIRO GRAU DE PACIENTES COM DOENÇA DE ALZHEIMER FAMILIAL OU ESPORÁDICA

João de Castilho Cação<sup>1</sup>, Dorotéia Rossi Silva Souza<sup>2</sup>, Waldir Antonio Tognola<sup>3</sup>, Maria Regina Pereira de Godoy<sup>4</sup>, Marcela Augusta de Souza Pinhel<sup>5</sup>

**RESUMO** - *Introdução:* A apolipoproteína E (apo E) é reconhecida como fator de risco para doença de Alzheimer (DA). *Objetivo:* Analisar o polimorfismo da apo E nos familiares em primeiro grau de pacientes com DA familiar ou esporádica do tipo tardio, comparando a famílias sem DA. *Método:* Foram estudados 40 pacientes com DA familiar ou esporádica do tipo tardio, sendo os grupos classificados como provável, segundo critérios da NINCS-ADRDA. *Resultado:* O alelo  $\epsilon 3$  foi o mais freqüente em todos os grupos. Observou-se freqüência mais elevada de  $\epsilon 4$  comparando os familiares dos probandos aos do grupo controle ( $p < 0,0001$ ). O alelo  $\epsilon 2$  mostrou diferença significativa apenas entre familiares do grupo controle e DA familiar ( $p = 0,026$ ). *Conclusão:* O polimorfismo da apo E não diferencia DA familiar da esporádica. O estudo de famílias permite amplificar a representatividade dos alelos  $\epsilon 2$  e  $\epsilon 4$ , revelando, seu valor como fator protetor e de risco para DA, respectivamente.

**PALAVRAS-CHAVE:** doença de Alzheimer, apolipoproteína E, demência, genética.

## **Apolipoprotein E polymorphism in first-degree relatives of patients with familial or sporadic Alzheimer's disease**

**ABSTRACT** - *Introduction:* Apolipoprotein E (apo E) has been recognized as a risk factor for Alzheimer disease (AD). *Objective:* To analyze apo E polymorphism in first-degree relatives of patients with familial or sporadic late-onset AD comparing with families without AD. *Method:* Forty patients with familial or sporadic late-onset of AD, being both groups classified as probable, according of NINCS-ADRDA's criteria. *Results:* Allele  $\epsilon 3$  was the most frequent in all of these groups. Higher frequency of  $\epsilon 4$  when comparing the relatives of the probands with the relatives of the control group ( $p < 0,0001$ ) was observed. Allele  $\epsilon 2$  showed significant difference only between relatives of familial AD and relatives of control group ( $p = 0,026$ ). *Conclusion:* Apo E polymorphism has not differentiated familial from sporadic AD. The study of families allows to amplify the alleles  $\epsilon 2$  and  $\epsilon 4$  representativity, revealing, their value as protecting factor and of risk for AD, respectively.

**KEY WORDS:** Alzheimer disease, apolipoprotein E, dementia, genetics.

A doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência<sup>1</sup>, sendo a quarta causa mais freqüente de morte em países desenvolvidos<sup>2</sup>. Os critérios diagnósticos mais empregados para DA são da Associação Psiquiátrica Americana: DSM-IV<sup>3</sup>, além de critérios propostos por um grupo de trabalho do Instituto Nacional de Neurologia dos EUA (NINCDS-ADRDA)<sup>4</sup>. A DA tardia é reconhecida pelos sintomas

com início aos 65 anos de idade ou mais, e corresponde a aproximadamente 95% do total de casos. Há evidências da associação entre o alelo  $\epsilon 4$  do gene para apolipoproteína E (apo E), mapeado no cromossomo 19q13.2 humano, com a doença. Por outro lado, a herança do alelo  $\epsilon 2$  parece reduzir o risco e retardar o aparecimento de DA atuando como efeito protetor<sup>5</sup>.

---

Departamento de Medicina I, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto SP, Brazil (FAMERP): <sup>1</sup>Médico Geriatra da Disciplina de Clínica Médica - FAMERP, Coordenador do Programa de Residência Médica em Geriatria e Gerontologia - FAMERP; <sup>2</sup>Geneticista, Docente da Disciplina de Bioquímica e Biologia Molecular - FAMERP; <sup>3</sup>Livre Docente, Docente do Departamento de Neurociências - FAMERP; <sup>4</sup>Mestre, Docente da Disciplina de Clínica Médica - FAMERP; <sup>5</sup>Mestre, Bióloga da Disciplina de Bioquímica e Biologia Molecular - FAMERP.

Recebido 4 Julho 2006, recebido na forma final 6 Dezembro 2006. Aceito 24 Janeiro 2007.

Dr. João de Castilho Cação - Avenida Juscelino K. de Oliveira 3000 / casa 67 - 15091-450 São José do Rio Preto SP - Brasil. E-mail: jccacao@terra.com.br

Aproximadamente 15% dos casos de DA têm história familiar positiva<sup>6,7</sup>. Farrer et al.<sup>8</sup>, em estudo de meta-análise, confirmaram associação entre DA e alelo  $\epsilon 4$  na população hispânica. Em países da América Latina, também foi detectada tal associação<sup>9</sup>. Dados semelhantes foram encontrados em estudos brasileiros, com frequência alélica para apo  $\epsilon 4$  reduzida nos pacientes com DA do tipo tardio em relação aos países do hemisfério norte<sup>10-17</sup>. Entre outros fatores, além da etnia, questionou-se a interferência do número das casuísticas na análise de polimorfismos genéticos. Nesse contexto, o estudo da apo E em família a rede de pacientes com DA propõe a genotipagem de maior número de indivíduos com fator genético semelhante ao probando, possibilitando ampliar a resposta genética, e revelar a real associação do polimorfismo da apo E e DA na população.

Este estudo teve como objetivos: (1) analisar o polimorfismo genético da apo E em pacientes com DA do tipo tardio familiar comparado a DA esporádica e idosos sem a doença, e em seus familiares.

## MÉTODO

Os genótipos para apo E e a frequência de seus alelos foram analisados em 200 indivíduos divididos em seis grupos assim descritos:

- Grupo Familiar (GF) – 20 pacientes com DA do tipo tardio familiar;
- Grupo Esporádico (GE) – 20 pacientes com DA do tipo tardio esporádica;
- Grupo Controle (GC) – 21 idosos sem demência;
- Familiares do Grupo Familiar (FGF) – 56 familiares em primeiro grau do grupo familiar;
- Familiares do Grupo Esporádico (FGE) – 45 familiares em primeiro grau do grupo esporádico;
- Familiares do Grupo Controle (FGC) – 38 familiares em primeiro grau do grupo controle.

Foram selecionados pacientes caucásios, independente do sexo, portadores de DA familiar ou esporádica do tipo tardio e seus familiares em primeiro grau. Os grupos controle constituíram-se de indivíduos de 65 anos ou mais, sem déficit cognitivo e seus familiares. O diagnóstico de DA se baseou em critérios estabelecidos pelo NINCDS-ADRDA<sup>4</sup>.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa CEP/FAMERP (Processo 2222/2000), e todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre Informado.

Os indivíduos foram estudados considerando frequências alélicas e genotípicas para apo E e idade de manifestação da doença. Foi realizada uma coleta de sangue por punção venosa para o estudo de variantes genéticas da apo E, incluindo amplificação do DNA por PCR (*polymerase chain reaction*) (Masterycler - Eppendorf) e análise do polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição (*RFLP*, *restriction*

*fragment length polymorphism*) com enzima *Hha I*.

A análise estatística foi realizada por métodos paramétricos e não paramétricos, conforme a natureza das variáveis envolvidas. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi 5%. Os cálculos estatísticos foram realizados aplicando-se os programas Statxact 5 (Cytel Software Corporation), Splus e Minitab.

## RESULTADOS

Verificou-se predomínio do sexo feminino em todos os grupos. Em relação à idade houve semelhança entre os grupos com DA familiar e esporádica, sendo que ambos apresentaram indivíduos significativamente mais idosos que no grupo controle.

O alelo  $\epsilon 3$  foi o mais freqüente em todos os grupos, variando de 0,73 (FGE) a 0,93 (GC).

O alelo  $\epsilon 4$  mostrou associação significativa com DA familiar ou esporádica. A frequência do alelo  $\epsilon 4$  foi quatro vezes maior nestes grupos (GF=0,22; GE=0,20, respectivamente) em relação ao grupo controle (GC=0,05). Houve prevalência do alelo  $\epsilon 4$  também nos familiares dos probandos (FGF=0,26; FGE=0,24), revelando-se, nesse caso, oito vezes maior que nos familiares dos controles (FGC=0,04;  $p < 0,0001$ ).

A análise de genótipos com pelo menos um alelo  $\epsilon 4$  (Tabela) mostrou frequência de 40% no grupo com DA familiar, 35% com DA esporádica e 9,5% nos controles, resultando em diferença significativa entre os controles e demais grupos ( $p=0,017$ ;  $p=0,034$ , respectivamente). Entretanto, a frequência dos genótipos  $\epsilon 3/\epsilon 4$  não diferenciou os grupos com DA familiar e DA esporádica. Isso foi confirmado nos familiares com genótipos  $\epsilon 3/\epsilon 4$  (Tabela), apresentando prevalência de 52% entre familiares de pacientes com DA familiar e de 46,5% entre familiares de pacientes com DA esporádica, significativamente mais elevada em relação aos controles (8%;  $p < 0,0001$ ); não houve diferença entre os familiares dos probandos ( $p=0,069$ ).

Analisou-se também associação entre presença do alelo  $\epsilon 4$  e idade de início dos sintomas. O grupo dos pacientes com DA familiar e aqueles com DA esporádica, com pelo menos um alelo  $\epsilon 4$ , mostraram leve precocidade para o início dos sintomas ( $72,8 \pm 7,6$  e  $73,0 \pm 6,6$  anos, respectivamente), em relação aqueles sem o alelo  $\epsilon 4$ , cujo início ocorreu aos  $74,6 \pm 7,6$  e  $75,0 \pm 6,6$  anos, respectivamente. Entretanto, sem diferença significativa entre pacientes com ou sem alelo  $\epsilon 4$  nos grupos com DA familiar ( $p=0,63$ ) e DA esporádica ( $p=0,53$ ).

Em relação ao alelo  $\epsilon 2$ , embora não detectado no grupo com DA familiar, mostrou-se presente em dois casos (5%) de DA esporádica, e em apenas um (2,5%) controle, mas sem diferença significativa entre os gru-

Tabela. Distribuição quanto a sexo, idade, frequências alélicas do gene para apolipoproteína E e frequência genotípica de acordo com a presença do alelo  $\epsilon 4$  ( $\epsilon 4\epsilon$ ) ou sua ausência ( $\epsilon 3\epsilon$ ) em pacientes com doença de Alzheimer do tipo familiar (GF) ou esporádica (GE), controles (GC) e seus familiares (fGF, fGE, fGC), respectivamente.

	Sexo		Idade		Alelos (n/freq.alelos)			Genótipos (n/freq.absoluta)	
	Masc	Fem	Anos (média)	p	$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$	$\epsilon 4\epsilon$	$\epsilon 3\epsilon$
GC	5	16	71,7 <sup>a</sup>	4,5	1/0,024	39/0,93 <sup>d</sup>	2/0,048 <sup>f</sup>	2/9	19/91
GE	5	15	78,8 <sup>b</sup>	6,7	2/0,05	30/0,75 <sup>c</sup>	8/0,20 <sup>e</sup>	7/35	13/65
GF	6	14	80,9 <sup>b</sup>	7	0/0	31/0,78 <sup>c,d</sup>	9/0,22 <sup>e</sup>	8/40	12/60
fGC	13	25	43 <sup>a'</sup>	7	4/0,05 <sup>d'</sup>	69/0,91 <sup>f'</sup>	3/0,04 <sup>h</sup>	3/8	35/92
fGE	11	34	53 <sup>b'</sup>	10	2/0,02 <sup>c'd'</sup>	66/0,73 <sup>f'</sup>	22/0,24 <sup>g</sup>	21/46	25/54
fGF	15	41	41 <sup>b'</sup>	13	0/0 <sup>c'</sup>	82/0,73 <sup>e'</sup>	30/0,27 <sup>g</sup>	29/52	27/48

Teste de Tukey; a,b=índices válidos para teste de Tukey entre GC, GE e GF; a',b'=índices para fGC, fGE e fGF; DP=desvio padrão. a $\neq$ b-p<0,05; a' $\neq$ b'-p<0,05. Teste de Fischer 2X2; c,d,e,f=índices válidos para GC,GE e GF; c $\neq$ d-p<0,05; e $\neq$ f-p<0,05. c',d',e',f',g, h=índices válidos para fGC, fGE e fGF; c' $\neq$ d'-p<0,05; e' $\neq$ f'-p<0,05; g $\neq$ h-p<0,05. Teste t de Student para genótipos; GCXGF-p=0,017; GCXGE-p=0,034; GEXGF-p=1; fGCxfGF-p=0,0000; fGCxfGE-p=0,0005; fGEXfGF-p=0,63.

pos (Tabela). Entretanto, o alelo  $\epsilon 2$  apresentou prevalência significativamente mais elevada nos familiares de controles (0,053), comparado aos familiares de pacientes com DA familiar que não apresentaram esse alelo (p=0,026; Tabela), sugerindo seu efeito protetor para a doença.

## DISCUSSÃO

A maior prevalência do sexo feminino foi similar a de outros autores<sup>18-20</sup>. Isto pode ser explicado pela maior expectativa de vida das mulheres elevando sua proporção entre os idosos, associa-se a isso a maior sobrevivência das mulheres acometidas por DA em relação aos homens. A idade foi semelhante entre os grupos com DA familiar e DA esporádica e diferiu quando comparados ao grupo controle. É importante o fato de a idade não diferir entre os grupos de probandos (DA familiar ou esporádica), pois o polimorfismo da apo E parece influenciar a gravidade e progressão da doença, e a idade de manifestação dos sintomas.

O polimorfismo da apo E não diferencia DA familiar e DA esporádica, sendo que ambos os tipos mostram associação com o alelo  $\epsilon 4$ .

A associação significativa para o alelo  $\epsilon 4$  e DA familiar ou esporádica é semelhante a de outros estudos brasileiros<sup>10,13,14,17</sup>, e mostra resultados concordantes também com outros envolvendo populações do Hemisfério Sul<sup>9</sup>. Nesse estudo, apesar da associação do alelo  $\epsilon 4$  com DA familiar e esporádica, indistintamente, sua frequência tanto em pacientes com DA, quanto em controles é menor que aquela observada em estudos envolvendo população de países do Hemisfério Norte.

Em estudos de polimorfismos genéticos o tamanho da amostra deve ser valorizado<sup>12</sup>. Familiares em primeiro grau de probandos, portanto indivíduos com fator genético herdado e provavelmente semelhante ao de seus ascendentes, permitem ampliar a casuística. No presente estudo a casuística de 61 indivíduos que compunham os três grupos iniciais, ampliou-se para 200 indivíduos, somados os 139 familiares. Portanto, ainda que apenas 40 indivíduos sejam portadores de DA, esperava-se que seus familiares em primeiro grau, tendo a possibilidade de possuir constituição genética semelhante, permitisse ampliar a casuística e expandir a distribuição dos alelos, confirmando a associação do polimorfismo da apo E com a doença. Nesse contexto, detectou-se frequência do alelo  $\epsilon 4$  oito vezes maior nos familiares dos probandos (FGF=0,26; FGE=0,24) que nos familiares dos controles (FGC=0,04; p<0,0001; Tabela). Notou-se ampliação da resposta genética, considerando a frequência do alelo  $\epsilon 4$  mais acentuada entre os familiares dos probandos, que nos próprios pacientes. O estudo de familiares em primeiro grau de pacientes com DA pode tornar-se uma estratégia para aumentar a casuística, auxiliando na detecção da real prevalência do polimorfismo da apo E como fator de risco para DA familiar ou esporádica.

A análise de genótipos com pelo menos um alelo  $\epsilon 4$  mostrou semelhança entre os grupos com DA familiar ou esporádica, sendo ambos diferentes do grupo controle. Isso foi confirmado nos grupos de familiares. Nesse caso, constatou-se também ampliação da resposta genética herdada de seus antecessores. Corder et al.<sup>21</sup> mostraram que 80% dos casos de DA familiar e 64% dos casos de DA esporádica apresentam genótipo com pelo menos um alelo  $\epsilon 4$ , comparado a 31% em grupo controle sem a doença.

Comparando nossos resultados com os da referida citação nota-se freqüência acentuadamente menor em todos os grupos, refletindo provavelmente o papel da etnia na freqüência e expressão do polimorfismo genético da apo E.

A associação entre presença do alelo  $\epsilon 4$  e idade de início dos sintomas não foi significativa nos grupos com DA. Nesse caso, questiona-se o número reduzido da amostra, considerando que esses resultados contrastam com a maioria dos estudos realizados no Hemisfério Norte<sup>21-23</sup>. Com relação ao alelo  $\epsilon 2$ , houve diferença significativa apenas entre os familiares do grupo controle comparado aos familiares do grupo com DA familiar, sugerindo efeito protetor para a doença. Vários autores<sup>5,14,22</sup> mostraram baixa freqüência do alelo  $\epsilon 2$  em grupos sem a doença (0,003 a 0,13) e menores ainda em pacientes com DA (0,01 a 0,10), reforçando a associação entre o alelo  $\epsilon 2$  e o baixo risco para DA. Também neste caso o estudo de familiares em primeiro grau de pacientes com DA, permitiu ampliar a representatividade do alelo  $\epsilon 2$  e mostrar seu valor como fator protetor. O alelo  $\epsilon 3$  foi o mais prevalente, independente da presença de DA. Esses dados são semelhantes aos obtidos para a população caucasóide em geral<sup>8,9,24-26</sup>. Estudos mostram que apesar do alelo  $\epsilon 3$  ser o mais prevalente, inclusive na DA (0,45 a 0,62), sua freqüência é ainda mais elevada em indivíduos sem a doença (0,74 a 0,86)<sup>14,22,27</sup>. Familiares de pacientes com DA familiar ou esporádica e de controles também mostraram freqüência elevada do alelo  $\epsilon 3$  (0,732; 0,730; 0,907, respectivamente).

Em conclusão, o polimorfismo da apo E, não diferencia DA familiar e DA esporádica, mostrando em ambas associação com o alelo  $\epsilon 4$ . A distribuição dos alelos para apo E nos pacientes com DA e idosos sem a doença determina sua prevalência nos seus familiares em primeiro grau, ampliando sua representatividade a partir do aumento da casuística. O estudo de famílias possibilita avaliar a distribuição de alelos raros como  $\epsilon 2$ , sugerindo seu efeito protetor para DA familiar, tendo em vista sua maior representatividade em familiares de controles, comparado a DA familiar e seus familiares.

**Agradecimentos** – Ao Prof. Dr. José Antonio Cordeiro pelas orientações nas análises estatísticas. A Zélia Cristina Régis Brazolin, bibliotecária, pela colaboração no levantamento de dados e revisão bibliográfica.

## REFERÊNCIAS

- Cooper B. The epidemiology of primary degenerative dementia e related neurological disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1991;240:223-233.
- Clark RF, Goate A. Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 1993; 50:1164-1172.
- American Psychiatric Association, Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4.Ed. Washington, DC: American Psychiatric Association, 1994.
- Mckhan G, Dachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Standlan EM. 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* 1984; 34:939-944.
- Roses AD. Apolipoprotein E genotyping in the differential diagnosis, not prediction, of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1995;38:6-14.
- Mortimer JA. Epidemiology of dementia. *American Academy of Neurology. Annual Meeting Courses* 1994;4:9-17.
- Nixon RA, Mathews PM, Cataldo AM. The neuronal endosomal-lysosomal system in Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* 2001;3:97-107.
- Farrer LA, Cupples A, Haines JL, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. *JAMA* 1997;278:1349-1356.
- Jacquier M, Arango D, Villareal E, et al. Apo  $\epsilon 4$  and Alzheimer's disease. positive association in a Colombian clinical series and review of the Latin-American studies. *Arq Neuropsiquiatr* 2001;59:11-17.
- Bahia VS, Kok F, Marie SK, Caramelli P, Nitri R. Polimorfismo dos genes da apolipoproteína E e de sua região promotora e da proteína relacionada ao receptor LDL em pacientes com doença de Alzheimer e controles: resultados preliminares. *Arq Neuropsiquiatr* 2001;59(Supl 3):S27.
- Oliveira JR, Lima JR Filho, Shimokomaki CM, et al. The use of apolipoprotein E genotype for preclinical detection of risk's group for Alzheimer's disease. *Am J Med Genet* 1997;74:216-217.
- Souza DRS, Tajara E, Tognola W, Godoy MRP, Brandão AC, Sidney PI. Polimorfismo da apolipoproteína E na doença de Alzheimer tipo tardio: resultados preliminares. *Rev Psiq Clín (São Paulo)* 1998;25:98-103.
- Almeida OP, Shimokomaki CM. Apolipoprotein  $\epsilon 4$  and Alzheimer's disease in São Paulo-Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 1997;55:1-7.
- Larrandaburu M, Andrade FM, Callegari-Jacques SM, Gastaldo G, Hutz MH. Determinação das variantes alélicas da apo E em pacientes com doença de Alzheimer no Rio Grande do Sul. *Rev Bras Gen* 1997;20 (Supp):S215.
- Andrade FM, Larrandaburu M, Callegari-Jacques SM, Gastaldo G, Hutz MH. Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:529-537.
- Cação JC, Scudeler D, Tognola W, et al. Polimorfismo da apolipoproteína E nos familiares em primeiro grau de pacientes com doença de Alzheimer: resultados preliminares. *Arq Neuropsiquiatr* 2001;59(Supl 3): S26.
- Souza DRS, Godoy MRP, Hotta J, et al. Association of apolipoprotein E polymorphism in late-onset Alzheimer's disease and vascular dementia in Brazilians. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:1-5.
- Jorm AF, Jolley D. The incidence of dementia: a meta-analysis. *Neurology* 1998; 51:728-733.
- Godoy MRP. Perfil clínico e demográfico das demências em uma população ambulatorial de um hospital geral. Dissertação de Mestrado. São José do Rio Preto, 1999.
- Herrera E, Caramelli P, Nitri R. Estudo epidemiológico populacional de demência na cidade de Catanduva, estado de São Paulo, Brasil. *Rev Psiquiatr Clín (São Paulo)* 1998;25:70-73.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993;261:921-923.
- Tsai MS, Tangalos EG, Petersen RC, Smith GE, Schaid DJ, Kokmen E. Apolipoprotein E: risk factor for Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 1994;54:643-649.
- Strittmatter WJ, Roses AD. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* 1996;19:53-77.
- Davignon J, Gregg RE, Slings CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988;8:1-21.
- Goedert M, Strittmatter WJ, Roses AD. Alzheimer's disease: risk apolipoprotein in brain. *Nature* 1994;372:45-46.
- Mayeux R, Saunders AM, Shea S, et al. Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease Centers Consortium on Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* 1998;338:506-511.
- Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Granthier S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1993; 342:697-699.