

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DANIELA CAMPOREZ

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS
GENES MTHFR, PICALM, EPHA1, ECA e Cat-D
NA DOENÇA DE ALZHEIMER

VITÓRIA

2014

DANIELA CAMPOREZ

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS
GENES MTHFR, PICALM, EPHA1, ECA e Cat-D
NA DOENÇA DE ALZHEIMER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Flavia de Paula

Co-orientadora: Profa. Dra. Greiciane Gaburro Paneto

DANIELA CAMPOREZ

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS
GENES MTHFR, PICALM, EPHA1, ECA e Cat-D
NA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Avaliada em 20 de fevereiro de 2014.

Profa. Dra. Flavia de Paula
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Profa. Dra. Greiciane Gaburro Paneto
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-orientadora

Prof. Dr. Renato Lírio Morelato
Escola de Ensino Superior da Santa Casa da Misericórdia
Membro Externo

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba
Universidade Federal de Juiz de Fora
Membro Externo

Prof. Dra. Flávia Imbroisi Valle Errera
Escola de Ensino Superior da Santa Casa da Misericórdia
Membro externo

VITÓRIA
2014

AGRADECIMENTOS:

Agradeço primeiramente a Deus por toda a graça, força e amor incondicional de Pai.

A minha família por sempre acreditar em mim, e por fazerem da minha vida uma alegria constante mesmo nos momentos mais difíceis, e claro, nos vários momentos de alegria. Agradeço em especial a meu pai e minha mãe, meus exemplos de bondade, cuidado e amor sem limites. A Marina e Marcela mais que irmãs, partes de mim, obrigada pela paciência, por me ouvirem falar tanto de genes, alelos, mutações e afins, sem entenderem muito bem (mas sempre de uma forma muito carinhosa). Vocês estarão sempre em meu coração.

Ao Du, namorado, amigo, conselheiro que não desistiu de mim, mesmo quando eu não tinha tempo nenhum disponível pra ele.

A Flavia, orientadora, colaboradora, conselheira, professora, que possibilitou a minha continuidade no laboratório de genética humana, trabalhando com a Doença de Alzheimer.

Ao Doutor Renato Morellato, que nos possibilitou um convívio maior e melhor com os idosos.

A professora Greiciane por aceitar ser minha Co-orientadora, e me ajudar na correção da dissertação.

A Leila, uma das maiores bênçãos que eu já recebi, ajuda imprescindível na UFES e na vida, amiga que levarei comigo onde quer que eu vá.

Ao Luciano, parceiro de coleta, extração de DNA, PCRs, almoços, aniversários, brincadeiras, e muito aprendizado.

Aos amigos que souberam entender a minha ausência, mas nunca se esqueceram de mim! Gente, valeu pela espera.

A todos os amigos do laboratório: pessoas vocês são tudo de bom! Amo todos vocês, agradeço em especial a Clara por me aturar nos momentos de desesperos, quando a PCR já padronizada insistia em despadronizar.

Aos amigos de mestrado/laboratório, Lucas, Gabi, Elaine, Lidi, Suzany, Marcelo, Bela, Carol, pela companhia nas disciplinas e nos dias, meses e anos dentro do lab!

A Amábilis, enfermeira na Santa Casa, sem a sua ajuda não conseguiríamos.

E de forma muito especial meu agradecimento de coração, aos idosos, meus velinhos como eu costumo chamar, e seus familiares, por contarem um pouco da sua vida, e confiarem em nós.

RESUMO: A Doença de Alzheimer (DA), patologia neurodegenerativa progressiva do cérebro, caracteriza-se clinicamente pela perda de memória e cognição. O maior fator de risco para o desenvolvimento da doença é a idade avançada, com uma complexa interação de fatores ambientais e genéticos que juntos podem aumentar a incidência da doença. Vários polimorfismos foram estudados para verificar suas relações com a DA em todo mundo. A confirmação de uma associação positiva de um determinado polimorfismo, em diferentes populações, pode contribuir na identificação de genes específicos na causa da doença. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de risco de variações genéticas para a Doença de Alzheimer na população de Vitória – ES. Foram analisados os polimorfismos: rs3851179 do gene MTHFR, rs3851179 do gene PICALM, rs11767557 do gene EPHA1, rs387906576 ECA e rs74315304 Cat-D por meio da técnica de PCR-RFLP em estudo caso: controle. Os polimorfismos dos gene MTHFR e PICALM demonstraram associação positiva com a doença em questão. Para o polimorfismo do gene MTHFR, o genótipo CT mostrou valores estatisticamente significativos ($p=0.030$) sugerindo que o alelo T se comporta como um fator de risco para a Doença de Alzheimer na população de Vitória-ES, entretanto com um efeito pequeno na etiologia da doença. O gene MTHFR desempenha um papel central no metabolismo do folato (ácido fólico) e da homocisteína, componentes importantes para o funcionamento do sistema nervoso central em todas as idades. Variações polimórficas nesse gene podem diminuir a atividade enzimática, aumentando a chance no desenvolvimento da DA. O polimorfismo GG do gene PICALM mostrou estar estatisticamente associado com a DA ($p=0.033$). A proteína PICALM é expressa em todos os tecidos, com maior expressão detectável nos neurônios onde se encontra distribuída nas estruturas das fendas sinápticas. Já os polimorfismos dos genes de Cat-D, ECA e EPHA1, não demonstraram associação estatística significativa para a DA na população de Vitória – ES. Com esses resultados nosso conhecimento acerca de alelos de risco para a DA aumenta, possibilitando a criação de um perfil genético de susceptibilidade para a população estudada.

Palavras Chave: Doença de Alzheimer, MTHFR, PICALM, polimorfismo, população capixaba.

ABSTRACT: *Alzheimer Disease (AD) is progressive neurodegenerative pathology in brain that is clinically characterized by the loss of memory and cognition. The major risk factor to the development of the disease is advanced age, with a complex interaction of environment and genetic factors that together can increase the incidence of the disease. Several polymorphisms were studied to verify their relations with AD all over the world. The confirmation of a positive association of a determined polymorphism in different populations can contribute to the identification of specific genes that cause the disease. This study had as its aim to evaluate the potential risk of the genetic variations to the Alzheimer Disease in the population of Vitória-ES. The polymorphisms rs3851179 of the MTHFR gene, rs3851179 of the PICALM gene, rs11767557 of the EPHA1 gene, rs387906576 ECA and rs74315304 Cat-D were analyzed through the technique of PCR-RFLP in a case: control study. The polymorphisms of the genes MTHFR and PICALM demonstrated a positive association with the disease in question. To the polymorphism of the MTHFR gene, the genotype CT showed statistically significant values ($p= 0.030$) suggesting that the T allele behaves itself as a factor of risk to the disease in the population of Vitória-ES. However, with a small effect on the etiology of the disease. The MTHFR gene has a central role in the metabolism of the folate (acid folic) and homocystein, important components to the functioning of the central nervous system in all ages. Polymorphism variations in this gene can diminish the enzymatic activity increasing the chance in the AD development. The polymorphism GG of the PICALM gene showed to be statistically associated with AD ($p= 0.033$), the PICALM protein is expressed in all tissues with a major detectable expression in the neurons where it is distributed in the structures of synaptic cracks. But the polymorphisms of the Cat-D, ECA and EPHA1 genes did not show significant statistic association to the AD in the population of Vitória-ES. These results improve our knowledge about the alleles of risk to AD, enabling the creation of a genetic profile of susceptibility to the studied population.*

Key words : *Alzheimer Disease, MTHFR, PICALM, polimorfism, Vitória-ES population.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho feito por Alois Alzheimer	13
Figura 2: Relações interativas de farmacologia, bioquímica e genética na Doença de Alzheimer.....	15
Figura 3: Esquema da localização cromossômica dos genes relacionados a Doença de Alzheimer.....	16
Figura 4: Esquema da clivagem alterada da proteína β amiloide e seu posterior acúmulo no cérebro de indivíduos com Doença de Alzheimer.....	17
Figura 5: Padrão de bandas em gel de poliacrilamida para o polimorfismo rs1801133 do gene MTHFR	33
Figura 6: Padrão de bandas em gel de poliacrilamida para o polimorfismo rs3851179 do gene PICALM	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR.....	25
Tabela 2. Concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR.....	26
Tabela 3. Condições de temperatura e tempo das reações de PCR.....	27
Tabela 4: Condições de digestão enzimática, eletroforese e análise das reações de FRLP.....	28
Tabela 5: Frequências genotípicas relativas e absolutas de SNPs.....	31
Tabela 6: Análise por meio de Regressão Logística para associação com a DA para os genes MTHFR, PICAL, EPHA1, ECA E CAT Cat-D	32

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Distribuição genotípica do polimorfismos rs1801133 do gene MTHFR na amostra estudada.....29

Gráfico 2: Distribuição genotípica do polimorfismos rs3851179 do gene *PICALM* na amostra estudada.....29

Lista de Siglas:

ABRAZ	Associação Brasileira de Alzheimer
APOE	Apolipoproteína E (Apolipoprotein E)
APP	Proteína Precursora da Amiloide (amyloid beta precursor protein)
Cat-D	Catepsina D
CDR	<i>Clinical Dementia Rating Scale</i>
DA	Doença de Alzheimer
DAE	Doença de Alzheimer Esporádica
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EPHA1	Receptores de Efrina A (<i>Ephrin Type-A Receptor</i>)
GWAS	Genome Wide Association
MMSE	<i>Mini-Mental State Examination</i>
MTHFR	Metileno Tetra Hidrofolato Redutase
PICALM	<i>Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PSEN1	Gene da Pré-senilina 1
PSEN2	Gene da Pré-senilina 2
PS1	Proteína Pré-senilina 1
PS2	Proteína Pré-senilina 2
RFLP	Polimorfismo de Tamanhos de Fragmentos de Restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	Histórico.....	13
2.2	Fatores Ambientais.....	14
2.3	Formas Familiais.....	15
2.4	Casos Esporádicos.....	18
2.5	Caracterização dos genes investigados.....	18
2.5.1	Gene MTHFR.....	19
2.5.2	Gene Picalm.....	19
2.5.3	Gene EPHA1.....	20
2.5.4	Gene Cat-D.....	20
2.5.5	Gene Eca.....	21
2.6	Alelos de risco em potencial.....	21
3	OBJETIVOS.....	22
3.1	OBJETIVO GERAL.....	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4	METODOLOGIA.....	23
4.1	AMOSTRAS.....	23
4.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
4.3	MÉTODOS.....	24
4.3.1	PCR.....	25
4.3.2	RFLP.....	28
5	RESULTADOS.....	29
6	DISCUSSÕES.....	34
7	CONCLUSÕES.....	41
8	REFERÊNCIA.....	42

1. INTRODUÇÃO

A demência é uma desordem cerebral que afeta seriamente a capacidade de realização de atividades diárias e rotineiras resultando em grandes prejuízos sócio-econômicos. A Doença de Alzheimer (DA), enfermidade neurodegenerativa progressiva, é a principal causa de demência nos idosos, com prevalência de mais de 35 milhões de casos no mundo. Com o aumento significativo da expectativa de vida - e conseqüentemente maior número de idosos na população mundial - essa debilidade torna-se atualmente um importante problema de saúde pública.

Clinicamente, a Doença de Alzheimer é definida pela perda gradual e lenta de memória e habilidades, progredindo para perdas cognitivas significativas, que com o avançar da doença incapacitam o doente. A formação de placas senis e emaranhados neurofibrilares são os dois principais eventos histopatológicos associados à essa patologia. A doença de Alzheimer é caracterizada pelo aumento significativo de placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares no cérebro, formados pela degradação errônea da proteína β amiloide, e pelo acúmulo de proteína tau, respectivamente (Carrasquillo et al., 2010). A proteína tau é sintetizada por um gene composto por 16 exons localizado no cromossomo 17q21 (Figura 3) e atua como um dos componentes essenciais dos microtúbulos nas células. O grau de fosforilação da proteína tau determina a sua capacidade de estabilizar os microtúbulos, integrantes fundamentais do citoesqueleto, essenciais para a manutenção da estrutura neuronal e o transporte axonal de diversas substâncias, incluindo os neurotransmissores (Lovestone et al., 1994).

Não há dados concretos sobre a incidência da doença de Alzheimer no Brasil, entretanto, utilizando como base, pesquisas em outros países e dados do IBGE, podemos estimar que 1,2 milhão de pessoas sofram com a doença, o que equivale a 6% da população idosa, de acordo com a Associação Brasileira de Alzheimer (ABRAZ, 2013). Estes dados poderiam ser ainda mais

expressivos, se houvesse um criterioso estudo sobre isto, pois acredita-se que a Doença de Alzheimer é sub diagnosticada no país.

Trabalhos realizados entre 1987 e 1995 (Goldgaber et al., 1987; Kang et al., 1987; Robakis et al., 1987; Tanzi et al., 1987; St George-Hyslop et al., 1987 e Levy-Lahad E., et al 1995), identificaram três genes onde mutações de ponto são capazes de causar a doença de Alzheimer familiar, com padrão de herança autossômico dominante. Nestes casos, indivíduos portadores desenvolvem a DA, em geral, mais jovens (antes dos 65 anos de idade). Contudo, estas formas de herança são raras entre os casos de DA (aproximadamente 5% de todos os casos diagnosticados). Mais de 90% dos pacientes com DA apresentam a forma esporádica da doença (DAE) que se manifesta em geral a partir dos 65 anos (início tardio). Nestes casos a doença possui etiologia multifatorial, sendo desencadeada devido ao acúmulo de eventos genéticos e ambientais, que aumentam a suscetibilidade para a DA.

Novas informações desta doença poderão auxiliar na identificação do perfil genético de suscetibilidade individual da DA. Estes fatores irão melhorar o nosso conhecimento sobre a causa da DA, auxiliando no diagnóstico desta doença, unindo pesquisa clínica e básica, e podendo ainda, contribuir para desenvolvimento de melhores estratégias de prevenção ou mesmo retardando a progressão da Doença de Alzheimer devido a descoberta de novos tratamentos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO

Em 1901, o médico alemão Alois Alzheimer recebeu no seu sanatório de Berlim, Alemanha, uma paciente apresentando quadro clínico de alucinação, perturbação psicológica e memória debilitada. Após o falecimento desta paciente em 1906, o Dr. Alois Alzheimer realizou um exame patológico cerebral e encontrou mudanças histopatológicas ainda não descritas na literatura que seriam, mais tarde, denominadas placas senis e emaranhados neurofibrilares (Figura 1) (Thomas & Fenech, 2007). Seus resultados foram divulgados na 37ª Conferência Anual de Psiquiatras, Berlim (1906), onde ele caracterizou a doença como uma patologia altamente debilitante e com características histopatológicas peculiares (Hippius & Neundörfer, 2003). O psiquiatra alemão Emil Kraepelin foi a primeira pessoa a utilizar o termo “doença de Alzheimer” em 1910, referindo-se à forma de demência de início precoce, distinguindo-a da forma de demência de início tardio (Boller & Forbes, 1998). Apenas em 1968, Blessed, Tomlinson e Roth perceberam que as mudanças ocorridas em cérebros com características neuropatológicas que se assemelhavam a Doença de Alzheimer, estava intimamente relacionada à idade avançada. A partir desse momento, compreendeu-se que a Doença de Alzheimer de início tardio, e a Doença de Alzheimer de início precoce dividiam o mesmo quadro clínico e características histopatológicas (Caixeta, 2012).

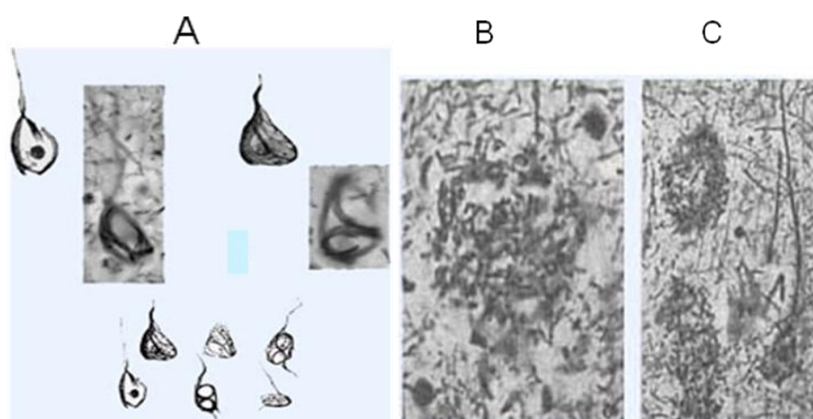


Figura 1: Desenho feito por Alois Alzheimer em 1911. Imagens representando: A) novelos neurofibrilares (aumento de 25x), B) placa neurítica e C) novelo neurofibrilar (aumento de 100x). (Modificada de ABRAZ, 2013).

2.2 FATORES AMBIENTAIS E O RISCO PARA DOENÇA DE ALZHEIMER

A idade é o fator de risco mais importante para DA, mas resultados epidemiológicos sugerem que um baixo nível de escolaridade, história de traumatismo craniano, o consumo de alto teor calórico - dietas ricas em gordura, sedentarismo, tabagismo podem cada uma aumentar o risco de DA (Mayeux, 2003; Mattson, 2003).

Nitrine et al. (2004), Caramelli et al. (2007) e Brucki & Nitrini (2008 e 2009) produziram dados interessantes sobre a associação positiva da DA com o analfabetismo para população brasileira. Eles comprovaram, por exemplo, aplicando testes em populações ribeirinhas da Amazônia, onde um grupo era formado por analfabetos e outro grupo por indivíduos escolarizados, que aqueles que possuíam um mínimo de contato educacional, apresentavam habilidades cognitivas mais duradouras.

Elementos culturais, como a dieta seguida por cada povo, também estão associadas ao risco para DA. Dados da literatura como Kamphui & Scheltens (2010) afirmam que uma abordagem multinutricional na fase mais precoce da doença tem um enorme valor terapêutico.

Grupos étnicos distintos também apresentam diferença quanto ao acometimento da DA. No trabalho de Yeo, Gallagher-Thompson e Lieberman (2006) foi possível observar que dentre um grupo de americanos de categorias étnicas distintas, os idosos brancos eram mais suscetíveis a DA do que o grupo de afro-americanos e asiáticos.

Barnes & Yaffe (2011) realizaram um trabalho de meta-análise e concluíram que se todos os seis fatores de risco para DA neste trabalho (baixa escolaridade, tabagismo, sedentarismo, obesidade, depressão, diabetes mellitos) fossem eliminados, cerca de 50% dos casos de DA poderiam ser prevenidos.

O desenvolvimento da Doença de Alzheimer deve-se ao acúmulo de eventos genéticos e ambientais (figura 2). Cada um desses eventos contribui com pequenos efeitos que resultam, em conjunto, no estabelecimento da doença com diferentes graus de gravidade (Fridman et al., 2004). Muitos fatores de risco foram caracterizados, incluindo idade e história familiar, ainda que alguns deles tenham mostrado resultados contraditórios em populações diversas (Brickell et al., 2006).

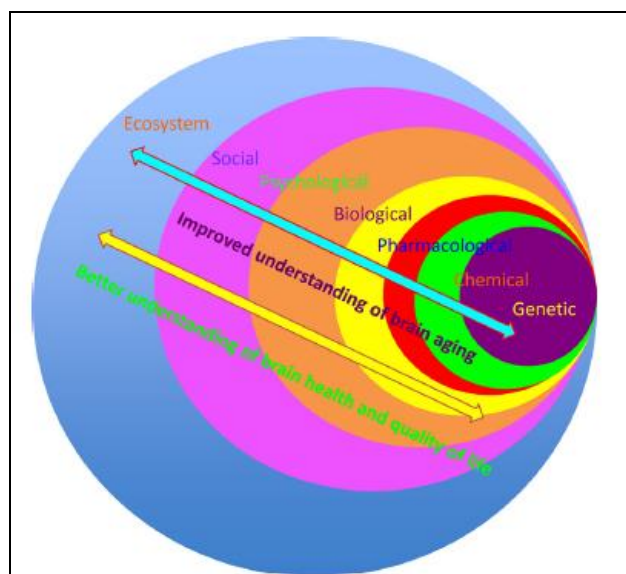


Figura 2: Relações interativas de farmacologia, bioquímica e genética, mostrando os vários níveis de análise que se fazem necessário para uma compreensão mais ampla e integrada do envelhecimento cognitivo associado a desafios para total compreensão da Doença de Alzheimer (Fonte: Whitehouse, 2013).

2.3 FORMAS FAMILIAIS

Foram identificados três genes autossômicos dominantes relacionados com a Doença de Alzheimer de início precoce: a Proteína Precursora Amilóide (APP) localizada no cromossomo 21q21.1 (Tanzi et al., 1987), a Presenilina 1 (PSEN1) em 14q24.3 (Sherrington et al., 1995) e a Presenilina 2 (PSEN2) em 1q42.1 (Levy-Lahad et al., 1995) (Figura 3).

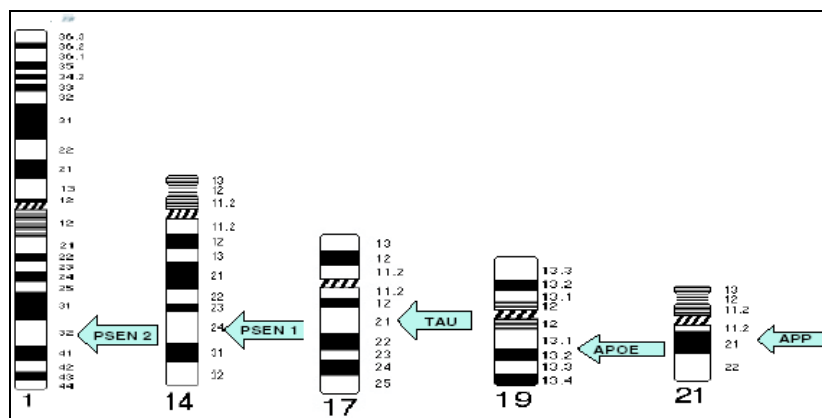


Figura 3: Esquema da localização cromossômica dos genes relacionados a DA (Fonte: Thomas & Fenech 2007).

O gene da APP e seu papel patogênico têm sido amplamente investigados em função do acúmulo do peptídeo β amiloide, em cérebro de pacientes com DA. A substância encontrada nas placas amiloides origina-se a partir de um produto peptídico do metabolismo da APP. Três enzimas foram descritas por estarem implicadas na clivagem da APP, sendo elas: alfa, beta e gama secretases (Nixon et al., 2001).

O peptídeo β amiloide é normalmente retirado da proteína APP que é adjacente a membrana celular. A proteólise da APP é mediada por uma série de enzimas secretases, sendo elas: α , β , e γ . A atividade da alfa secretase eleva o metabolismo da APP, com diminuição na produção amiloide, ocorrendo a produção de peptídeos com 40 aminoácidos. Em contrapartida ao metabolismo realizado pela alfa secretase, no cérebro de pessoas com DA a proteólise é realizada em sua maioria pela enzima beta secretase originando fragmentos do peptídeo amiloide ($A\beta_{42}$), e este por sua vez são metabolizados, provavelmente pela via lisossomal/endossomal utilizada também pela gama secretase (Lorenzo & Yankner, 1994). Denomina-se β amiloide, peptídeos maiores, que diferem do anterior pelo acréscimo de 1 a 3 aminoácidos em seu comprimento, (geralmente 42 aminoácidos) apresentam maior capacidade de agregação e provavelmente são mais neurotóxicos, portanto, patogênicos (Suo et al., 1997) (Figura 4).

A Proteína Precursora Amilóide (APP) foi sequenciada inicialmente, a partir de amostras de sangue de pacientes com DA e de indivíduos com síndrome de Down (Glennner & Wong, 1984). Um ano após essa pesquisa, o mesmo peptídeo foi reconhecido como o principal componente das placas neuríticas no tecido cerebral encontradas em pacientes com DA (Masters et al., 1985). A degradação alterada da proteína β amiloide resultante do gene mutado, gera um metabólito solúvel, tóxico, que possui entre seus efeitos: alterações do crescimento dos neuritos, apoptose, maior vulnerabilidade à excitotoxicidade e desestabilização da homeostase do Ca^{2+} intracelular, além da perda da atividade fisiológica do metabólito secretado da proteína precursora da amiloide (Forlenza & Gattaz, 1988).

As proteínas presenilina 1 (PS1) e presenilina 2 (PS2), possuem estrutura semelhante, estão localizadas na membrana celular e provavelmente atuam no transporte celular (Mann et al., 1997). Estudos sugerem que estas proteínas participam de mecanismos de apoptose através da interação com caspases, porém, acredita-se, que este não seja o mecanismo mais frequente de morte neuronal na doença de Alzheimer (Kim et al., 1997).

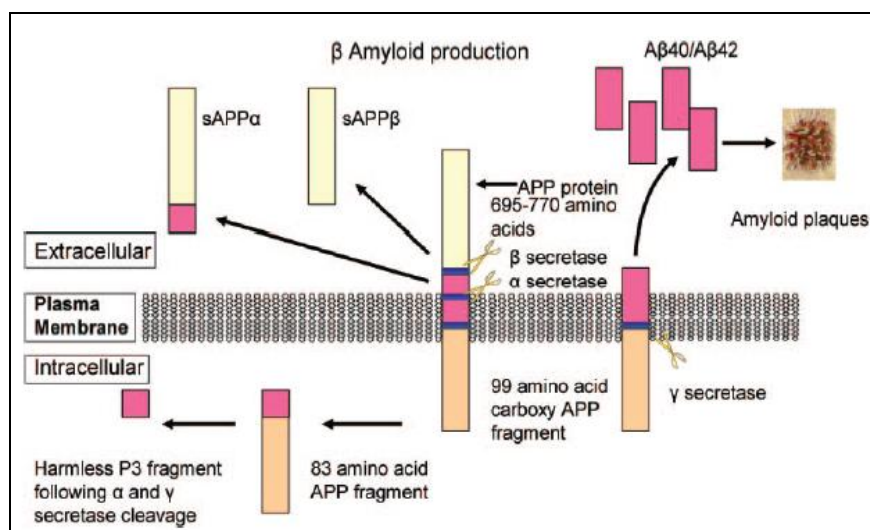


Figura 4: Esquema da clivagem alterada da proteína β amiloide e seu posterior acúmulo no cérebro de indivíduos com DA.

2.4 CASOS ESPORÁDICOS DA

Os casos de Doença de Alzheimer de início tardio são, em geral, esporádicos e com etiologia multifatorial. A forma pela qual a genética pode ser uma variável determinante no surgimento da doença de Alzheimer de início tardio tem provocado grande interesse dos cientistas, uma vez que, acredita-se que estes casos estejam relacionados não com um, mas com vários genes que contribuem para aumentar o risco de manifestação da doença (Chung et al., 2009).

O aumento na chance de desenvolver a doença de Alzheimer pode ser causado pela presença de polimorfismos de risco, como o alelo *e-4* do gene da Apolipoproteína E (ApoE) (Figura 3), considerado o maior fator de risco genético para o surgimento da doença. Porém, existem indivíduos portadores do alelo de risco ApoE *e-4* que não manifestam a doença, sugerindo assim, a presença de outros fatores que podem influenciar na sua etiologia (Breitner et al., 1999).

Como em outras doenças de etiologia multifatorial, os polimorfismos genéticos associados com suscetibilidade aumentada para a DAE variam entre diferentes populações mundiais, em função da constituição genética peculiar de cada grupo étnico. Isso demonstra a crescente necessidade de se estudar populações distintas na busca de polimorfismos de riscos. A descoberta de alelos de risco podem viabilizar a identificação de vias metabólicas que ajudem a compreender a etiologia da doença de Alzheimer e auxiliar a busca de alvos terapêuticos para esta enfermidade.

2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS GENES INVESTIGADOS

Dentre os polimorfismos de risco associados com a doença de Alzheimer podemos citar aqueles relacionados com: i) o funcionamento do sistema nervoso, como os genes: Metileno Tetra Hidrofolato Redutase (MTHFR), o gene *Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein* (PICALM) e Receptores de Efrina A (EPHA1), ii) proteases intracelulares, como o gene da Catepsina d (Cat-D) e iii) aqueles envolvidos nas vias de degradação da

proteína β -amiloide, como o gene da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA).

2.5.1 GENE MTHFR

O gene MTHFR (Metileno Tetra Hidrofolato Redutase) possui um papel central no complexo metabolismo do folato (ácido fólico) e determina o balanço entre as várias formas dessa molécula, um importante componente para o funcionamento do sistema nervoso central em todas as idades (Reynolds et al., 2002). A proteína MTHFR age doando um radical metil para homocisteína formar metionina no organismo. O polimorfismo C677T MTHFR é uma variação genética comum em várias populações, que causa uma redução na atividade enzimática da proteína, alterando o nível normal de folato no organismo (James et al., 1999). Além disso, altos níveis de homocisteína foram correlacionados com a Doença de Alzheimer (Brunelli et al., 2001).

2.5.2 GENE PICALM

Um dos genes que podem estar associados com a DA é o *PICALM*, também conhecido como *CALM*, localizado no cromossomo 11q14 e expresso em todos os tecidos do corpo. Esta proteína possui grande expressão nas estruturas pré e pós-sinápticas dos neurônios (Bertram et al., 2010). A proteína PICALM parece estar envolvida na endocitose mediada por clatrina, um passo essencial no caminho intracelular tanto de proteínas e lipídeos quanto de nutrientes, fatores de crescimento e neurotransmissores. Essa proteína foi originalmente identificada como uma componente chave na endocitose mediada por clatrina. Ela recruta proteínas clatrininas a um adaptador (VAMP-2) para a membrana plasmática, e juntamente com a VAMP-2 reconhece as proteínas-alvo. A proteína PICALM desempenha um papel fundamental na endocitose que é importante em processos como a regulação de receptores, transmissão sináptica e a remoção de células apoptóticas (Baig et al., 2010). Harold et al. (2009) sugeriram que o polimorfismo rs3851179 do gene *PICALM* possa atuar como um fator de proteção para a DA, como observado na população europeia.

Em função do importante papel do gene *PICALM* nas atividades neuronais, pessoas que apresentam o polimorfismo para o gene em questão poderiam ter um risco elevado em desenvolver a DA.

2.4.3 GENE EPHA1

O maior grupo de receptores tirosina-quinase conhecida do ser humano são as efrinas (proteínas sinalizadoras ligadas à membrana celular da família EPH) codificadas por 14 genes diferentes, entre eles o EPHA1. As efrinas são reguladoras da orientação dos axônios, diferenciação, migração, invasão e aderência celular (Nevala et al., 2013).

Mutações nos genes EPH são observadas em várias doenças, como câncer e DA. Os produtos de polimorfismos no gene EPHA1, que resultam em sinalização alterada, tem sido associados a desvios da regulação de interações entre células envolvidas na estruturação e desenvolvimento do sistema nervoso (Hughes et al., 2013).

2.4.4 GENE Cat-D

A Catepsina D (Cat-D) é uma endo-protease aspártica distribuída igualmente no lisossomo. Durante muito tempo a principal função conhecida da catepsina-D era a de degradar proteínas lisossomais em um pH ácido (Bhojak et al., 2000). Contudo, tem sido mostrado que Cat-D pode ativar precursores de proteínas biologicamente ativas em compartimentos pré-lisossomais de células especializadas (Nakopoulou et al., 1995). Cat-D é uma protease intracelular a qual apresenta atividade da β e γ secretase *in vitro* (Chevallier et al., 1997; Evin et al., 1995), tornando-a uma das proteínas suspeitas de potencial risco para o desenvolvimento da Doença de Alzheimer. De acordo com Davidson et al. (2006) somente a Cat-D não seria um dos principais fatores de risco para a doença de Alzheimer, embora pudesse agir como um fator de alteração, aumentando os efeitos do alelo $\epsilon 4$ do gene APOE na predisposição ao desenvolvimento da doença.

2.5.5 GENE ECA

A principal função da ECA é catalisar a reação que degrada a angiotensina I em angiotensina II. Porém, ela também participa da hidrólise do peptídeo inativo angiotensina 1-9, gerando o peptídeo vasodilatador angiotensina 1-7, além de inativar os peptídeos vasodilatadores bradicinina e calidina (Eriksson et al., 2002). A enzima conversora de angiotensina (ECA), pode modular a suscetibilidade e a progressão da doença de Alzheimer pela via de degradação da proteína β -amilóide, sendo que sua progressiva acumulação e deposição podem levar a neurodegeneração (Hemming e Selkoe, 2005), independentemente do tipo de polimorfismo do gene APOE (Kehoe et al., 1999).

2.6 ALELOS DE RISCO EM POTENCIAL

Polimorfismos de risco para doenças multifatoriais, previamente identificados em populações específicas, podem se comportar como um polimorfismo neutro em outras comunidades em função do perfil genético de cada grupo. Assim, estudos de diferentes populações são importantes para identificar os alelos de risco.

Em função do importante papel dos genes *MTHFR*, *PICALM*, *EPHA1*, *Cat-D* e *ECA* nas atividades neuronais, pessoas com DA poderiam ter maiores chances de apresentar os polimorfismos de risco para os genes em questão. O estudo de fatores de risco específicos em populações distintas podem melhorar o nosso conhecimento sobre o papel dos aspectos genéticos na etiologia da Doença de Alzheimer. Os resultados obtidos podem melhorar o nosso conhecimento sobre os alelos de risco para DA e pode ajudar fornecendo, no futuro, um perfil de suscetibilidade genética para pacientes com Doença de Alzheimer em populações específicas e auxiliar no planejamento de estratégias mais eficientes de tratamento e prevenção da doença.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Este projeto teve como objetivo avaliar as frequências de polimorfismos dos genes *MTHFR*, *PICALM*, *EPHA1*, *Cat-D* e *ECA* e sua possível associação com a Doença de Alzheimer em pacientes de Vitória-ES, por meio de estudo caso: controle.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar a frequência dos polimorfismos nos genes *MTHFR*, *PICALM*, *EPHA1*, *Cat-D* e *ECA* em pacientes com Doença de Alzheimer e controles na população de Vitória por meio da técnica de PCR – RFLP.
- Avaliar a importância de polimorfismos dos genes *MTHFR*, *PICALM*, *EPHA1*, *Cat-D* e *ECA* como possíveis fatores genéticos de risco para a Doença de Alzheimer na população de Vitória por meio de cálculo de ODDS RATIO e regressão logística.

4. METODOLOGIA

4.1 AMOSTRA

A amostra de participantes do estudo de associação desenvolvido nesta pesquisa foi obtida na proporção de 1 caso (pacientes com a Doença de Alzheimer) para 2 controles (pessoas saudáveis). A amostra foi formada por 243 indivíduos não consanguíneos residentes de Vitória, ES. Entre eles, 82 eram pacientes com Doença de Alzheimer e 161 eram idosos saudáveis que formaram o grupo controle.

A seleção dos indivíduos da amostra foi realizada com a colaboração do geriatra Dr. Renato Lírio Morelato do Hospital da Santa Casa da Misericórdia de Vitória. O desenvolvimento da pesquisa foi realizado em colaboração com os biólogos Luciano Belcavello, Leila Dias de Almeida e Bruno Vinícius Pimenta Almada.

Esta pesquisa teve a anuência da direção clínica do Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (HSCMV) e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, da Escola Superior de Ciências da Saúde de Vitória – EMESCAM (anexo 1).

Os pacientes da pesquisa preencheram o critério de diagnóstico clínico de DA provável (McKhann et al., 1984) e possuíam um diagnóstico completo de evolução da demência, incluindo tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética do crânio, hemograma completo, concentrações séricas de ureia, creatinina, TSH, colesterol total e frações, glicemia de jejum, triglicerídeos, ácido úrico, sódio, potássio, vitamina B12, ácido fólico, enzimas hepáticas (TGO, TGP) e VDRL, repetidos a cada 2 anos de diagnóstico assim como os testes: *Mini-Mental State Examination* (MMSE) (Folstein et al., 1975) e *Clinical Dementia Rating Scale* (CDR) (Morris, 1993).

A amostra controle foi constituída de voluntários que apresentaram pontuação menor do que 28 no teste de MMSE e que não apresentaram déficit cognitivo ou parentes com Doença de Alzheimer.

A amostra de pacientes foi composta por 61.04% indivíduos de origem europeia e 38.96% de origem africana; enquanto a amostra de controles foi composta de 56.33% indivíduos de origem europeia e 43.67% de origem africana.

Um total de 60.27% pacientes de DA possuíam educação formal e 39.73% eram iletrados; a amostra de controles possuía 67.55% de indivíduos com educação formal e 32.45% eram iletrados.

A idade média das amostras foi de 81.16 ± 7.47 para o grupo de pacientes, composto por 54 mulheres e 28 homens e de 79.36 ± 7.86 para o grupo controle, que era composto por 118 mulheres e 43 homens.

4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Alguns fatores de risco podem influenciar no diagnóstico de doença de Alzheimer como o gênero, a faixa etária, a escolaridade e APOE, assim a regressão foi ajustada para as mesmas. O método de entrada das variáveis no modelo de regressão foi o “*Enter*”, onde todas as covariáveis são incluídas simultaneamente, assim, mesmo que uma covariável não tenha obtido significância estatística não foi retirada do modelo e assim a mesma foi ajustada aos fatores de risco. O nível alfa de significância adotado foi de 5% com intervalo de confiança de 95%. O programa utilizado nas análises foi o IBM SPSS *Statistics version 19*.

4.3 MÉTODOS

Foram coletados 9ml de sangue periférico para extração de DNA dos participantes da pesquisa e dados clínicos obtidos por meio de entrevista realizada a partir de um formulário descrito em Anexo 2.

A extração do DNA foi realizada a partir da metodologia descrita por Miller, Dykes e Poleski (1988), com modificações. Os polimorfismos dos genes foram

investigados através da técnica de PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*), utilizando-se primers específicos. Em seguida, os produtos da PCR gerados, foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição específicas, nas concentrações e temperaturas sugeridas pelo fornecedor e avaliadas no nosso laboratório.

4.3.1 PCR

As regiões de interesse dos genes MTHFR, PICALM, EPHA1, ECA e Cat-D foram amplificadas em *singleplex* pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os primers foram retirados de artigos previamente selecionados ou confeccionados pela equipe do Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM) da UFES, utilizando o programa Primer 3 Input versão 0.4.0 (Tabela 1).

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados nas reações de PCR.

GENE	Fragmento	Sequência de Primers	Referência
MTHFR	198pb	F= CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC R= CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG	Skibola et al., 1999
PICALM	226pb	F= CCCTGCGGTAAATCTGAAT R= ACTATTAACCCGCTTCATAGGG	Equipe NGHM- Presente Pesquisa
EPHA1	217pb	F= CGTCTCTGGACTCTGGGTCT R= GGTTCCCTAGGGGACCAAAAA	Equipe NGHM- Presente Pesquisa
ECA	490	F= GTGACAGGCAGGAGTTTGGT R= GGGCTAAGACCTCATACTCACG F= TGGGACCACAGCGCCCGCACTAC R= TCGCCAGCCCTCCATGCCCATAA	Rigat et al., 1992 Lindpaintner et al., 1995
Cat-D	168pb	F= GTGACAGGCAGGAGTTTGGT R= GGGCTAAGACCTCATACTCACG	Papassotiropoulos et al., 1999

F= Sequência Forward 5'-3', R= Sequência Reverse 5'-3'

Foi utilizado o modelo de termociclador Veriti™ da empresa *Applied Biosystem* nas reações de PCR. As condições de PCR para cada polimorfismo estão listadas nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR.

REAGENTES	MTHFR	PICAL	EPHA1	ECA	Cat-D
10X PCR Buffer	1X	1X	1X	1X	1X
MgCl₂ 50mM	1,5mM	1,5mM	1,5mM	1,9 mM	1,9 mM
dNTP 10mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM
Primer Forward 10mM	0,5μM	0,5μM	0,5μM	1,0μM	1,0μM
Primer Reverse 10mM	0,5μM	0,5μM	0,5μM	1,0μM	1,0μM
Taq DNA Polimerase 5U/μL	1U	1U	1U	1U	1U

Tabela 3. Condições de temperatura e tempo das reações de PCR.

GENE	ETAPAS				Nº CICLOS
	DENATURAÇÃO INICIAL	DENATURAÇÃO	ANELAMENTO E EXTENSÃO	EXTENSÃO FINAL	
MTHFR	94° C por 10'	94°C por 35''	60°C por 35'' e 72°C por 30''	72°C por 10'	35
PICALM	94°C por 3'	94°C por 30''	62°C por 30'' e 72°C por 30''	72°C por 10'	30
EPHA1	94°C por 3'	94°C por 30''	63°C por 30'' e 72°C por 30''	72°C por 10'	35
ECA	94°C por 5' 94°C por 5'	94°C por 30'' 94°C por 30''	61°C por 20'' 68°C por 20'' e 72°C por 2' 72°C por 2'	72°C por 7' 72°C por 7'	30 30
Cat-D	95°C por 5'	95°C por 30''	61°C por 20'' e 72°C por 2'	72°C por 7'	30

4.3.2 RFLP

Em seguida, os produtos da PCR gerados foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição específicas, nas concentrações e temperaturas sugeridas pelo fornecedor e avaliadas no nosso laboratório (tabela 4).

Tabela 4: Condições de digestão enzimática, eletroforese e análise das reações de RFLP.

Enzima	Tempo/temperatura de Encubação e análise	Fragmentos gerados Pb
MTHFR <i>Hinfl</i>	37°C por até 24h Gel poliacrilamida a 7%	198pb CC; 175pb TT; 198pb e 175pb CT
PICALM <i>SspI</i>	37°C por até 24h Gel poliacrilamida a 7%	226pb GG; 137pb e 89pb AA; 226pb, 137pb e 89pb AG
EPHA1 <i>RSAI</i>	37°C por até 24h Gel poliacrilamida a 7%	217 pb TT; 132pb e 85pb CC; 217 pb, 132pb e 85pb CT
ECA -	-	490pb II, 190pb DD e 490/190pb ID
Cat-D <i>MwoI</i>	37°C por até 24h Gel poliacrilamida a 10%	250pb TT; 168pb e 82pb CC; 250pb, 168pb e 128pbCT

5. RESULTADOS

Neste trabalho foram analisados por meio de estudo caso: controle os polimorfismos rs1801133 do gene *MTHFR*, rs3851179 do gene *PICALM*, rs11767557 do gene *EPHA1*, rs387906576 *ECA* e rs74315304 *Cat-D*, relacionados a Doença de Alzheimer em pacientes de Vitória-ES.

Os gráficos 1 e 2 demonstram a distribuição genotípica para os genes *MTHFR* e *PICALM* respectivamente.

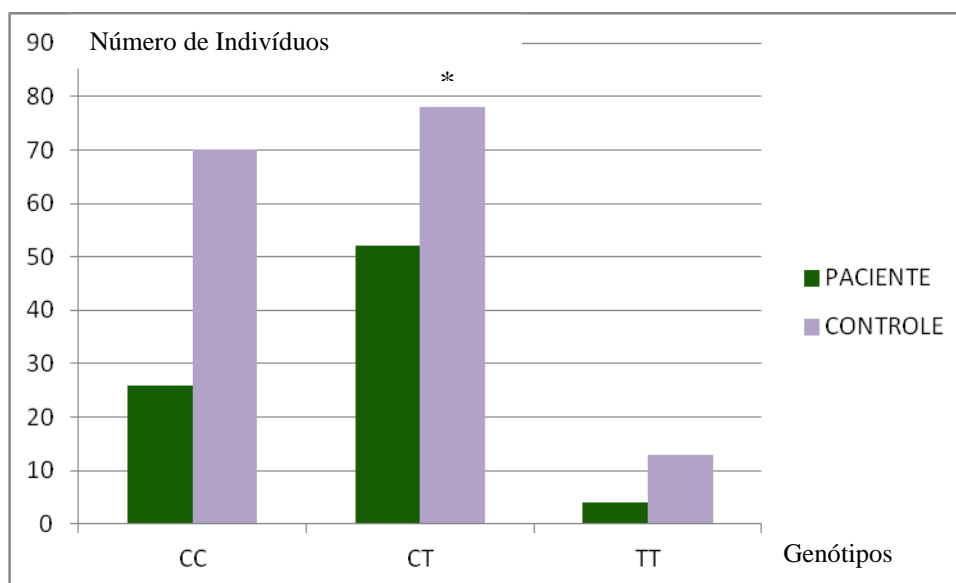


Gráfico 1: Distribuição genotípica do polimorfismo rs1801133 do gene *MTHFR* na amostra estudada.

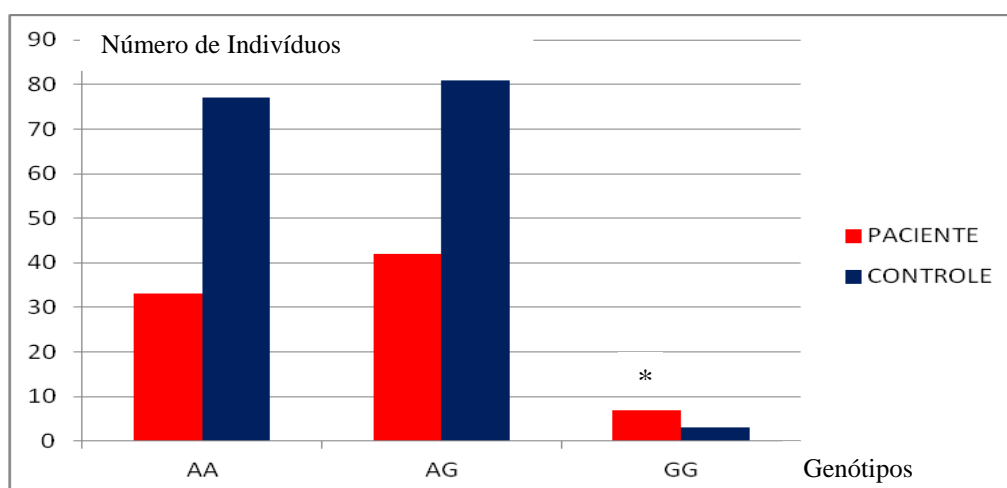


Gráfico 2: Distribuição genotípica do polimorfismo rs3851179 do gene *PICALM* na amostra estudada.

A tabela 5 sintetiza a distribuição genotípica de MTHFR, PICALM, EPHA1, ECA e Cat-D para os grupos de pacientes e controles da DA. Não foram encontradas diferenças significativas no que diz respeito a idade ($p = 0.877$), gênero ($p = 0.236$), nível educacional ($p = 0.298$) e distribuição étnica ($p = 0.573$) entre os grupos estudados. A comparação da frequência genotípica entre pacientes e controles mostrou uma diferença estatística significativa para o genótipo CT do gene MTHFR ($p = 0.030$) e para o genótipo GG do gene PICALM ($p = 0.033$). No entanto, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos para os genótipos de EPHA1, ECA e Cat-D por uma simples análise de associação. Como esperado, o alelo *APOE-ε4* foi altamente associado com a DA em nosso estudo (OR = 3.069; 95% IC= 1.768–5.329, $p < 0.0001$). Todos os genótipos estão de acordo com o Equilíbrio de Hardy – Weinberg.

Tabela 5: Frequências genotípicas relativas e absolutas dos SNPs para os genes *MTHFR*, *PICALM*, *EPHA1*, *ECA* e *Cat-D* e para o estatus de *APOE* na Doença de Alzheimer (DA) para pacientes e controles

Gene (SNPs)	Genótipos	DA		Controles		P
		n	%	n	%	
<i>MTHFR</i> (rs1801133)	CC	26	31.71	70	43.48	–
	CT*	52	63.41	78	48.45	0.030
	TT	4	4.88	13	8.07	0.434
<i>PICALM</i> (rs3851179)	AA	33	40.24	77	47.83	–
	AG	42	51.22	81	50.31	1.000
	GG*	7	8.54	3	1.86	0.033
<i>EPHA1</i> (rs11767557)	CC	54	65.85	91	57.23	-
	CT	27	32.93	64	40.25	0.141
	TT	1	1.22	4	2.52	0.999
<i>ECA</i> (rs387906576)	DD	17	21.12	34	20.73	-
	ID	55	67.70	109	67.07	0.913
	II	10	11.18	18	12.20	0.470
Cat-D (rs74315304)	CC	69	84.15	130	82.80	-
	CT	13	15.85	27	17.20	0.264
<i>APOE</i> status	$\epsilon 4$ portadores	35	42.68	112	69.57	–
	$\epsilon 4$ não portadores	47	57.32	49	30.43	< 0.0001

n = número de sujeitos da pesquisa

Tabela 6: Análise por meio de Regressão Logística para associação com a DA para os genes MTHFR, PICAL, EPHA1, ECA E Cat-D

Gene (SNPs)	Genótipos	DA (%)	Controles (%)	OR (95% CI)	p^{**}	OR (95% IC)	p^{***}
<i>MTHFR</i> (rs1801133)	CC	31.71	43.48	1 (referência)	–	1 (referência)	–
	CT*	63.41	48.45	1.795 (1.014-3.176)	0.045	2.446 (1.207-4.958)	0.013
	TT	4.88	8.07	0.828 (0.248-2.772)	0.760	0.69 (0.155-3.069)	0.626
<i>PICALM</i> (rs3851179)	AA	40.24	47.83	1 (referência)	–	1 (referência)	–
	AG	51.22	50.31	1.21 (0.696-2.102)	0.499	1.297 (0.659-2.551)	0.451
	GG*	8.54	1.86	5.444 (1.326-22.539)	0.019	14.276 (2.049-99.440)	0.007
<i>EPHA1</i> (rs11767557)	CC	65.85	57.23	1 (referência)	–	1 (referência)	–
	CT	32.93	40.25	0,624 (0,334 - 1,169)	0.141	0,564(0,292-1,092)	0.089
	TT	1.22	2.52	0.00	0.999	0.00	0.999
<i>ECA</i> (rs387906576)	DD	21.12	20.73	1 (referência)	–	1 (referência)	–
	ID	67.70	67.07	1,041 (0,505 - 2,144)	0.913	1,130 (0,530 - 2,408)	0.750
	II	11.18	12.20	0,653 (0,205 - 2,073)	0.470	0,720 (0,219 - 2,368)	0.590
Cat-D (rs74315304)	CC	84.15	130	1 (referência)	-	1 (referência)	-
	CT	15.85	27	0,617 (0,264 - 1,440)	0.264	0,575 (0,239 - 1,382)	0.216

* valor estatisticamente significativo **p valor bruto. ***p valor ajustado pela faixa etária, gênero, nível de escolaridade, etnia e Apoe. *APOE-ε4* status. OR = odds ratio, IC = Intervalo de Confiança.

A região de interesse que foi amplificada e posteriormente digerida para os polimorfismos rs1801133 do gene MTHFR está mostrada na figura 5, e para o polimorfismo rs3851179 de gene PICAL está mostrado na figura 6.

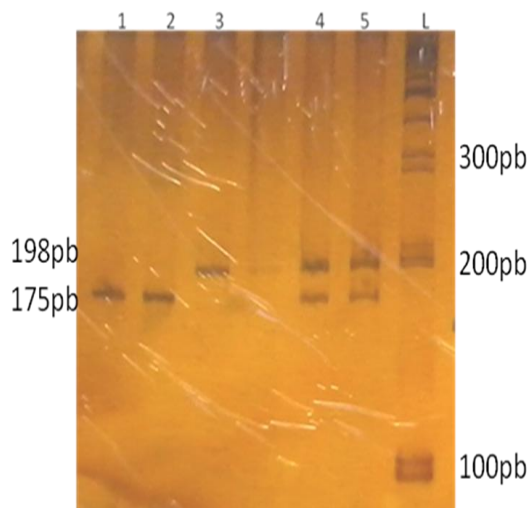


Figura 5: Padrão de bandas no gel de poliacrilamida após encubação com enzima de restrição para o gene MTHFR. A amostra L representa o marcador de peso molecular de 100 pares de base. As Amostras 1 e 2 possuem o polimorfismo TT. A amostra 3 possui o padrão CC. As amostras 4 e 5 apresentam o padrão CT.

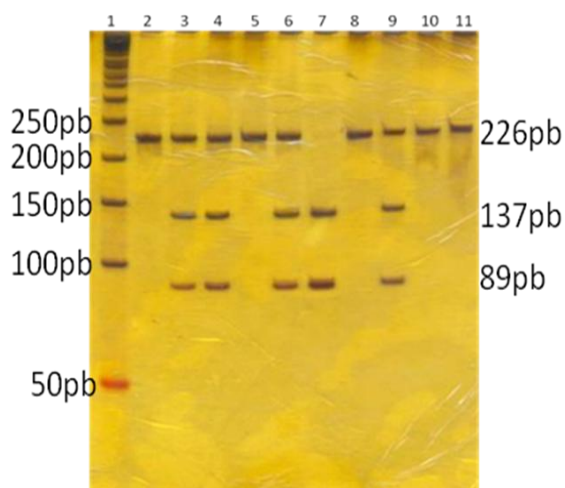


Figura 6: Padrão de bandas no gel de poliacrilamida após encubação com enzima de restrição para o gene PICALM. A amostra 1 representa o marcador de peso molecular de 50 pares de base. As Amostras 2, 5, 8, 10 e 11 possuem o polimorfismo AA. A amostra 7 possui o padrão GG. As amostras 3, 4, 6 e 9 apresentam o padrão AG.

6. DISCUSSÃO

Nesse trabalho demonstramos que o polimorfismo rs1801133 do gene *MTHFR* e o polimorfismo GG rs3851179 do gene *PICALM* são fatores de risco independentes para a DA, ou seja, apenas a presença dos polimorfismos de risco estão associados a DA, mesmo na presença, ou ausência de outros fatores, sejam eles ambientais (nível de escolaridade, etnia, gênero, sedentarismo) ou genéticos (gene ApoE).

O polimorfismo C677T do gene *MTHFR*, vem sendo estudado nas diferentes populações mundiais em relação à Doença de Alzheimer e não existe um consenso na sua participação na etiologia da doença. Diferentes estudos mostram que o polimorfismo T se comporta de diferentes formas (proteção/risco/nulo) em populações específicas.

A enzima 5,10 metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) é importante na via de regulação da concentração de folato e homocisteína, ela catalisa a conversão da 5,10 - metilenotetrahidrofolato para 5-metilenotetrahidrofolato, que é a forma predominante de folato no plasma e é quem fornece o grupo metil para a síntese de metionina através da remetilação da homocisteína (Weisberg et al., 1998).

Modificações na enzima *MTHFR*, como aquelas causadas pelo alelo T na posição rs1801133 do gene, podem prejudicar a via do folato alterando suas concentrações e modificando os níveis de homocisteína, o que poderia ocasionar um risco para manifestação da Doença de Alzheimer (Yamada et al., 2001).

O polimorfismo rs1801133 *MTHFR* reduz a atividade enzimática alterando assim o nível normal de folato e homocisteína. A atividade enzimática do heterozigoto CT e do homozigoto TT pode ser reduzida em 35 e 70% respectivamente, quando comparados ao genótipo normal CC (James et al., 1999).

Estudos apontam que existe um elevado nível de homocisteína na DA e em mecanismos neuropatológicos. Altas taxas desse composto já foram correlacionadas ao baixo desempenho cognitivo em idosos e parece acentuar a formação de placas amiloides, além de já ter sido correlacionado com aterosclerose (fator de risco para DA), (Zhang et al., 2010; Sai et al., 2002; Brunelli et al., 2001; Lehmann et al., 1999; Riggs et al., 1996). Por isso, estudos sugerem que a redução da homocisteína pode oferecer uma abordagem diferente em relação à doença (Kruman., 2000 e Kruman., 2002). Com isso as vitaminas B que influenciam o metabolismo da homocisteína têm sido estudadas para reduzir o risco da DA ou retardar a sua progressão (Malouf., 2002) .

Estudo realizado com a população do nordeste brasileiro mostrou que esse polimorfismo é fator nulo para a DA (Silva et al., 2006), assim como no estudo de Mansouri et al. (2013). Trabalhos realizados com a população japonesa demonstram que o polimorfismo T do gene MTHFR atua como fator de proteção contra a DA (Wakutani et al., 2004). já em outros estudos o mesmo alelo atua como fator de risco para população asiática, mas não para população europeia (Hua et al., 2011), assim como no estudo realizado por Zhang et al. (2010), no qual dados mundiais foram cruzados para realização da técnica de *Genome Wide Association* (GWAS), e foi encontrado um risco aumentado no desenvolvimento da DA para portadores do alelo T para população asiática mas não para caucasoides.

No presente estudo, o polimorfismo CT atua como fator de risco para a DA na população de Vitória-ES, identificado pela diferença estatisticamente significativa do genótipo CT entre pacientes e controles, aumentando a chance no desenvolvimento da doença em 2.4 vezes, quando comparados com indivíduos que não possuem essa variação. Provavelmente, não foi encontrado valor estatisticamente significativo para o genótipo TT pois esta variante é rara na amostra analisada (4.88%). Com o aumento do tamanho amostral é possível que a frequência deste genótipo se elevasse nos grupos estudados permitindo a identificação desta variante (TT) como fator de risco genético para a população de Vitória, ES.

O gene *PICALM* apresentou uma forte associação com a DA para a população Europeia, demonstrando ser fator de proteção para DA (Harold et al., 2009). Esse gene atua na junção entre as células nervosas. Ele foi originalmente identificado como um componente importante da endocitose mediada por clatrina. O gene *PICALM* parece dirigir o caminho da VAMP-2, uma proteína que tem um papel crucial na fusão das vesículas sinápticas à membrana pré-sináptica e na liberação do neurotransmissor, um processo importante para a função neuronal. Cérebros afetados pela DA mostram um número reduzido de sinapses, que está mais correlacionado com o declínio cognitivo do que com o acúmulo de placas. Recentemente estudos indicaram que a sinapse no cérebro de indivíduos com doença de Alzheimer pode apresentar disfunções, mesmo antes dos neurônios serem visivelmente degenerados. Mudanças no gene *PICALM* resultariam, assim, em perturbações nas sinapses, possivelmente através do tráfego de vesículas sinápticas. Além disto, Harold et al. (2009) observaram alterações na dosagem de β amiloide de forma estatisticamente significativa na população europeia, sugerindo que o gene *PICALM* influenciaria no risco de DA por meio de alterações nas vias endocíticas de processamento de APP, resultando em mudanças nas doses de peptídeo β amiloide.

Estudo realizado na população dos Estados Unidos da América demonstrou que o gene *PICALM*, atua como fator de proteção para aquela população (Carrasquillo et al., 2010). Porém para população chinesa, o gene não demonstrou estar associado com a DA (Yu et al., 2010). Em ambos os estudos citados anteriormente onde foi encontrada associação positiva entre *PICALM* e a DA, a amostra estudada era em sua grande maioria constituída de pessoas de etnia branca (Harold et al., 2010 e Carrasquillo et al., 2010).

Baig et al. (2010), estudando amostras de cérebros de pessoas com DA e controles sadios da população europeia, não encontrou uma diferença significativa expressiva na sua amostra em relação ao gene *PICALM*, demonstrando que ainda é necessário maiores estudos acerca desse polimorfismo nas diferentes populações.

No nosso estudo esse polimorfismo parece agir como fator de risco para DA, que é o oposto do encontrado na publicação original (Harold et al., 2009). No entanto, resultados divergentes não são incomuns de serem encontrados em estudos de associação com populações distintas para DA, como foi descrito por Panza et al. (2004) e Cousin et al. (2011).

Por outro lado o estudo de polimorfismos dos genes *EPHA1* rs11767557, *ECA* rs387906576 e *Cat-D* rs74315304, não mostraram valores estatisticamente significantes no presente estudo. Estes genes foram previamente associados em outros estudos.

O sistema Eph-efrina receptor-ligante está implicado no comportamento celular e morfológico das células. *EPHA1* é o membro fundador dos receptores Eph, mas pouco se sabe sobre sua função (Yamazaki et al., 2008).

A desregulação dos Receptores Tirosina Quinase (RTQ) demonstrou desempenhar um papel crucial em vários tipos de cânceres e estão associados com a DA (Robinson et al. 2000; Paul e Mukhopadhyay. 2004). O grupo mais conhecido de RTQ são as Efrinas receptores (EPHS), que são codificadas por pelo menos 14 genes diferentes, e são selecionadas em duas classes distintas de acordo com suas semelhanças de sequência: classe A (*EPHA1-8*, *EPHA10*) e classe B (*EPHB1-4*, *EPHB6*).

Efrinas e receptores Eph estão envolvidos na regulação da neurotransmissão excitatória e desempenham um papel na remodelação do citoesqueleto (Simón et al., 2009). O receptor Efrina tem sido implicado na mediação de eventos do desenvolvimento do sistema nervoso, como mostrou o trabalho de Hughes et al. (2013) onde observou-se que as variações genéticas no *EPHA1* foram associados com a deposição do peptídeo β amiloide no cérebro, aumentando assim o risco para pessoas com o genótipo TT.

Nos trabalhos realizados a partir da técnica de GWAS Naj et al. (2011), Hollingworth et al. (2011) e Carrasquillo et al. (2011) encontraram associação

do polimorfismo rs11767557 do gene EPHA1 com a DA, aumentando o risco para indivíduos que carregam o genótipo TT.

Na nossa pesquisa o polimorfismo rs11767557 do gene EPHA1, não demonstrou estar associado estatisticamente com a DA ($p = 0.999$) para população de Vitória ES.

A Enzima Conversora da Angiotensina (ECA) é um componente do sistema renina-angitensina. O gene ECA (17q23) é um dos vários fatores de risco para a doença de Alzheimer em comum com demência vascular (Kolsch et al., 2005). No cérebro, a ECA possui como função primordial modular e renovar a dopamina, sugerindo um possível envolvimento em doenças neurodegenerativas como o Parkinson e a Doença de Alzheimer, por meio da diminuição da síntese de dopamina pelos neurônios (Alvarez et al., 1999).

Uma das principais vias que podem levar a neurodegeneração seria a clivagem alternativa do peptídeo β -amilóide, a progressiva acumulação e deposição no cérebro, são uma das características de pacientes com DA. Um dos moduladores desta via é o gene ECA (Hemming e Selkoe, 2005). Estudos de associação com a DA correlacionaram o polimorfismo de inserção (I) do gene ECA com um dos fatores ao desenvolvimento da DA (Elkins et al., 2004; Lehmann et al., 2005), enquanto o polimorfismo de deleção (D) foi correlacionado como um fator de proteção para a doença e estaria associado também com a longevidade humana (Schachter et al., 1994), no entanto, os resultados em diferentes populações e regiões são bastantes controversos.

Estudos como de Narain et al., (2000), Meng et al., (2005) e Kolsch et al (2005) demonstraram que o polimorfismo rs387906576 do gene ECA estaria relacionado com o risco para o desenvolvimento da DA. Os nossos dados ($p = 0.420$) confirmam os resultados de outros estudos em diversas populações, os quais não observaram associação entre os polimorfismos do gene ECA com a DA (Arlt et al., 2013; Elias-Sonnenschein et al., 2012; Monastero et al., 2002).

A Catepsina D, uma protease, também participa do metabolismo da proteína β -amilóide, cuja alteração genética foi associada a casos esporádicos da DA (Papassotiropoulos et al., 2009). Apesar da Catepsina D apresentar ampla distribuição nos vários tipos de células humanas, existem diferenças quantitativas na sua distribuição tecidual (Nakopoulou et al., 1995). A função fisiológica da Catepsina D não é totalmente conhecida, mas parece estar envolvida na degradação das proteínas teciduais, tanto em condições normais quanto patológicas (Göhring et al., 1996).

A principal função descrita da Catepsina D é o catabolismo proteico no interior dos lisossomos (Dean., 1975). Outros efeitos fisiológicos incluem o processamento de hormônios, antígenos e neuropeptídeos (Fusek & Vetvicka, 1994).

Nossos resultados mostram o estudo realizado sobre o gene da Cat-D relacionado à DA na população brasileira. O genótipo TT por se tratar de um genótipo muito raro, não foi observado em nossa amostra, assim como outros autores (Li et al., 2004; Davdson et al., 2006). Estudos anteriores reportaram uma correlação entre os polimorfismo no exon 2 do gene Cat-D (C→T) com o risco de desenvolvimento para a DA (Papassotiropoulos et al., 2000). Entretanto, no presente estudo relatamos uma não associação do polimorfismo do gene Cat-D, ($p= 0.264$) como observado em outras populações (Bhojak et al., 2000; Matsui et al. 2001; Ingegneri et al., 2003).

Um dos objetivos das pesquisas relacionadas com a Doença de Alzheimer e os polimorfismos que podem estar associados a ela, é desenvolver ferramentas mais precisas para o diagnóstico, criando novas estratégias para melhores tratamentos com base no perfil genético de cada indivíduo, o que caracteriza a farmacogenética. Nesta linha de pesquisa aplicada é estudado como o metabolismo de diferentes drogas terapêuticas podem ser influenciados por múltiplos fatores, incluindo-se estado de saúde, influências ambientais e características genéticas. A farmacogenética é uma área da farmacologia clínica que estuda como diferenças genéticas entre indivíduos podem afetar as respostas às drogas. Neste sentido, polimorfismos genéticos em enzimas

metabolizadoras, transportadores ou receptores contribuem para as variações nas respostas a medicamentos, e devem ser alvos de pesquisas básicas para fornecer informações populacionais e científicas para a farmacogenética.

7. CONCLUSÃO

Polimorfismos de risco para doenças multifatoriais previamente identificados em populações específicas podem se comportar como um polimorfismo de risco, neutro ou proteção, em outras comunidades em função do perfil genético de cada grupo. Assim, estudos de diferentes populações são importantes para identificar os alelos de risco. Nesse estudo os resultados sugerem que o genótipo CT do polimorfismo rs1801133 do gene MTHFR e o genótipo GG do polimorfismo rs3851179 do gene *PICALM* apresentam associação positiva com a Doença de Alzheimer Esporádica em pacientes de Vitória-ES, demonstrando pelo valor de ODDS RATIO e pela confirmação realizada pela regressão logística. Já os polimorfismos rs11767557 do gene EPHA1, rs387906576 ECA e rs74315304 do gene Cat-D, não estão associados estatisticamente com a DA para população capixaba.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarez, R.; Alvarez, V.; Lahoz, C. H. et al. Angiotensin converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase DNA polymorphisms and late onset Alzheimer's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.**, v.67, p.733–736, 1999.

Arlt, S.; Demiralay, C.; Tharun, B. et al. Genetic risk factors for depression in Alzheimer's disease patients. **Curr Alzheimer Res.**, v.10, p.72-81, 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALZHEIMER. Disponível em: <<http://abraz.org.br/>>. Acesso em 20 de novembro de 2013.

Baig, S.; Joseph, S. A.; Tayler, H.; et al. The Distribution and Expression of Picalm in Alzheimer Disease. **J Neuropathol Exp Neurol.**, v.69, p. 1071–1077. 2010.

Bertram, L.; Lill, C.M.; Tanz, R.E. The Genetics of Alzheimer Disease: Back to the Future. **Neuron.**, v. 68, p. 270 281, 2010.

Bhojak T.J.; DeKosky S.T.; Ganguli M. et al. Genetic polymorphisms in the cathepsin D and interleukin-6 genes and the risk of Alzheimer's disease. **Neurosci Lett.**, v. 288, p.21–4, 2000.

Blessed, G.; Tomlinson, B.E.; Roth, M. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. **Br. J. Psychiatry.**, v. 114, p. 797–811, 1968.

Breitner, J.C.; Wyse, B.W.; Anthony, J.C.; et al. APOE-epsilon4 count predicts age when prevalence of AD increases, then declines: the Cache County Study. v.53, p. 321-31, 1999. Boller, F.; Forbes, M.M. History of dementia and dementia in history: an overview. **J. Neurol. Sci.**, v. 158, p. 125–133, 1998.

Brunelli, T.; Bagnoli, S.; Giusti, B. et al. The C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation is not associated with Alzheimer's disease. **Neurosci. Lett.**, v. 315, p.103–105, 2001.

Caixeta, L. Evolução do conceito de doença de Alzheimer. In: Caixeta L (Ed). **Doença de Alzheimer.**, Porto Alegre: Artmed, p. 21–29, 2012.

Carrasquillo, M.M.; Belbin, O.; Hunter, T.A. et al. Replication of *CLU*, *CR1*, and *PICALM* associations with Alzheimer disease. **Arch. Neurol.**, v.67, 961–964, 2010.

Chevallier, N.; Vizzavona, J.; Marambaud, P. et al. Cathepsin D displays in vitro betasecretase-like specificity, **Brain Res.**, v.750, p.11–19, 1997.

Cousin, E.; Macé, S.; Rocher, C. et al. No replication of genetic association between candidate polymorphisms and Alzheimer's disease. **Neurobiol. Aging.**, v.32, p.1443–1451, 2011.

Davidson, Y.; Gibbons, L.; Pritchard, A. Genetic associations between cathepsin D exon 2 CRT polymorphism and Alzheimer's disease, and pathological correlations with genotype. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.**, v.77, p. 515–517, 2006.

Dean, R. T. Direct evidence of importance of lysosomes in degradation of intracellular proteins. **Nature**, v.257, p.414 – 416, 1975.

Elias-Sonnenschein; L.S.; Bertram, L.; Visser, P.J. Relationship between genetic risk factors and markers for Alzheimer's disease pathology. **Biomark Med.**, v.6, p.477-95, 2012.

Elkins, J.S.; Douglas, V.C.; Johnston, S.C. Alzheimer disease risk and genetic variation in ACE: a meta analysis. **Neurology.**, v.62, p.363–368, 2004.

Eriksson. U.; Danilczyk, U.; Penninger. J.M. Just The Beginning: Novel Functions for Angiotensin-Converting Enzymes. **Current Biology.**, v. 12, p. R745–R752, 2002.

Evin, G.; Cappai, R.; Li, Q.X. et al. Candidate g-secretases in the generation of the carboxyl terminus of the Alzheimer's disease bA4 amyloid: possible involvement of cathepsin D, **Biochemistry.**, v.34, p. 14185- 14192, 1995.

Folstein, M. F.; Folstein, S.E.; McHugh, P.R. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. **J Psychiatr Res.**, v.12, p.189–198, 1975.

Forlenza, O.V.; Gattaz, W.F. Influência de mecanismos colinérgicos nos processos neurodegenerativos relacionados à formação de amilóide e à fosforilação da proteína tau. **Rev Psiq Clin.**, v.25, p.114-7, 1988.

Fusek M, Vetvicka V. Mitogenic function of human procathepsin D – the role of the propeptide. **Biochem J.**, v. 303, p.775–780.

Göhring, U.J.; Scharl, A.; Thelen, U. et al. Prognostic value of cathepsin d in breast cancer: comparison of immunohistochemical and immunoradiometric detections methods. **J Clin Pathol.**, v.49, p.57–64, 1996.

Goldgaber, D.; Lerman, M.I.; McBride, O.W. et al. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. **Science.**, v. 235, p.(4791):877-80, 1987.

Harold, D.; Abraham, R.; Hollingworth, P. et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. **Nat. Genet.**, v,10.1038. n, 440. 2009.

Hemming, M.L.; Selkoe, D.J. Amyloid beta-protein is degraded by cellular angiotensin-converting enzyme (ACE) and elevated by an ACE inhibitor. **J. Biol. Chem.**, v.280, p.37644–37650, 2005.

Hippius, H.; Neundörfer, G. The discovery of Alzheimer's disease. **Dialogues in Clinical Neuroscience.**, v. 5, p. 1, 2003.

Hollingworth, P.; Harold, D.; Sims, R. et al. Common variants in ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. **Nat Genet.**, v.43, p. 429–435, 2011.

Hughes, T. M.; Lopez, O.L.; Evans. R.W. Markers of cholesterol transport are associated with amyloid deposition in the brain. **Neurobiology of Aging.**, v.1, p.6, 2013.

Hua, Y.; Zhao, H.; Kong, Y. et al. Association between the *MTHFR* gene and Alzheimer's disease: a meta-analysis. **Int. J. Neurosci.**, v.121, p.462–471, 2011.

Ingeni, T.; Nocentini, G.; Mariani, E. et al. Cathepsin D polymorphism in Italian elderly subjects with sporadic late onset Alzheimer's Disease. **Dement Geriatr Cogn Disord.**, v. 16, p. 151-155, 2003.

James, S.J.; Pogribna, M.; Pogribny, I.P. et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, p.495–501, 1999.

Kang, J.; Lemaire, H.G.; Unterbeck, A. et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. **Nature.**, v.325, p.(6106):733-6, 1987.

Kehoe, P.G.; Russ, C.; McIlroy, S. Variation in *DGP1*, encoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer disease. **Nature Genetics.**, v.21, p.71 – 72, 1999.

Kim, T.W.; Pettingell, W.H.; Jung, Y.K. Alternative Cleavage of Alzheimer-Associated Presenilins During Apoptosis by a Caspase-3 Family Protease. **Science.**, V. 277, p. 373-376, 1997.

Kolsch, H.; Jessen, F.; Freymann, N. et al. ACE I/D polymorphism is a risk factor of Alzheimer's disease but not of vascular dementia. **Neurosci. Lett.**, v.377, p.37–39, 2005.

Kruman, I.I.; Culmsee, C.; Chan, S.L.; et al. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. **J Neurosci.**, v.20, p.6920-6926, 2000.

Kruman, I.I.; Kumaravel, T.S.; Lohani, A.; et al. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. **J Neurosci.**, v.22, p.1752-1762, 2002.

Lehmann, M.; Gottfries, C.G.; Regland, B. Identification of cognitive impairment in the elderly: homocysteine is an early marker. **Dement. Geriatr. Cogn. Disord.**, v.10, p.12–20, 1999.

Levy-Lahad, E.; Wasco, W.; Poorkaj, P. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. **Science.**, v. 269 (5226) p. 973-7, 1995.

Li, X. Q.; Chen, D.; Zhang, Z. X. et al. Association between Cathepsin D polymorphism and Alzheimer's Disease in a Chinese Han population. **Dement Geriatr Cogn Disord.**, v.18, p. 115-119, 2004.

Lorenzo, A.; Yankner, β Amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. **Neurobiology.** v. 91, p. 12243-12247, 1994.

Lovestone, S.; Reynolds, C.H.; Latimer, D. et al. Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. **Current Biology.**, v.4, p.1077-1086, 1994.

Malouf, M.; Grimley, E.J.; Areosa, S.A.; Folic acid with or without vitamin B12 for cognition and dementia. **Cochrane Database Syst Rev.**, v.4, p.14, 2003.

Mann, D.M.; Iwatsub, T.; Pickerin-Brown, S.M. et al. Preferential deposition os amyloid beta protein (Abeta) in the form A beta40 in Alzheimers Disease is associated with a gene dosage effect of the apolipoprotein E E4 allele. **Neurosci. Lett.**, v.221, p.81-84, 1997.

Mansouri, L.; Fekih-Mrissa, N.; Klai, S. et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms with susceptibility to Alzheimer's disease. Clin. **Neurol. Neurosurg.**, v.115, p.1693–1696, 2013.

Matsui, t.; Morikawa, Y.; Tojo, M. et al. Cathepsin D polymorphism not associated with Alzheimer's Disease in Japanese. **Ann Neurol.**, v.49, p.544-545, 2001.

McKhann, G.M.; Knopman, D.S.; Chertkow, H. et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging–Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement.**, v.7, p.263–269, 2011.

Meng, Y.; Baldwin, C. T.; Bowirrat, A. et al. Association of Polymorphisms in the Angiotensin-Converting Enzyme Gene with Alzheimer Disease in an Israeli Arab Community. **Am. J. Hum. Genet.**, v.78, p.871–877, 2006.

Monastero, R.; Caldarella, R.; Mannino,M.; Lack of association between angiotensin converting enzyme polymorphism and sporadic Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters.**, v. P. 147–149, 2002.

Moreno, J. A.; Halliday, Mark; Molloy, Colin. et al. Oral Treatment Targeting the Unfolded Protein Response Prevents Neurodegeneration and Clinical Disease in Prion-Infected Mice. **Science Translational Medicine.**, v.5, p. 1-10, 2013.

Miller, S.A.; Dykes, D.D.; Polesky, H.F. A Yesple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.**, v,16, p. 1215, 1988.

Naj, A. C.; Jun, G.; Beecham, G. W. et al. Common variants in *MS4A4/MS4A6E*, *CD2uAP*, *CD33*, and *EPHA1* are associated with late-onset Alzheimer's disease. **Nat Genet.**, v.43, p. 436–441, 2011.

Narain, Y.; Yip, A.; Murphy, T. et al. The *ACE* gene and Alzheimer's disease susceptibility. **J Med Genet.**, v.37, p.695–697, 2000.

Nakopoulou, L.; Lazaris, A.C.; Baltas,D. et al. Prognostic evaluation of oestrogen regulated protein immunoreactivity inductal invasive (nos) brest cancer. **Virchous Archiv.**, v. 427, p. 33-40, 1995.

Nevala, S.M.; Sarhadi, V.K.; Tuononen, K. Mutated Ephrin Receptor Genes in Non-Small Cell Lung Carcinoma and Their Occurrence with Driver Mutations—Targeted Resequencing Study on Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tumor Material of 81 Patients. **Genes, Chromosomes & Cancer.**, v.52, p.1141–1149, 2013.

Nixon, R. A.; Mathews, P. M.; Cataldoa, A. M. The neuronal endosomal-lysosomal system in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease.**, v.97, p.107, 2001.

Panza, F.; D'Introno, A.; Colacicco, A.M. et al. LBP-1c/CP2/LSF gene polymorphism and risk of sporadic Alzheimer's disease. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.**, v. 75, p.166–168, 2004.

Papassotiropoulos. A; Bagli, M; Feder, O. et al. Genetic polymorphism of cathepsin D is strongly associated with the risk for developing sporadic Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters.**, v.262, p.171–174, 1999.

Paul, M. K.; Mukhopadhyay, A. K.; Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. **Int. J. Med. Sci.**, v.1, p.101-115, 2004.

Reynolds EH. Benefits and risks of folic acid to the nervous system. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.**, v.72, p.567–57, 2002.

Rigat, B; Hubert, C; Corvol, P. et al. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). **Nucleic Acids Res.**, v.20, p.14-33,1992.

Riggs, K.M.; Spiro, A. 3rd.; Tucker, K.; et al. Relations of vitamin B-12, vitamin B-6, folate, and homocysteine to cognitive performance in the Normative Aging Study. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.63, p.306–314, 1996.

Robinson. D, R.; Wu,Y. M.; Lin, S. F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. **Oncogene.**, v.19, p. 5548 – 5557, 2000.

Robakis, N. K.; Ramakrishna, N.; Wolfe, G. et al. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. **Natn. Acad. Sci.** v.84, p.4190–4194,1987.

Sai, X.; Kawamura, Y.; Kokame, K. et al. Endoplasmic reticulum stress inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid beta-protein. **J. Biol. Chem.**, v.277, p.12915–12920, 2002.

Schachter, F.; Faure-Delanef, L.; Guenot, F. et al. Genetic association with human longevity with the APOE and ACE loci. **Nat. Genet.**, v.6, p.429–432, 1994.

Simón, A. M.; Maturana, R. L.; Ricobarazaa, A.; et al. Early Changes in Hippocampal Eph Receptors Precede the Onset of Memory Decline in Mouse Models of Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease.**, v.17, p.773–786, 2009.

Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y. et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. **Nature.**, v.375(6534), p754-60,1995.

Silva,V.C.; Ramos, F.J.C.; Freitas,E.M. et al. Alzheimer's disease in Brazilian elderly has a relation with homocysteine but not with MTHFR polymorphisms **Arq Neuropsiquiatr.**, v.64, p.941-945, 2006.

Skibola,F.; Smith,T.M.; Kane,E. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase are associated with susceptibility to acute leukemia. **Medical sciences.**, v.32, p. 678-681, 1999.

St George-Hyslop, P.H.; Tanzi, R.E.; Polinsky, R.J. et al. The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. **Science.**, v. 235(4791) p.885-890, 1987.

Suo, Z.; Fang, C.; Crawford, Fiona.; Mullan, M.; et al. Superoxide free radical and intracellular calcium mediate $A\beta_{1-42}$ induced endothelial toxicity. **Brain Research.** v. 762, p. 144–152, 1997.

Tanzi, R.E.; Bertram, L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic concoperspective. **Cell.**, V.120, p.545–555, 2005.

Thomas, P.; Fenech, M. A review of genome mutation and Alzheimer's disease. **Mutagenesis.**, vol. 22 no. 1 p. 15–33, 2006.

Wakutani,Y.; Kowa, H.; Kusumi, M. et al. A haplotype of the methylenetetrahydrofolate reductase gene is protective against late-onset Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging.**, v.2, p.291-294, 2004.

Weisberg, I.; Tran, P.; Christensen, B. et al. A Second Genetic Polymorphism in Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Associated with Decreased Enzyme Activity. **Molecular Genetics and Metabolism.**, v.64, p. 169-172, 1998.

Yamada, K.; Chen, Z.; Rozen, R. et al. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. **PNAS**, v.98, p.26, 2001.

Yamazaki, T.; Masuda, J.; Omori, T. et al. EphA1 interacts with integrin-linked kinase and regulates cell morphology and motility. **Journal of Cell Science.**, v.122, p.243-245, 2008.

Yu, J.T.; Li, L.; Zhu, Q.X. et al. Implication of *CLU* gene polymorphisms in Chinese patients with Alzheimer's disease. **Clin. Chim. Acta.**, v. 411, p.1516–1519. 2010.

Zhang, M.Y.; Miao, Ling.; Li Y.S. et al. Meta-analysis of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and susceptibility to Alzheimer's disease. **Neuroscience Research.**, v. 68, p.142–150, 2010.

ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa




DECLARAÇÃO

O projeto de pesquisa “**Estudo Genético e de Instabilidade Genômica da Doença de Alzheimer em Pacientes de Vitória, ES**”, cadastrado com o No **053/2010**, do pesquisador responsável “**Flávia de Paula**”, foi analisado e julgado pelo Colegiado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) desta Instituição.

Declaramos que o referido projeto cumpre plenamente as exigências da resolução 196/96 e resoluções posteriores da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde e, portanto, foi **APROVADO**, pelo Colegiado do CEP na reunião ordinária de 27/07/2010.

Este projeto de pesquisa não poderá sofrer interrupção ou modificação na forma original apresentada sem o prévio conhecimento e consentimento deste CEP. Cabe esclarecer que o pesquisador responsável tem a obrigação de apresentar relatório dos resultados da pesquisa deste projeto ao CEP na data máxima de **27/07/2011**, sendo que o não cumprimento deste prazo resultará no impedimento do pesquisador responsável submeter novos projetos de pesquisa para análise neste CEP.

Vitória, 28 de julho de 2010.


Dr. *Elisardo C. Vasquez*
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa
EMESCAM

Anexo 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento Ciências Biológicas /
CCHN

I - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA:

Estudo genético e de instabilidade genômica da doença Alzheimer em pacientes de Vitória – ES.

Pesquisador responsável: Flavia de Paula

Descrição: Atualmente as pessoas estão vivendo por mais tempo e isso fez com que um grande número de indivíduos venha a desenvolver algumas doenças relacionadas com a idade, entre elas a doença Alzheimer. Esta doença não tem causa conhecida, mas pode ser influenciada por fatores ambientais (fumo, obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes etc.) e fatores genéticos (características herdadas dos nossos pais). Nossa pesquisa pretende estudar as causas genéticas da doença Alzheimer, para isto nós vamos estudar genes relacionados com a doença na população de Vitória, ES. É importante falar que este é um estudo voluntário, ou seja, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a participar deste estudo. Contudo, a sua participação nesta pesquisa é muito importante, pois os resultados gerados a partir desta pesquisa podem dar informações que auxiliem no desenvolvimento de futuras estratégias de estudo da doença Alzheimer em nossa população. Quem quiser participar desta pesquisa precisa preencher este termo de consentimento. Além disto, nós vamos coletar 20 mL de sangue dos voluntários que concordarem em participar da pesquisa.

Avaliação do risco da pesquisa:

() sem risco (x) risco mínimo () risco médio ()
risco maior

O risco mínimo se refere à eventual possibilidade de hematoma (roxo ou vermelhidão) e/ou dor mínima na região da coleta de sangue.

II – DIREITOS E GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

O(a) senhor(a) não é obrigado(a) a participar desta pesquisa. Os participantes que quiserem participar têm acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para fazer perguntas que esclareçam dúvidas. O(a) senhor(a) pode retirar seu consentimento a qualquer momento e a não adesão a este projeto de pesquisa não implicará em prejuízo de qualquer natureza. Asseguramos que as amostras de seu DNA não serão utilizadas para fins de direito civil e penal (investigação criminal ou identificação humana para paternidade e maternidade), mas apenas para os fins descritos no presente protocolo de pesquisa. Não haverá ônus (gastos) para os participantes da pesquisa. Os resultados desta pesquisa serão divulgados na comunidade científica, contudo a identidade dos participantes não será revelada preservando a confidencialidade, sigilo e privacidade do participante. Não estão previstas formas de ressarcimento ou indenizações durante a pesquisa. Os participantes que concordarem em participar da pesquisa deverão preencher o Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

III – Informações sobre os responsáveis pelo acompanhamento da pesquisa:

Referências: Flavia de Paula.

Endereço: Laboratório de Genética Humana e Molecular (NGHM), Departamento de Ciências Biológicas CCHN/UFES, Av. Marechal Campos 1468, Campus de Maruípe, Vitória - ES, CEP: 29.043-900, Telefone: (27) 2122-7255

IV- DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA.

NOME

TELEFONE

DATA NASCIMENTO IDADE SEX

F

ENDEREÇO

ETNIA ESCOLARIDADE

Responsável legal (se necessário):

NOME

IDADE GRAU DE PARENTESCO

TELEFONE

V – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente protocolo de pesquisa.

- () Desejo conhecer os resultados dessa pesquisa
- () Não desejo conhecer os resultados dessa pesquisa

Local e data

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Assinatura do pesquisador responsável (Flavia de Paula)

--

Caso o(a) senhor(a) tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador responsável, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa da EMESCAM (coordenador: Elisardo Corral Vasquez) pelo telefone 3334-3586, pelo e-mail comite.etica@emescam.br ou pelo seguinte endereço: Av. Nossa Senhora da Penha, 2190, Santa Luiza - Vitória - ES - 29045-402.

APÊNDICE A – Questionário de Saúde Pessoal

(de acordo com modelo recomendado por: International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens: considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. Mutat Res, v. 204, p. 379-406, 1998, com adaptações)

HISTÓRIA PESSOAL■Data ■Qual a sua idade? anos■Sexo Masculino Feminino

■A qual grupo étnico o(a) Sr(a) pertence?

 Caucasiano Negro Oriental Indígena Outro. Qual?

■Qual o seu estado civil?

 Casado Solteiro Separado Divorciado Viúvo Não informado■De quantos filhos o(a) Sr(a) é pai (mãe) natural (isto é, não inclua filhos adotados e de criação e inclua filhos que moram separadamente)? ■Qual é a renda mensal de sua família? salários.

■Qual a sua escolaridade?

 Sem escolaridade Ensino fundamental Ensino médio Educação superior Não informado

HISTÓRIA OCUPACIONAL

■Qual é o seu local de trabalho?

■Há quanto tempo o(a) Sr(a) trabalha nesse local?

■Se há menos de dez anos, onde o(a) Sr(a) trabalhou previamente e por quanto tempo?

■Que tipo de trabalho o(a) Sr(a) faz?

■Qual é a sua carga horária de trabalho?

EXPOSIÇÃO

■Liste os agentes químicos (por exemplo, gases tóxicos, benzeno, chumbo, fármacos, agrotóxicos etc) ou físicos (radiação) a que o(a) Sr(a) se expôs nos últimos 10 anos em seu trabalho.

Nos últimos 10 anos
mês?

Quantas vezes por

Nos últimos 12 meses

Quantas vezes por mês?

■O(a) Sr(a) usa algum tipo de proteção?

SIM Qual?

NÃO

HISTÓRIA DE FUMO

■Alguma vez o(a) Sr(a) fumou?

SIM e não fuma atualmente

Por quanto tempo o(a) Sr(a) fumou? anos

Há quanto tempo parou de fumar? anos

O que fumou?

Cigarro

Charuto

Cachimbo

Quantos cigarros (ou charutos ou cachimbos) o(a) Sr(a) fumava por dia?

SIM e fuma atualmente

O que fuma?

Cigarro

Charuto

Cachimbo

Quantos cigarros (ou charutos ou cachimbos) o(a) Sr(a) fuma por dia?

NÃO, e não convive com fumantes.

NÃO, mas convive com fumantes.

MEDICAMENTOS E DOENÇAS

■O(a) Sr(a) tem tomado algum medicamento prescrito pelo médico, no último ano (por exemplo, comprimidos para pressão, insulina, tranquilizantes, relaxantes musculares, antidepressivos etc.)?

NÃO

SIM

Medicamento

Dose

Duração do tratamento

O(a) Sr(a) tem tomado algum medicamento não prescrito por médico no último ano (por exemplo, aspirina, antiácido, anti-histamínicos, sedativos ou outras drogas)?

NÃO

SIM

Medicamento

Dose

Duração do tratamento

■O(a) Sr(a) tomou alguma vitamina nos últimos 6 meses?

NÃO

SIM

Medicamento

Dose

Duração do tratamento

■O(a) Sr(a) teve alguma dessas doenças?

Câncer Tipo

Hepatite

Mononucleose

Herpes

AIDS

Meningite

Infecção bacteriana ou viral

Doença cardiovascular

Diabete

Doença renal crônica

Doença de Parkinson

Doença Alzheimer Tempo desde o diagnóstico

Outra(s) doença(s) importante(s)

■Liste as vacinações que o (a) Sr (a) recebeu nos últimos 12 meses.

Vacina

Data

■ Liste os raios-X diagnósticos e terapêuticos recebidos nos últimos 12 meses.

Razão para o raio-X

Data (ano)

■ O(a) Sr(a) passou por alguma cirurgia durante o último ano?

Motivo

Data

HÁBITOS ALIMENTARES FREQUENTES

■ O(a) Sr(a) come apenas vegetais?

SIM

NÃO

■ O(a) Sr(a) come carne?

NÃO

SIM

Com que frequência?

Dias por semana

	1 a 2	3 a 4	5 a 6	todos os dias
Carne bovina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Peixe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Frango	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Porco	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Outras	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		

■ O(a) Sr(a) usa adoçantes?

NÃO

SIM. Quantas vezes ao dia?

■O(a) Sr(a) bebe refrigerantes?

NÃO

SIM. Quantas vezes por semana?

■O(a) Sr(a) toma café?

NÃO

SIM. Quantas xícaras pequenas por dia?

■O(a) Sr(a) bebe chá?

NÃO

SIM. Quantas xícaras pequenas por dia?

■O(a) Sr(a) toma chimarrão?

NÃO

SIM. Com que frequência?

■O(a) Sr(a) bebe cerveja?

NÃO

SIM. Qual a sua média de consumo semanal?

menos de uma garrafa por semana

1-6 garrafas por semana

7-12 garrafas por semana

13-24 garrafas por semana

mais de 24 garrafas por semana. Quantas?

■O(a) Sr(a) bebe vinho?

NÃO

SIM. Qual a sua média de consumo semanal:

1-4 copos por semana ou menos

5-8 copos por semana

9-16 copos por semana

mais de 16 copos por semana. Quantos?

■O(a) Sr(a) bebe outras bebidas alcoólicas (excluindo cerveja e vinho)?

NÃO

SIM.

Qual ou quais?