



Análise molecular dos principais genes (*APOE*, *CLU*, *CR1* e *PICALM*) relacionados à Doença de Alzheimer em uma amostra de pacientes do Rio de Janeiro

Tamara Silva

Orientadores: Prof. Dr. Pedro Hernán Cabello Acero

Prof. Dr. Jerson Laks

Duque de Caxias, 2017

Tamara Silva

Análise molecular dos principais genes (*APOE*, *CLU*, *CR1* e *PICALM*) relacionados à Doença de Alzheimer em uma amostra de pacientes do Rio de Janeiro

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional na Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO como parte das exigências para a obtenção ao título de mestre em Ciências Biomédicas.

Orientadores: Prof. Dr. Pedro Hernán Cabello Acero

Prof. Dr. Jerson Laks

Duque de Caxias, 2017

S586a Silva, Tamara.

Análise molecular dos principais genes (APOE, CLU, CR1 e PICALM) relacionados à Doença de Alzheimer em uma amostra de pacientes do Rio de Janeiro / Tamara Silva. – Duque de Caxias, 2017.

88 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy", Escola de Ciências da Saúde, 2017.

"Orientador: Prof. Dr. Pedro Hernán Cabello Acero".

"Orientador: Prof. Dr. Jerson Laks".

Bibliografia: f. 62-74

1. Ciências Biomédicas. 2. Doença de Alzheimer. 3. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Tratamento. 4. Genes. 5. Sistema nervoso - Doenças. 6. Sistema nervoso - Degeneração. I. Acero, Pedro Hernán Cabello. II. Laks, Jerson. III. Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy". III. Título.

CDD – 610

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado

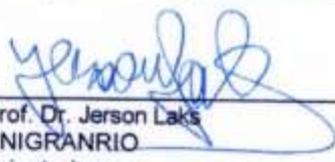


As nove horas do dia vinte e seis de maio do ano de 2017, Sala 209 do bloco A, Campus I da Universidade do Grande Rio, situado à Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160, Duque de Caxias, RJ realizou-se a Defesa da Dissertação de Mestrado intitulada "Análise molecular dos principais genes (APOE, CLU, CR1 E PICALM) relacionados à Doença de Alzheimer em uma amostra de pacientes do Rio de Janeiro", de autoria de **Tamara Silva**, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional - Biotrans, sob a orientação da Professor Dr. Pedro Cabello Hernan Acero e Professor Dr. Jerson Laks. A sessão foi aberta pela Prof.ª Dr.ª Cláudia Maria Pereira, presidente da Comissão, que nos termos regimentais convocou os demais Membros da Comissão Examinadora: Prof. Dr. Pedro Cabello Hernan Acero (orientador), Prof.ª Dr.ª Verônica Marques Zembrzuski e Prof.ª Dr.ª Vivianne Galante Ramos. Em seguida passou a palavra à candidata para apresentação de sua dissertação. Após apresentação, a candidata foi arguida pelos examinadores, e suas respostas consideradas satisfatórias.

O presidente declarou a mestranda **Tamara Silva**, aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas em acordo com o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – Biotrans. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão, onde foi lavrada a presente ata, que será assinada pelos Membros da Comissão Examinadora.

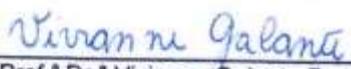
Duque de Caxias, 26 de maio de 2017.

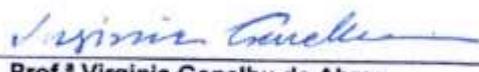

Prof. Dr. Pedro Cabello Hernan Acero
UNIGRANRIO
Orientador


Prof. Dr. Jerson Laks
UNIGRANRIO
Orientador


Prof.ª Dr.ª Cláudia Maria Pereira
Universidade do Grande Rio
Presidente


Prof.ª Dr.ª Verônica Marques Zembrzuski
FIOCRUZ


Prof.ª Dr.ª Vivianne Galante Ramos
UNIGRANRIO


Prof.ª Virginia Genelhu de Abreu
Coordenadora Geral do Programa
Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – BIOTRANS

*Aos meu pais, Aliomar e Danivar,
meu noivo Angelo Rodrigo, amigos e familiares.*

AGRADECIMENTOS

À Deus antes de tudo, pelas oportunidades e por colocar pessoas de luz em meu caminho que me auxiliaram e encorajaram a seguir em frente.

À Universidade do Grande Rio, especialmente ao Laboratório de Genética (LabGen), pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À toda equipe do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional pela dedicação e apoio em todas as aulas ministradas, palestras e eventos proporcionados.

Ao meu querido orientador Pedro Cabello pelo acolhimento, sua orientação, enorme paciência, ensinamentos, conselhos e por ser um grande exemplo e inspiração profissional.

Ao meu querido co-orientador Jerson Laks pela orientação, colaboração, conselhos, por ampliar meus conhecimentos e pela paciência.

À Vivianne Galante por todo zelo, ensinamento, ajuda em todos os momentos de dificuldade, dedicação, confiança, amizade, companheirismo, exemplo e grande inspiração profissional.

À Danielle Voigt não encontro palavras para agradecer o suficiente. Serei para sempre grata por acreditar no meu potencial quando nem eu mesma acreditava, por todo ensinamento, dedicação, paciência, amizade e companheirismo.

À Dra. Verônica Zembrzuski pela oportunidade inicial de estágio no LabGen e por revisar minha dissertação.

À Dra. Marialva pela colaboração e toda assistência na captação de amostras no Programa de Atenção Integrada da Saúde do Idoso do Município de Duque de Caxias.

À Dra. Valesca e à Dra. Glória do Instituto de Psiquiatria da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelo auxílio na captação de amostras.

À Ana Carolina do Laboratório de Genética da Fiocruz pelo ensinamento e apoio.

À Dra. Cláudia Maria pela ajuda em vários momentos desta jornada e pelo apoio a seguir em frente.

À querida doutoranda Raísa por todo apoio e tempo disponível para me auxiliar em vários momentos de execução do trabalho e descontração.

Às alunas Riteli Bastos, Danielle Rodrigues e Sarah Mendonça pelo auxílio e momentos de alegria e descontração.

À aluna Rafaella Alcântara pelo auxílio e paciência infinita.

Aos meus pais, Aliomar e Danivar, pelo apoio em todos os momentos, confiança na minha capacidade, paciência nas situações difíceis, por serem indispensáveis em minha vida, pelo amor incondicional e torcida pelo meu sucesso.

Ao meu noivo Angelo Rodrigo, pelo incentivo, paciência, confiança, compreensão, por todo amor e companheirismo em todos os momentos.

Aos meus familiares e amigos que, mesmo de longe, sempre estiveram na torcida pelo meu sucesso nessa difícil caminhada.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

A expectativa de vida vem aumentando em todo o mundo, o que acarreta um incremento da prevalência de doenças neurodegenerativas. No Brasil observa-se uma rápida mudança na pirâmide etária brasileira, na qual a população idosa tem um aumento significativo. Neste projeto, foram estudados os fatores genéticos envolvidos no desenvolvimento de umas das principais doenças da população idosa: a Doença de Alzheimer (DA). Esta doença pode se apresentar na forma precoce e na tardia. Na forma precoce, os fatores genéticos exercem influência preponderante, enquanto na forma tardia existe uma forte interação de fatores ambientais e genéticos, sendo estes últimos menos significativos. Em relação à DA de início precoce, existem três genes causais - *APP*, *PSEN1* e *PSEN2*. Por outro lado, na DA de início tardio somente o gene da Apolipoproteína E (*APOE*) tem sido irrefutavelmente reconhecido como fator de risco para a mesma, mas têm sido sugeridos outros genes como envolvidos no desenvolvimento da doença (*CLU*, *CR1* e *PICALM*). Uma vez que a população brasileira é miscigenada, torna-se relevante o estudo de genes que se apresentam como os mais prováveis candidatos ou moduladores da doença. O objetivo principal deste estudo foi realizar uma análise molecular de 4 genes envolvidos com a doença de Alzheimer (*CLU*, *CR1*, *PICALM* e *APOE*). Foram recrutados 269 indivíduos acima de 55 anos, atendidos no Instituto de Psiquiatria da Universidade Federal do Rio de Janeiro e pelo Programa de Assistência Integrada da Saúde do Idoso de Duque de Caxias, e em todos foi aplicado o CDR (*Clinical Dementia Rating*). As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Genética - LABGEN/Unigranrio. A genotipagem dos polimorfismos estudados foi feita através da técnica de PCR em Tempo Real. Na análise genotípica realizada para os polimorfismos *rs6656401* do gene *CR1*, para o *rs429358* e *rs7412* do gene *APOE*, foram encontradas significâncias estatísticas ($p=0,006$, $p=0,000$, $p=0,028$, respectivamente). Na análise alélica o polimorfismo *rs429358* do gene *APOE* apresentou *odds ratio* 4,009 e $p=0,000$ mostrando-se significativamente associado com a doença. A análise haplotípica revelou um risco de desenvolvimento da doença 3 vezes maior para os indivíduos portadores do haplótipo $\epsilon 3$ ($p=0,002$) e 6 vezes maior para os indivíduos portadores do haplótipo $\epsilon 4$ ($p=0,002$). Com relação aos polimorfismos *rs11136000* do gene *CLU* e *rs3851179* do gene *PICALM*, não foi observado significância estatística na análise genotípica ($p=0,168$, $p=0,084$, respectivamente) e também não fora observada significância, na análise alélica, para os genes *CLU*, *CR1*, *PICALM* e *APOE* (*rs7412*). Podemos concluir que na população estudada, foram encontradas associações dos genes *CR1* e *APOE* com a Doença de Alzheimer.

Palavras-chave: Doença neurodegenerativa, Alzheimer, PCR em Tempo Real, Polimorfismos, Genes, *CLU*, *CR1*, *PICALM*, *APOE*, Haplótipo.

ABSTRACT

The longevity is increasing in our society and consequently increasing the prevalence of neurodegenerative diseases, usually determined by multifactorial character. In Brazil, it is not different. In recent times, a rapid change has been observed in the Brazilian age pyramid, in which the elderly population has undergone a significant increase, which is why it is necessary to change the focus of research to the diseases of the elderly population. This project intends to study genetic factors involved in the development of one of the major diseases of the elderly population: Alzheimer's Disease (AD). This disease may present both early and late forms. In the early form, the genetic factors have significant effects, whereas in the late form, there is a strong interaction of environmental and genetic factors, the latter being less significant. In relation to early-onset AD, there are three causal genes: *APP*, *PSEN1* and *PSEN2*. On the other hand, in the late-onset AD only the Apolipoprotein E gene (*APOE*) has been irrefutably recognized as a risk factor for it, but other genes have been suggested as involved in disease development, *CLU*, *CR1* and *PICALM*. Once the Brazilian population is mixed, it is relevant to study genes that present themselves as the most likely candidates or modulators of the disease. The main objective of this study was to perform a molecular analysis of four genes involved with Alzheimer's Disease (*CLU*, *CR1*, *PICALM* and *APOE*). A total of 269 individuals over 55 years of age were recruited at the Institute of Psychiatry of the Federal University of Rio de Janeiro and the Integrated Health Care Program for the Elderly in Duque de Caxias, and in all, the CDR (Clinical Dementia Rating) was applied. Molecular analyzes were performed at the Laboratory of Genetics - LABGEN/Unigranrio. The genotyping of the polymorphisms studied was done using the Real Time PCR technique. In the genotype analysis performed for *rs6656401* polymorphism of the *CR1* gene, for *rs429358* and *rs7412* of the *APOE* gene, statistical significance ($p=0,006$, $p=0,000$, $p=0,028$, respectively) was found. In allelic analysis the polymorphism *rs429358* of the *APOE* gene showed *oddis ratio* 4,009 and $p=0,000$ showing to be significantly associated with the disease. Haplotype analysis revealed a risk of developing the disease 3 times higher for individuals with $\epsilon 3$ haplotype ($p=0,002$) and 6 times higher for individuals with $\epsilon 4$ haplotype ($p=0,002$). In relation to the polymorphisms *rs11136000* of the *CLU* gene and *rs3851179* of the *PICALM* gene, no statistical significance was observed in the genotypic analysis ($p=0,168$, $p=0,084$, respectively) and no significance was observed in the allelic analysis for *CLU*, *CR1*, *PICALM* and *APOE* (*rs7412*). We can conclude that in the studied population, associations of the *CR1* and *APOE* genes with Alzheimer's Disease were found.

Keywords: Neurodegenerative disease, Alzheimer's, Real-time PCR, Polymorphisms, Genes, *CLU*, *CR1*, *PICALM*, *APOE*, Haplotype.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mudança na pirâmide etária da população brasileira e projeção da pirâmide etária da população para o ano 2020	19
Figura 2. Representação dos estágios e de alguns sintomas clínicos dos indivíduos com Doença de Alzheimer	22
Figura 3. Representação do cérebro e das regiões que são mais afetadas pela Doença de Alzheimer	23
Figura 4. Principais regiões gênicas de interesse na Doença de Alzheimer de acordo com o ano de sua descoberta	27
Figura 5. Representação da estrutura da <i>APOE</i>	29
Figura 6. Sinalização do processo inflamatório neuronal por ativação das células microgliais e astrócitos decorrente do depósito de placa β -amiloide	31
Figura 7. Via metabólica do gene <i>PICALM</i> β -amiloide dependente	33
Figura 8. Via metabólica do gene <i>PICALM</i> β -amiloide independente	34
Figura 9. Uma visão geral de como os genes <i>APOE</i> , <i>CLU</i> , <i>PICALM</i> e <i>CR1</i> estão implicados na susceptibilidade à DA	35
Figura 10. Técnica da Reação em Cadeia de Polimerase - PCR	42
Figura 11. Representação esquemática do processo de emissão de fluorescência na técnica de PCR em tempo real pelo sistema TaqMan	43
Figura 12. Gráficos multicomponentes do gene <i>CLU</i> (<i>rs1136000</i>). O eixo y indica a fluorescência do fluoróforo e o eixo x o número de ciclos. A curva verde indica a fluorescência do VIC e o azul é a fluorescência do FAM. O gráfico A representa um homozigoto e o B um heterozigoto selvagem	44
Figura 13. Gráficos multicomponentes do gene <i>CR1</i> (<i>rs6656401</i>). O eixo y indica a fluorescência do fluoróforo e o eixo x o número de ciclos. A curva verde indica a fluorescência do VIC e o azul é a fluorescência do FAM. O gráfico A representa um homozigoto e o B um heterozigoto selvagem	45

Figura 14. Gráficos multicomponentes do gene *PICALM* (*rs3851179*). O eixo y indica a fluorescência do fluoróforo e o eixo x o número de ciclos. A curva verde indica a fluorescência do VIC e o azul é a fluorescência do FAM. O gráfico A representa um homozigoto e o B um heterozigoto selvagem 46

Figura 15. Gráficos multicomponentes do gene *APOE* (*rs429358*). O eixo y indica a fluorescência do fluoróforo e o eixo x o número de ciclos. A curva verde indica a fluorescência do VIC e o azul é a fluorescência do FAM. O gráfico A representa um homozigoto e o B um heterozigoto selvagem 47

Figura 16. Gráficos multicomponentes do gene *APOE* (*rs7412*). O eixo y indica a fluorescência do fluoróforo e o eixo x o número de ciclos. A curva verde indica a fluorescência do VIC e o azul é a fluorescência do FAM. O gráfico A representa um homozigoto e o B um heterozigoto selvagem 48

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Análise descritiva das variáveis quantitativas para Paciente x Controle.....	50
Tabela 2. Análise descritiva do CDR para Paciente x Controle	50
Tabela 3. Distribuição do CDR entre os gêneros.....	51
Tabela 4. Análise da associação genotípica dos polimorfismos de cada gene...52	
Tabela 5. Análise da associação genotípica do polimorfismo <i>rs6656401</i> do gene <i>CR1</i>	53
Tabela 6. Análise da associação do polimorfismo <i>rs7412</i> do gene <i>APOE</i>	53
Tabela 7. Análise haplotípica dos polimorfismos do gene <i>APOE</i>	54
Tabela 8. Análise de combinação haplotípica dos polimorfismos do gene <i>APOE</i>	54

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Classificação do CDR e os impactos funcionais que cada fase da doença deve apresentar	39
Quadro 2. Sequência das sondas utilizadas para a realização da técnica de PCR em tempo real	41

ÍNDICE DE SÍMBOLOS

♀ Mulheres

♂ Homens

® Copyright

TM Trade Mark

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de Variância

APOE - Apolipoproteína E

APP - Proteína Precursora Amiloide

APP-CTF - Fragmentos C-Terminal

A β 42 - Proteína β -amiloide 42

BHE - Barreira Hematoencefálica

BBB - *Blood-brain barrier*

CDR - *Clinical Dementia Rating*

CLU - Clusterina

CME - Endocitose Mediada por Clatrina

CNVs - Variação do Número de Cópias

CR1 - Receptor do Complemento 1

DA - Doença de Alzheimer

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz

GWAS – Estudos de Associação do Genoma

Labgen - Laboratório de Genética

mL - Mililitro

Ng - Nanogramas

°C - Graus Celsius

ORs - Estimativas de Risco

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase

PCR Real Time - Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real

PICALM - Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein

PSEN1 - Presenilina 1

PSEN2 - Presenilina 2

RNA - Ácido Ribonucleico

RPM - Rotação por Minuto

SNPs - Polimorfismos de Nucleotídeo Único

TC - Tomografia Computadorizada

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIGRANRIO - Universidade do Grande Rio

μL - Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	A Doença de Alzheimer (DA)	20
2.1.1	Características clínicas da Doença de Alzheimer	21
2.1.2	Características histológicas e fisiopatológicas da DA	22
2.1.3	Características moleculares da Doença de Alzheimer	25
2.2	Genes Candidatos	26
2.2.1	Polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs)	28
2.2.2	<i>APOE</i>	28
2.2.3	<i>CLU</i>	30
2.2.4	<i>CR1</i>	30
2.2.5	<i>PICALM</i>	32
3	JUSTIFICATIVA.....	36
4	OBJETIVOS.....	37
4.1	Objetivo Geral.....	37
4.2	Objetivos Específicos.....	37
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
5.1	Amostras.....	38
5.2	Avaliação Clínica	38
5.3	Coleta de sangue periférico	40
5.4	Extração do DNA Genômico.....	40
5.5	Análise dos Polimorfismos Genéticos.....	41
5.6	Curvas de Padronização	43

5.7	Análise Estatística	49
6	RESULTADOS	49
6.1	Caracterização Sociodemográfica da amostra	49
6.2	Análise Genética.....	51
7	DISCUSSÃO	54
7.1	Variantes polimórficas	56
7.1.1	<i>CLU</i>	56
7.1.2	<i>CR1</i>	57
7.1.3	<i>PICALM</i>	58
7.1.4	<i>APOE</i>	59
8	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
	ANEXOS	77

1 INTRODUÇÃO

No ano de 1980, a pirâmide etária brasileira tinha as características próprias das populações de países em desenvolvimento – uma ampla base que se afunilava de maneira quase uniforme formando uma figura triangular (figura 1), razão pela qual o Brasil era considerado um país jovem. Na atualidade, essa figura modifica-se substancialmente com o incremento da região central da pirâmide populacional e uma percentagem consideravelmente maior da população mais idosa. Dessa forma, o país deixa de ser um país jovem para aproximar-se da distribuição etária que ocorre nos chamados países desenvolvidos. (IBGE, 2013). Provavelmente, para o ano 2025, haverá em nosso país cerca de 32 milhões de idosos. Este rápido crescimento da população vem exigindo respostas do Estado e da sociedade, como a implantação da Política Nacional do Idoso (Brasil, 1994; Brasil, 1996), que deve ser complementada por ações desenvolvidas pelos estados e municípios.

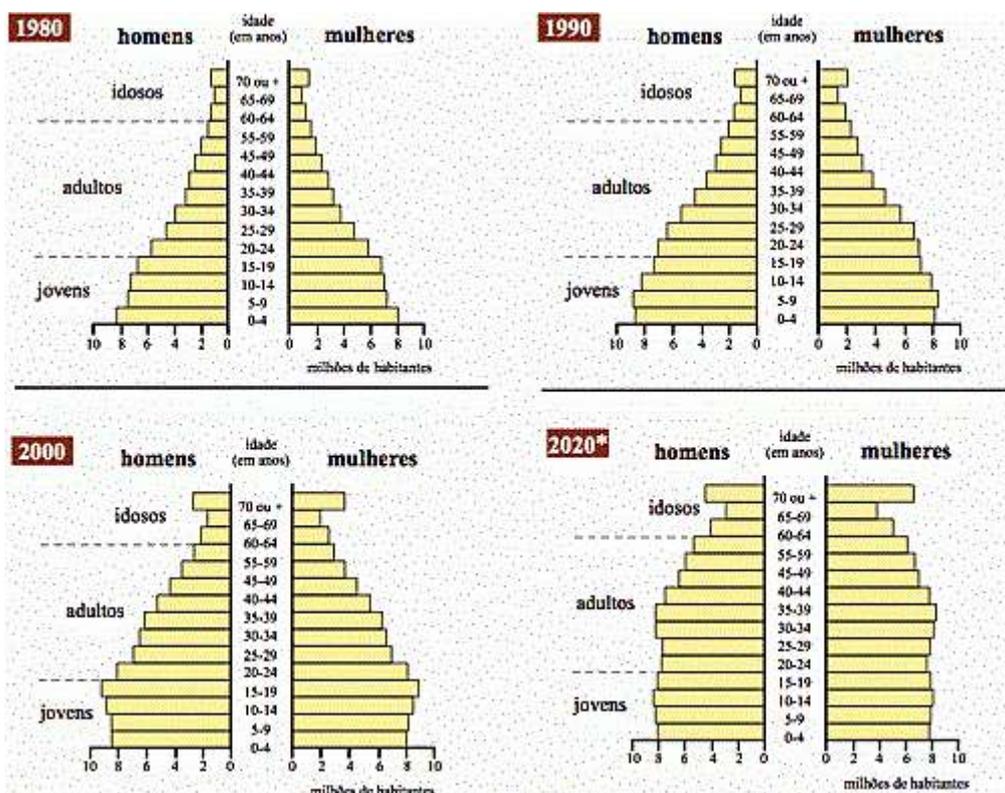


Figura 1. Mudança na pirâmide etária da população brasileira e projeção da pirâmide etária da população para o ano 2020 (Fonte: IBGE, 2013)

A mudança na composição etária brasileira, associada à persistência de algumas doenças infecciosas (novas ou negligenciadas), compõem um quadro desafiador no qual é preciso enfrentar o crescimento das doenças complexas, crônico-degenerativas, em geral caracterizadas por sua etiologia multifatorial. Na atualidade o processo de envelhecimento é observado como um fenômeno multifatorial natural, onde os fatores ambientais e genéticos são fundamentais para a ocorrência deste processo (WHO, 2015).

O aumento da população idosa traz consigo uma progressão nas doenças crônico-degenerativas, dentre as quais os processos demenciais fazem parte. Dentre as demências, a Doença de Alzheimer (DA) é uma das formas mais comuns constituindo cerca de 70% dos casos de demência aumentando significativamente os gastos relativos a saúde e vida dos pacientes e seus cuidadores. Realizar estudos que possam auxiliar no tratamento de pacientes com DA é de suma importância para a diminuição do impacto econômico da doença no Brasil (Wimo *et al.*, 2010).

A investigação simultânea de diferentes genótipos desfavoráveis, combinada com a análise de fatores ambientais de risco, é a abordagem mais apropriada para o estudo desses tipos de doenças multifatoriais, pois pode auxiliar na investigação dos principais parâmetros que estão contribuindo para o desenvolvimento ou modulação das mesmas (Sonnenschein *et al.*, 2012).

2 Revisão de literatura

2.1 A Doença de Alzheimer (DA)

O envelhecimento é um processo ativo que é acompanhado por um estresse oxidativo gerando uma diminuição na homeostase de proteínas e lipídeos, um aumento na glicação de proteínas e danos no DNA (Kenyon, 2010). Tais condições podem ser, em parte, a causa para o aumento de algumas doenças neurodegenerativas.

A DA é uma doença neurodegenerativa e é a forma mais comum de demência progressiva em idosos, cujo resultado final é a completa dependência e morte do paciente (Stern, 2012). A idade avançada e o histórico familiar da doença são os dois maiores fatores de risco da DA (Bettens *et al.*, 2010). Em geral, a DA tem início dos sintomas clínicos de modo precoce (antes dos 65 anos) e tardia (após os 65 anos). Apesar de esta última ser a mais frequente, a maior parte das pesquisas tem sido direcionada ao estudo da forma autossômica dominante rara, responsável pela forma precoce, que tem fornecido uma compreensão clara da natureza da patogênese da DA. A procura pela compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da DA tem incluído estudos de múltiplas disciplinas como a biologia celular, neurociências, genética molecular, bioquímica e biologia estrutural (Chouraki e Seshadri, 2014). Assim, mutações de penetrância completa (causais) em três genes são consideradas responsáveis pela DA de início precoce: o gene da proteína precursora amiloide (*APP*) e dois genes da presenilina (*PSEN1* e *PSEN2*). O recente progresso na elucidação da patogênese da DA tem-se centrado sobre o papel aparente de diversos resíduos da proteína β -amiloide como características patológicas comuns às formas geneticamente diversificadas desta doença complexa (Sá Cavalcanti e Engelhardt, 2012).

2.1.1 Características Clínicas da Doença de Alzheimer

As manifestações clínicas da DA são geralmente observadas após anos da instalação de processos neuropatológicos como a deposição extracelular da proteína β -amiloide e do acúmulo intracelular de emaranhados neurofibrilares da proteína TAU (Nobili *et al.*, 2017). Em consequência a esses acúmulos, ocorrem gradativamente lesões nos neurônios, perdas das sinapses, aumento da neuroinflamação e da neurotoxicidade, além da perda na plasticidade neural, levando à apoptose dessas células. Uma vez iniciado o processo de acúmulos dessas proteínas, o indivíduo começa a apresentar alguns sintomas (figura 2) que, por muitas vezes, inicialmente são ignorados pelos membros de suas famílias, impossibilitando assim um retardo mais significativo dos sintomas através de fármacos (Nobili *et al.*, 2017).

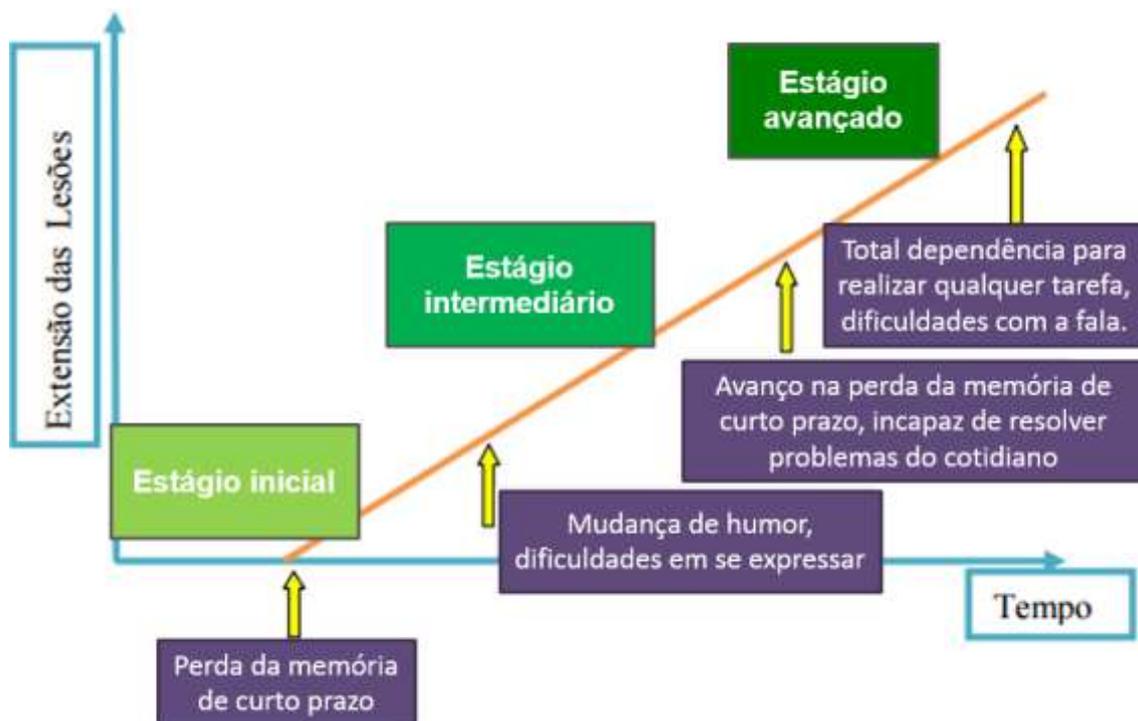


Figura 2. Representação dos estágios e de alguns sintomas clínicos dos indivíduos com Doença de Alzheimer. Adaptado de Cruz *et al.*, 2004

2.1.2 Características histológicas e fisiopatológicas da Doença de Alzheimer

Histopatologicamente, a DA é caracterizada pela atrofia cortical difusa e degeneração neuronal com apoptose comprometendo os sistemas de neurotransmissão, em especial nas regiões cerebrais encarregadas pelas funções cognitivas (figura 3) (Serrano-Pozo *et al.*, 2011).

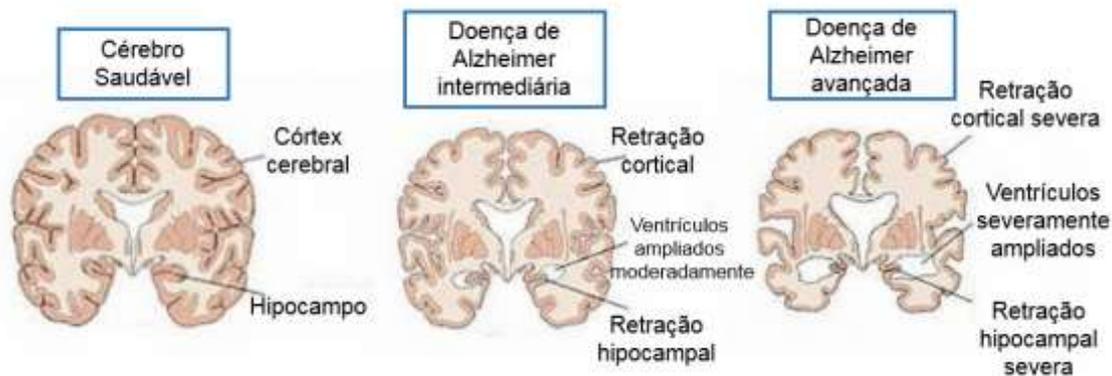


Figura 3. Representação do cérebro e das regiões que são mais afetadas pela Doença de Alzheimer. Adaptado de *sierram.web.unc.edu*.

As bases histológica e fisiopatológica da DA se fundamentam na depleção de inúmeros neurotransmissores, dentre eles a acetilcolina (ACh), pela redução da colina-acetiltransferase e dos receptores nicotínicos de ACh, a serotonina e a noradrenalina (Francis *et al.*, 1999; Thomsen *et al.*, 1991). Um outro neurotransmissor também envolvido, tanto na gênese quanto na apresentação clínica da doença, vem ganhando uma maior repercussão científica: a dopamina (Gibb *et al.*, 1989; Storga *et al.*, 1996; Rossato *et al.*, 2009; Broussard *et al.*, 2016).

As alterações do sistema dopaminérgico (DAérgico), frequentemente relatadas em pacientes com DA, são comumente relacionadas aos sintomas cognitivos e não cognitivos (Lammel *et al.*, 2008). A dopamina é um neurotransmissor importante para inúmeros mecanismos de comunicação neuronal (Moreno-Castilla *et al.*, 2016). Baseando-se nessa premissa, um estudo recentemente publicado, realizou uma análise morfológica mais aprofundada do cérebro capaz de correlacionar o déficit de produção dopaminérgico na área tegmental ventral (ATV) com o mau funcionamento do hipocampo (principal centro de modificações desencadeantes da DA) (Nobili *et al.*, 2017).

Até o presente momento, não se havia considerado que outras áreas do cérebro, além das já previamente citadas, pudessem estar envolvidas no aparecimento da condição do Alzheimer (Jürgensen *et al.*, 2011; Xiang *et al.*, 2016). No que tange a questão de análise da área tegmental ventral (foco da investigação apresentada pelo estudo de Nobili e colaboradores) ainda pouco se

sabia sobre sua relação, tendo em vista ser essa uma parte profunda do sistema nervoso central, particularmente difícil de ser investigada.

O estudo de Nobili e associados (2017) desencadeou uma discussão que relaciona a morte de células precursoras da dopamina e a redução do efeito desse neurotransmissor no hipocampo, resultando num aumento do risco de processos degenerativos, levando a uma perda progressiva da memória. Esse mesmo estudo ainda constatou que a ATV também libera dopamina no núcleo accumbens, área que controla distúrbios de recompensa e de humor (Russo e Nestler, 2013), garantindo o seu bom funcionamento. Por essa razão, os autores trazem à tona uma mudança no perfil de interpretação clínica da DA, demonstrando que as alterações de humor não são consequências do aparecimento do Alzheimer, como antes se pensava, mas sim uma espécie de sinal precoce do aparecimento dessa doença.

Esses estudos, portanto, abrem a discussão para novas abordagens terapêuticas capazes de evitar seletivamente a morte dos neurônios precursoras da dopamina, apesar disso ser eficaz apenas para pacientes em fases iniciais da doença, quando grande parte dos neurônios da ATV continua ativa.

Atualmente, o diagnóstico clínico da DA é realizado a partir da caracterização do declínio cognitivo do paciente, da apresentação clínica de síndrome demencial, após a exclusão de outros fatores etiológicos. Comumente, é realizada uma variedade de exames e testes neurocognitivos que irão fornecer dados clínicos que favorecerão para o quadro “provável” ou “possível” de DA. Contudo, o diagnóstico definitivo só pode ser realizado *post-mortem* através da realização do exame histológico do tecido cerebral, detectando-se a presença de placas senis, que são formadas pela deposição exacerbada de proteína β -amiloide, e de emaranhados neurofibrilares, que são causados pela hiperfosforilação da proteína TAU (McKhann *et al.*, 2011).

Os medicamentos utilizados para o tratamento da Doença de Alzheimer são geralmente agentes colinomiméticos com atuação direta nos receptores da acetilcolina (ACh) retardando a degradação desse importante neurotransmissor e proporcionando uma maior disponibilidade da ACh para ser utilizada na comunicação neuronal (Duthey, 2013). Com isso, os medicamentos empregados

possuem a função de reduzir a taxa do declínio cognitivo e funcional e, por conseguinte, o progresso da doença pode ser retardado. As drogas mais utilizadas, com essas características, são rivastigmina, donepezila e galantamina (Ali *et al.*, 2012; FDA, 2013). A memantina também é um fármaco muito utilizado, contudo é um agente antagonista dos receptores de NMDA (receptor ionotrópico ativado pelo ácido glutâmico) cuja função é a regular a atividade do glutamato, molécula liberada em grandes quantidades devido aos danos celulares e que permite o fluxo livre de cálcio para dentro das células, ocasionando a degradação das mesmas (Lane *et al.*, 2006; FDA, 2013).

2.1.3 Características moleculares da Doença de Alzheimer

A proteína precursora amiloide (APP), pode ser clivada erroneamente pela enzima BACE gerando fragmentos insolúveis de peptídeos β -amiloides (A β 42), sendo estes um dos vários peptídeos diferentes que podem acumular excessivamente nos espaços extracelulares de vários tecidos e produzir diferentes doenças humanas (chamadas amiloidoses) (Sennvik *et al.*, 2000). Esse acúmulo contribui para a insidiosa e progressiva perda da memória, perda cognitiva e alteração comportamental nas pessoas idosas, podendo este quadro ser associado com o desenvolvimento de inúmeras lesões intraneuronais (devido à formação dos emaranhados neurofibrilares decorrentes da hiperfosforilação da proteína TAU) e extracelulares (placas amiloides) no hipocampo, na amígdala, no córtex cerebral e em certas regiões do cérebro, servindo como base para um diagnóstico da DA, inclusive na sua forma pré-clínica, conforme *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA - 2011) (Sonnenschein *et al.*, 2012; Brucki e Schultz, 2011).

Nas últimas décadas, somente o alelo ϵ 4 do gene da Apolipoproteína E (APOE) tem sido irrefutavelmente reconhecido como fator de risco para a DA tardia (Coon *et al.*, 2007; Altmann *et al.*, 2014). Mas, certamente, alterações no APOE não são responsáveis por toda a variabilidade genética desta forma da doença (Slooter *et al.*, 1998; Daw *et al.*, 2000). A complexidade da forma tardia

provavelmente é causada pela interação de múltiplos fatores de suscetibilidade genético-ambientais.

Estudos de ligação de genes candidatos e estudos de associação do genoma (*GWAS - Genome-Wide Association*) promoveram a descoberta de variantes gênicas de suscetibilidade para DA, mas nenhuma outra variante de risco funcional foi concretamente identificada, além dos três genes causais (*APP*, *PSEN1* e *PSEN2*) e *APOE* (Bettens *et al.*, 2010; Cummings *et al.*, 2014). Entretanto, recentemente foram identificados outros três possíveis genes associados à DA tardia: *CLU*, *CR1* e *PICALM* (Harold *et al.*, 2009; Lambert, 2009).

Outro tipo de variação genética pouco representativa em estudos genéticos da DA, mas que ganhou atenção nos últimos anos, dada a sua contribuição para a diversidade fenotípica de doenças complexas, é a variação do número de cópias (CNVs) gênicas, cuja abordagem tem despertado o interesse por estudos nessa área. CNVs estão implicadas em várias doenças neurodegenerativas (Lee e Lupski, 2006; Yang *et al.*, 2007) incluindo a DA, no qual as duplicações de *APP* têm resultado em DA de início precoce e herdada como uma forma autossômica dominante (Rovelet-Lecrux *et al.*, 2006; Sleegers *et al.*, 2006; Kasuga *et al.*, 2009). No futuro, dados do genoma completo pela técnica de *microarray* podem contribuir de maneira substancial para a compreensão do papel das CNVs na complexidade da DA (Lee e Lupski, 2006).

2.2 Genes Candidatos

Haja vista que a prevalência dos casos de DA na forma autossômica dominante é mais rara, representando cerca de 10% (Van Cauwenberghe *et al.*, 2015) de todos os casos, pesquisas relacionadas com genes mais frequentemente alterados na DA tardia podem auxiliar um melhor esclarecimento a respeito do mecanismo genético que favorece o desenvolvimento da doença de Alzheimer. Por essa razão, listamos para o presente estudo alguns genes que são descritos na literatura como comumente alterados em indivíduos com a DA, sendo eles *CLU*, *CR1*, *PICALM* e *APOE*. A inclusão destes genes ocorreu devido

a sua relação com as suas funções biológicas (figura 4). O gene *CLU* além de estar envolvido na resposta neuroinflamatória também se encontra relacionado com o metabolismo e transporte de lipídeos. Já o gene *CR1* está envolvido no processo de endocitose, na resposta neuroinflamatória e no tráfego celular de proteínas, assim como o gene *PICALM* que se encontra envolvido no tráfego celular de proteínas realizando um papel de suma importância. Por fim, o gene *APOE* foi selecionado por se encontrar envolvido no transporte de lipídeos. Como consequência da alteração desses genes pode ocorrer o aumento do stress oxidativo, a promoção da hiperfosforilação da proteína TAU que resulta em acúmulo de emaranhados neurofibrilares, o favorecimento da formação de placas β -amiloide, ocasionando na apoptose neuronal (Bell *et al.*, 2007; Calero *et al.*, 2009; Sleegers *et al.*, 2010; Cummings *et al.*, 2016).

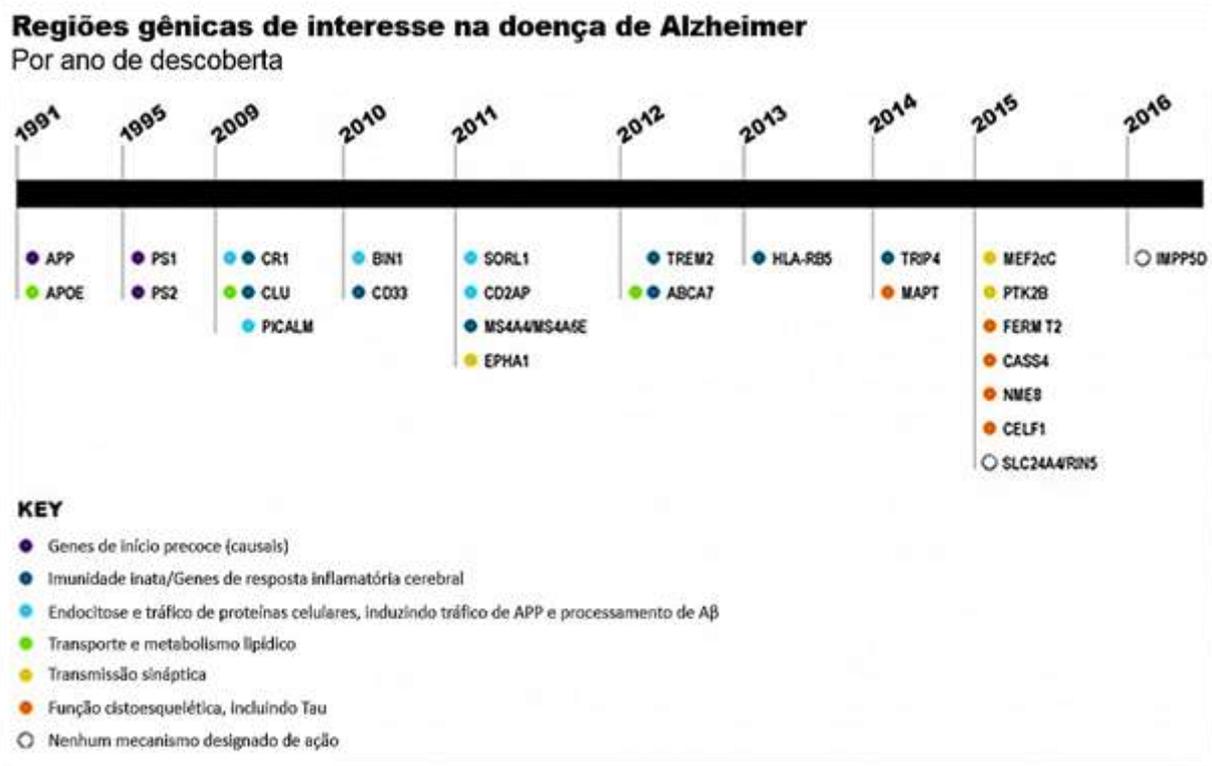


Figura 4. Principais regiões gênicas de interesse na Doença de Alzheimer de acordo com o ano de sua descoberta. A cor indica mecanismo de ação no corpo. A medida que a tecnologia foi avançando, novos genes foram identificados estando associados com a DA e, com isso, cada vez mais os pesquisadores estão conseguindo compreender os mecanismos de ação relativos a estes genes no organismo. Adaptado de National Institute of Aging (NIH, 2016).

2.2.1 Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs)

Os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) são variações gênicas comuns que há anos vem sendo descritas na literatura estando associados à várias doenças como o câncer, doença de Parkinson e doença de Alzheimer (Risch e Merikangas, 1996; Tosto e Reitz, 2013). Os SNPs podem ser definidos como um sítio localizado no DNA onde verifica-se a alteração de uma base, em indivíduos de uma mesma população, podendo ocorrer em 1 a cada 1.000 pares de base, sendo comuns no genoma humano (Risch e Merikangas, 1996; Yudofsky e Hales, 2011). Os SNPs correspondem à modificações genéticas presentes em mais de 1% da população, podendo se localizar em regiões promotora, codificadora e não codificadora. SNPs nas regiões promotora e codificadora são os que apresentam maior probabilidade de alterar o funcionamento do gene e, conseqüentemente, a proteína formada (Strachan e Read, 2012; Ruiz *et al.*, 2016).

A grande quantidade de SNPs no genoma humano há anos vem motivando a sua aplicação nas pesquisas básicas, obtendo sucesso, por exemplo, em estudos de construção de mapas genéticos, estudos de associação e predição genômica envolvidos no controle de doenças com características complexas, entre outros (Hyten *et al.*, 2010).

2.2.2 APOE

O gene *APOE* é composto por quatro éxons, distribuídos ao longo de 6.740 nucleotídeos e codifica a apolipoproteína E (figura 5), importante glicoproteína multifuncional relacionada com o metabolismo e redistribuição de lipoproteínas e colesterol (Raber, 2008). O *APOE*, localizado no cromossomo 19, é conhecido por submeter-se a um processo denominado splicing alternativo (recombinação gênica), onde, a partir deste processo, são formadas diferentes isoforma desta proteína (Love *et al.*, 2015). Três isoformas principais são codificadas por diferentes alelos do gene *APOE*: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$. Essas isoformas se diferem por cisteína e arginina nas posições 112 e 158 da proteína (Selkoe, 2001). A isoforma *APOE*- $\epsilon 3$ é a mais comum e contém cisteína e arginina, respectivamente, nas posições 112 e 158. Já a isoforma *APOE*- $\epsilon 2$ contém

cisteína e cisteína e, na isoforma APOE- ϵ 4 contém arginina e arginina nas duas posições (Zhang *et al.*, 2004).

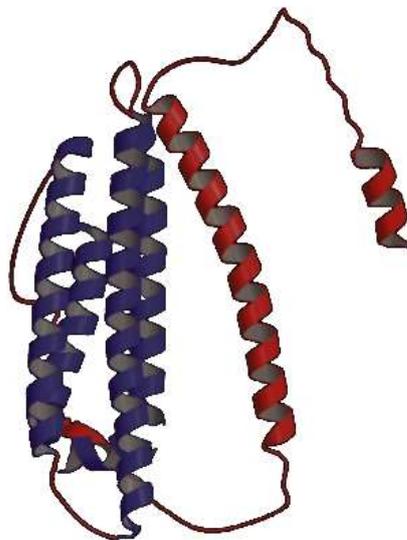


Figura 5. Representação da estrutura do APOE (Cedazo-Mínguez e Cowburn, 2001)

Ao longo dos anos, estudos realizados de forma independente (Cedazo e Cowburn, 2001) mostram que o alelo ϵ 4 da APOE aparece com frequência elevada nos indivíduos portadores de DA e, em 1993, Corder e colaboradores constataram que os indivíduos com genótipo ϵ 4/ ϵ 4 desenvolvem os sintomas mais precocemente e desenvolvem um quadro clínico mais grave. Uma das explicações para esse quadro seria que o alelo ϵ 4 facilitaria o aumento da deposição da proteína β -amiloide, formando assim placas senis, além de estar relacionado com a perda de plasticidade sináptica e também com a diminuição de fatores de crescimento e viabilidade neuronal (Clifford *et al.*, 2009). O alelo ϵ 3 codifica a forma ancestral da proteína, sendo TGC na posição 112 que codifica cisteína e CGC na posição 158 que codifica arginina. Esta isoforma proporciona o bom funcionamento da proteína, não sendo, portanto, relacionado como fator de risco e nem como fator de proteção (Clifford *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2003). Por outro lado, o alelo ϵ 2, apesar de ser o alelo mais raro entre os três alelos da APOE, parece exercer um efeito protetor contra o desenvolvimento da DA (Cedazo e Cowburn, 2001).

2.2.3 CLU

O gene *CLU*, que codifica a proteína clusterina ou apolipoproteína J, está localizado na posição p21-p12 do cromossomo 8 e está envolvida com diversas funções no organismo, como a solubilização e transporte de lipídeos, juntamente com o gene *APOE*, embora através de estímulos diferentes (Bell *et al.*, 2007). A proteína clusterina se encontra associada com lipoproteínas de alta densidade (HDL) presentes no plasma humano podendo ser encontrada em maiores concentrações no cérebro (Schrijvers *et al.*, 2011).

Segundo Jones e Jomary (2002), a clusterina é uma proteína que se apresenta nas formas nuclear, citoplasmática e secretada, porém a forma mais conhecida é a secretada, que possui propriedades de chaperona. As chaperonas são proteínas auxiliares que ajudam proteínas a assumirem sua conformação correta e, quando isso não é possível, as chaperonas encaminham essas proteínas à destruição (Wilson, 2008).

Além disso, essa proteína inibe a oligomerização de peptídeos β -amiloide em condições normais, no entanto, na presença de excesso de peptídeos β -amiloide, a CLU exerce efeito contrário, aumentando assim a deposição de β -amiloide. A CLU é uma proteína multifuncional que apresenta funções de neuroproteção e também anti-inflamatória. No entanto, com excesso de β -amiloide, a CLU não parece ser capaz de evitar alterações neuropatológicas progressivas geralmente encontradas na DA.

2.2.4 CR1

O gene *Complement Receptor 1 (CR1)*, localizado no cromossomo 1, codifica o receptor do complemento 1 e está envolvido predominantemente na imunidade adaptativa sendo um receptor de membrana capaz de mediar a ligação da célula a partículas e imuno-complexos que podem ativar o sistema complemento (Hollingworth *et al.*, 2011). A proteína CR1 pode ser expressa em alta quantidade nos eritrócitos, contudo também é encontrada nos neurônios e células da glia, como astrócitos, microglia e oligodendrócitos (Crehan *et al.*, 2012). O sistema complemento é composto por cerca de 30 proteínas que estão relacionadas com a defesa do organismo e com a regulação do processo

inflamatório, podendo favorecer a depuração da beta-amiloide e de células apoptóticas, como podemos observar na figura 6 (Morgan e Gasque, 1996; Hollingworth *et al.*, 2011).

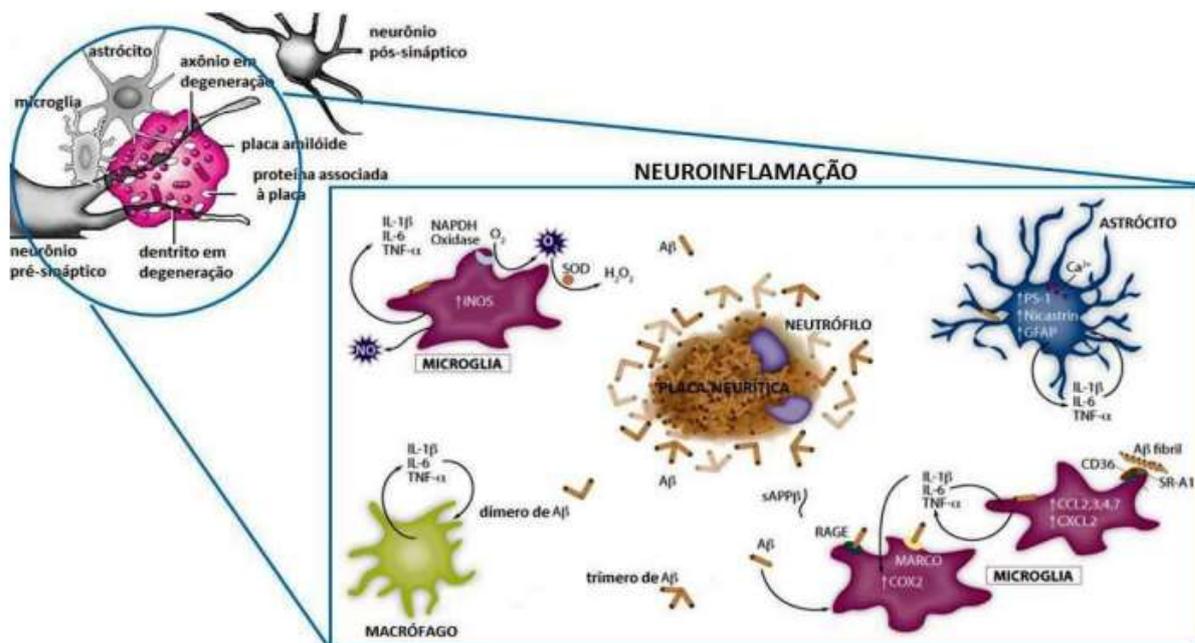


Figura 6. Sinalização do processo inflamatório neuronal por ativação das células microgliais e astrócitos decorrente do depósito de placa β -amiloide (adaptado de Viegas *et al.*, 2011)

Atualmente sabemos que os eritrócitos são capazes de sequestrar a $A\beta_{42}$ e favorecer a sua depuração através da via do *CR1*, mecanismo que se encontra prejudicado (Rogers *et al.*, 2006) em pacientes com DA. Segundo Rogers e colaboradores (2006), a expressão aumentada dos fatores da via clássica do sistema complemento foi observada em cérebros de indivíduos com DA, uma vez que a presença de placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares foram capazes de ativar o sistema complemento. De acordo com os estudos de Pekny e colaboradores (2007) se tem conhecimento que alguns componentes da cascata do sistema complemento selecionam sinapses indesejáveis para eliminação durante o desenvolvimento neuronal, podendo então ativar de forma inadequada o sistema do complemento, acelerando a perda sináptica.

Sabe-se que os polimorfismos *rs6656401* e *rs3818361* do *CR1* são considerados de risco para DA, entretanto o *rs6656401* está mais associado com o aumento de risco para a DA de início tardio (Lambert *et al.*, 2009). Todavia, a funcionalidade dos referidos SNPs desse gene é pouco conhecida, logo são necessários mais estudos para investigar seu papel na DA.

2.2.5 *PICALM*

Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein ou *PICALM* é um gene localizado na posição q14 do cromossomo 11 e codifica a proteína de montagem da clatrina, que pode ser encontrada em diversos tecidos e células de várias espécies de vertebrados (Ford *et al.*, 2001). No sistema nervoso central, sua presença é observada nos neurônios e células da glia (Bushlin *et al.*, 2008).

Além do gene *PICALM* estar relacionado com o crescimento celular, processo hematopoiético e metabolismo férrico, desempenha papel fundamental no processo de endocitose mediado por clatrina (CME) (Ford *et al.*, 2001), mecanismo que está associado com a distribuição de receptores, modulação do componente de proteínas transmembrana, com a promoção da neurotransmissão e também com o metabolismo de APP (Kyriazis *et al.*, 2008; Cirrito *et al.*, 2008).

As vias metabólicas do *PICALM* podem ser classificadas, de forma simples, em β -amiloide dependente e β -amiloide independente. Da primeira forma (figura 7), este gene pode facilitar tanto a produção de A β , pelo processo CME, quanto sua depuração, através do processo de autofagia, favorecendo assim o percurso de A β através das células endoteliais vasculares da barreira hematoencefálica (BHE) (Ando *et al.*, 2013; Schjeide *et al.*, 2011).

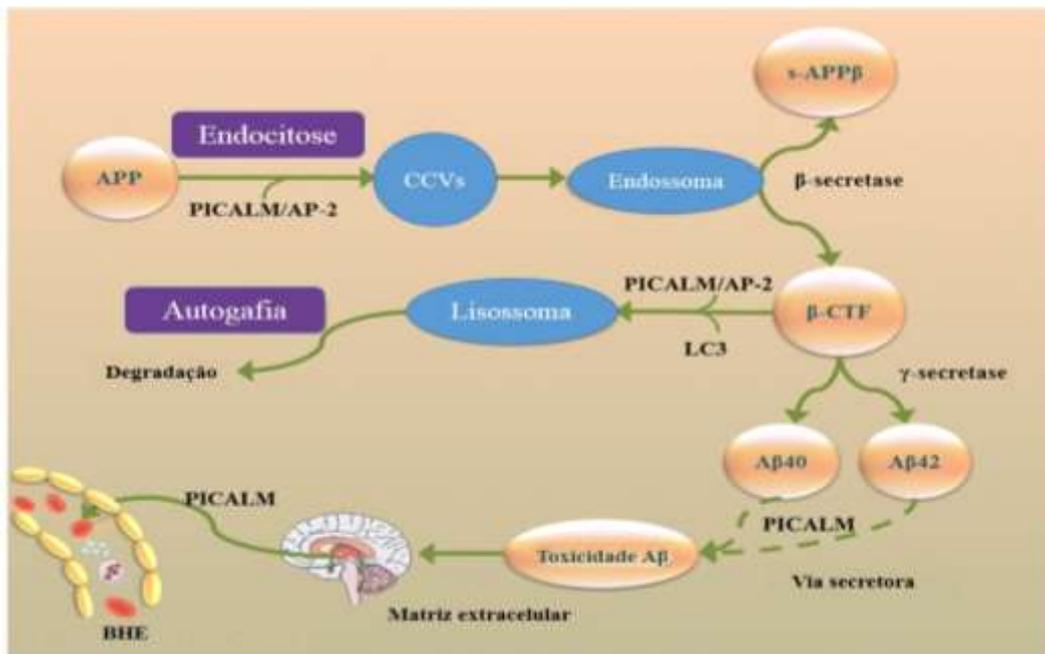


Figura 7. Via metabólica do gene *PICALM* β -amiloide dependente. Alterações no gene *PICALM* não apenas pode favorecer a produção do peptídeo A β -42 via mecanismo de endocitose, como também a sua depuração através da promoção do processo autofágico de APP-CTF (Fragmentos C-Terminal) e facilitar sua passagem através das células endoteliais vasculares da barreira hematoencefálica (BBB) (adaptado de Wei Xu *et al.*, 2015).

Da segunda forma (figura 8), este gene influencia negativamente no metabolismo dos lipídeos, nas funções sinápticas, favorece um distúrbio imunológico e interfere na homeostase do ferro, contribuindo assim com o desenvolvimento da DA (Ando *et al.*, 2013).



Figura 8. Via metabólica do gene *PICALM* β -amiloide independente. O gene *PICALM* pode contribuir para o aumento do risco de desenvolvimento da DA, influenciando o metabolismo lipídico, a função sináptica, os distúrbios imunológicos e a homeostase férrica (adaptado de Wei Xu *et al.*, 2015).

Apesar de não se ter conhecimento do mecanismo completo do gene *PICALM* na DA, a sua identificação e associação por meio das vias moleculares pode vir a contribuir para um maior conhecimento da etiologia da DA bem como proporcionar novos alvos de investigação e de abordagens terapêuticas.

Tendo em vista que o conhecimento sobre a interação entre os genes *APOE*, *CLU*, *CR1* e *PICALM* e suas funções é parcial (figura 9), se faz necessário a realização de estudos para abordar os vários aspectos genéticos que resultam no desenvolvimento da Doença de Alzheimer.



Figura 9: Uma visão geral de como os genes *APOE*, *CLU*, *PICALM* e *CR1* estão implicados na susceptibilidade à DA. Na figura se encontram ilustrados os genes e suas interações. O gene *APOE* está envolvido com o transporte de lipídeos e quando essa via se encontra alterada pode levar a um quadro de aterosclerose. O gene *CLU*, além de estar envolvido com o metabolismo e transporte de lipídeos, interagindo assim com o *APOE*, se encontra envolvido na resposta neuroinflamatória, uma vez que participa do processo de inibição do sistema complemento. O gene *CR1* possui sua função relacionada com o *CLU*, uma vez que faz parte do sistema complemento, além de estar envolvido no processo de tráfego celular de proteínas e também no processo de endocitose, interagindo também com o gene *PICALM* que também participa do processo de endocitose. Todas as funções alteradas desses genes anteriormente citados podem levar direta ou indiretamente a formação do complexo e acúmulo Aβ e dos emaranhados neurofibrilares que contribuem para o desenvolvimento da Doença de Alzheimer. Adaptado de Slegers, 2010.

No presente projeto foram analisados os polimorfismos dos genes candidatos ou moduladores (*APOE*, *CLU*, *CR1* e *PICALM*) de uma das principais doenças neurodegenerativas que afetam os idosos, a Doença de Alzheimer (DA), numa população residente do Rio de Janeiro e da cidade de Duque de Caxias, localizada na baixada fluminense, e que é caracterizada por sua complexa heterogeneidade e intensa miscigenação étnica. Vale ressaltar que o presente estudo contribui não só para o conhecimento mais esclarecido do aspecto genético da população investigada, mas também para o desenvolvimento da pesquisa tecnológica, incluindo assim o aumento na qualidade de formação dos indivíduos tanto de Duque de Caxias como também de toda a baixada fluminense. Este projeto faz parte de um conjunto maior de estudos a serem desenvolvidos no formato de Redes em parceria com o Instituto de Psiquiatria da Universidade Federal do Rio de Janeiro e com a FIOCRUZ/RJ.

3 JUSTIFICATIVA

O decréscimo das taxas de mortalidade devido à diminuição de doenças infecto-parasitárias e o incremento da expectativa de vida da população são alguns fatores extremamente relevantes observados nos últimos anos no Brasil. Como consequência disso, verifica-se uma profunda transformação na estrutura etária da população. Dados do primeiro balanço do censo 2010 realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística mostram que a faixa de idosos (indivíduos acima dos 60 anos) é o segmento da população que mais cresce (IBGE, 2011). Estima-se que 11,3% da população (ao redor de 19 milhões) sejam de idosos. Se em 1980 a razão de idosos por crianças era de 16/100 e em 2008 essa razão era de 24,7/100, espera-se que em 2050 o número de idosos supere o número de crianças.

Atualmente, o conhecimento em relação à interação dos genes escolhidos (*APOE*, *CLU*, *CR1* e *PICALM*) e suas funções é limitada e estudos que abordam os vários aspectos genéticos que resultam no desenvolvimento da DA, bem como em outras doenças crônico-degenerativas, contribuem para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes, além de sua fisiopatologia, podendo suscitar novos alvos terapêuticos e estratégias de tratamento para esta importante e prevalente doença neurodegenerativa que acomete a população idosa.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Análise molecular de polimorfismos dos genes candidatos ou moduladores de uma das principais doenças que acometem os idosos numa população caracterizada por sua complexa heterogeneidade e intensa miscigenação étnica.

4.2 Objetivos Específicos

- ✓ Realizar a análise descritiva de uma amostra da população de indivíduos, acima de 55 anos, residentes do município de Duque de Caxias e do município do Rio de Janeiro.
- ✓ Genotipar as variantes polimórficas nos genes *APOE*, *CLU*, *CR1* e *PICALM* dos grupos de controle e paciente.
- ✓ Estimar os efeitos/riscos relativos desses polimorfismos sobre a DA.
- ✓ Realizar análise haplotípica dos polimorfismos do gene *APOE*.

5 Material e Métodos

5.1 Amostras

Foram selecionados 268 indivíduos acima de 55 anos, do Programa de Atenção Integrada da Saúde do Idoso do Município de Duque de Caxias e do Instituto de Psiquiatria da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Esses indivíduos foram alocados em 2 diferentes grupos: Grupo Controle, contendo 199 indivíduos e Grupo Paciente, contendo 69 indivíduos. Os indivíduos que não apresentaram a Doença de Alzheimer fazem parte do grupo controle. Os critérios de inclusão selecionados para a formação do grupo Paciente foram: idade (a partir de 55 anos) e Doença de Alzheimer. O critério de exclusão selecionado tanto para o grupo controle quanto para o grupo paciente foi a evidência de Doenças Cerebrovasculares.

5.2 Avaliação Clínica

O diagnóstico clínico da doença estudada no presente trabalho foi realizado pelos nossos colaboradores: as equipes de Geriatria e Gerontologia do Programa de Atenção Integrada da Saúde do Idoso do Município de Duque de Caxias e do Instituto de Psiquiatria da Universidade Federal do Rio de Janeiro, seguindo os critérios do *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) (Mckhann *et al.*, 1984; Mckhann *et al.*, 2011). A avaliação clínica foi realizada por médicos qualificados através da análise do Clinical Dementia Rating (CDR) (Maia *et al.*, 2006) (anexo B) e da tomografia computadorizada (TC) do crânio.

O CDR é uma avaliação que possui uma escala (0-3) com a qual é possível avaliar o desempenho cognitivo e funcional do indivíduo. As informações necessárias para a realização do CDR foram obtidas através de perguntas direcionadas tanto ao paciente quanto a um informante que acompanha este indivíduo diariamente. Deste modo, avaliam-se seis domínios cognitivos e ao final se obtém uma classificação do nível de demência do paciente, do

cognitivamente questionável até demência severa (quadro 1) (Montaño e Ramos, 2005).

Quadro 1. Classificação do CDR e os impactos funcionais que cada fase da doença deve apresentar. Adaptado de Montaño e Ramos, 2005.

Dano	Nenhum (0)	Questionável (0,5)	Leve (1)	Moderado (2)	Grave (3)
Memória	Sem perda de memória ou perda leve e inconstante.	Esquecimento constante, recordação parcial de eventos.	Perda de memória moderada, mais para eventos recentes, atrapalha as atividades de vida diária	Perda grave de memória, apenas assunto altamente aprendido é recordado.	Perda de memória grave. Apenas fragmentos são recordados.
Orientação	Completa Orientação	Completamente orientado com dificuldade leve em relação ao tempo.	Dificuldade moderada com relação ao tempo, orientado em áreas familiares.	Dificuldade grave com relação ao tempo, desorientado quase sempre no espaço.	Apenas orientado em relação a pessoas.
Julgamento e solução de problemas	Resolve problemas diários, como problemas financeiros; julgamento preservado.	Dificuldade leve para solucionar problemas, similaridades e diferenças.	Dificuldade moderada em lidar com problemas, similaridades e diferenças, julgamento social mantido.	Dificuldade séria em lidar com problemas, similaridades e diferenças, julgamento social danificado.	Incapaz de fazer julgamento ou resolver problemas.
Relações Comunitárias	Função independente no trabalho, compras, grupos sociais.	Leve dificuldade nestas tarefas.	Não é independente nestas atividades, parece normal em uma inspeção casual.	Não há independência fora de casa, parece bem o bastante para ser levado fora de casa.	Não há independência fora de casa, parece doente o bastante para ser levado fora de casa.
Lar e Passatempos	Vida em casa, passatempos e interesses intelectuais mantidos.	Vida em casa, passatempos, interesses intelectuais levemente prejudicados.	Prejuízo suave em tarefas em casa, tarefas mais difíceis, passatempo e interesses abandonados.	Apenas tarefas simples são preservadas, interesses muito restritos e pouco mantidos.	Sem função significativa em casa.
Cuidados Pessoais	Completamente capaz de cuidar-se	Completamente capaz de cuidar-se.	Necessita de ajuda.	Requer assistência ao vestir-se, para higiene.	Muita ajuda para cuidados pessoais, incontinências frequentes.

O projeto foi enviado e aprovado pelo Comitê de Ética da UNIGRANRIO (nº: 43112214.0.0000.5283) (anexo A). Todos os indivíduos que concordaram participar do estudo (ou seu representante legal) assinaram o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE), conforme anexos A e B e todo e qualquer procedimento somente foi iniciado após este consentimento expresso.

5.3 Coleta de sangue periférico

Para a realização das análises genéticas, uma coleta de 5 ml de sangue foi realizada em data previamente agendada por um profissional devidamente qualificado para esta atividade. A amostra foi encaminhada ao Laboratório de Genética da UNIGRANRIO (Labgen), onde foi processada, armazenada e analisada.

5.4 Extração do DNA Genômico

A extração e purificação do DNA genômico a partir de sangue compreendem várias etapas que incluem a lise das células, extração de proteínas e do RNA e precipitação do DNA. A extração foi realizada a partir da camada de leucócitos de uma alíquota de sangue periférico, utilizando kit de extração “*FlexiGene DNA Kit*” (Qiagen®).

A partir de 100 µL de sangue foram adicionados 250µL do tampão FG1 em um microtubo e foi invertido 5 vezes. Após esse procedimento o microtubo foi levado para a centrífuga durante 1 minuto a 10.000 RPM. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o microtubo foi invertido até que o *pellet* estivesse totalmente seco. Foi misturado ao tampão FG2 e a protease em um microtubo separado. Então foi adicionado 50 µL do tampão FG2/protease e foi homogeneizado no misturador do tipo *vortex* até que o *pellet* fosse dissolvido completamente. O microtubo foi invertido algumas vezes e incubado a 65°C por 5 minutos. Então, adicionou-se 50 µL de isopropanol absoluto até que a precipitação do DNA se tornou visível. Novamente a amostra retornou para a centrifuga por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente foi adicionado 50 µL de etanol 70%, vortexado e novamente centrifugado. Após esse procedimento, o sobrenadante foi descartado e finalmente foi adicionado

50 µL do tampão FG3, vortexando e o incubando a 65°C por 10 minutos, finalizando o processo de extração.

O DNA extraído foi quantificado a partir do equipamento *Denovix* e, após, armazenado em freezer -16°C no Labgen.

5.5 Análise dos Polimorfismos Genéticos

Os genes selecionados para o desenvolvimento desse projeto foram analisados através de técnicas de Biologia Molecular, baseadas em PCR.

Os polimorfismos dos genes *APOE* (*rs429358* e *rs7412*), *CLU* (*rs1136000*), *CR1* (*rs6656401*) e *PICALM* (*rs3851179*) foram genotipados por discriminação alélica através da técnica de PCR em Tempo Real utilizando sondas *TaqMan*[®]. Para análise de todos os polimorfismos, foram realizadas reações utilizando *TaqMan Genotyping Master Mix*[®] (2x), sonda *TaqMan*[®] (40x) específica para cada variante estudada (quadro 2), 10-30ng de DNA genômico e água estéril, conforme o protocolo estabelecido pelo fabricante. Para toda reação foi incluído um controle negativo realizado em duplicata, para garantir que não ocorreu nenhuma contaminação. Todas as análises foram realizadas com o equipamento *QuantStudio™ Real-Time PCR* (*Thermo Fisher Scientific*, EUA).

Quadro 2. Sequência das sondas utilizadas para a realização da técnica de PCR em tempo real

Gene	SNP	Sonda
<i>APOE</i>	<i>rs429358</i>	GCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTG[C/T]GCGGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGG
	<i>rs7412</i>	CCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAG[C/T]GCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGC
<i>CLU</i>	<i>rs11136000</i>	ACCAAAGCCACACCAGCTATCAAAA[C/T]TCTCTAACGGGCCCTTGCCACTTGA
<i>CR1</i>	<i>rs6656401</i>	TTTCCTTCTCTGTCTCCATCTTCTC[A/G]TCGCCTTCTCCTCTGTGTGTGTCTCT
<i>PICALM</i>	<i>rs3851179</i>	ACCATATAATAGTTGTGATAGATAA[C/T]ATTTACTGAAGTGTGTATTGTTTGC

A reação em cadeia de polimerase (PCR), foi desenvolvida em 1980 revolucionando diversas áreas da ciência. A técnica é empregada para obtenção de produtos da amplificação de determinada região da molécula de DNA (figura 10), onde essa molécula servirá de molde para produzir milhares de cópias da molécula inicial (Alberts *et al.*, 2009).

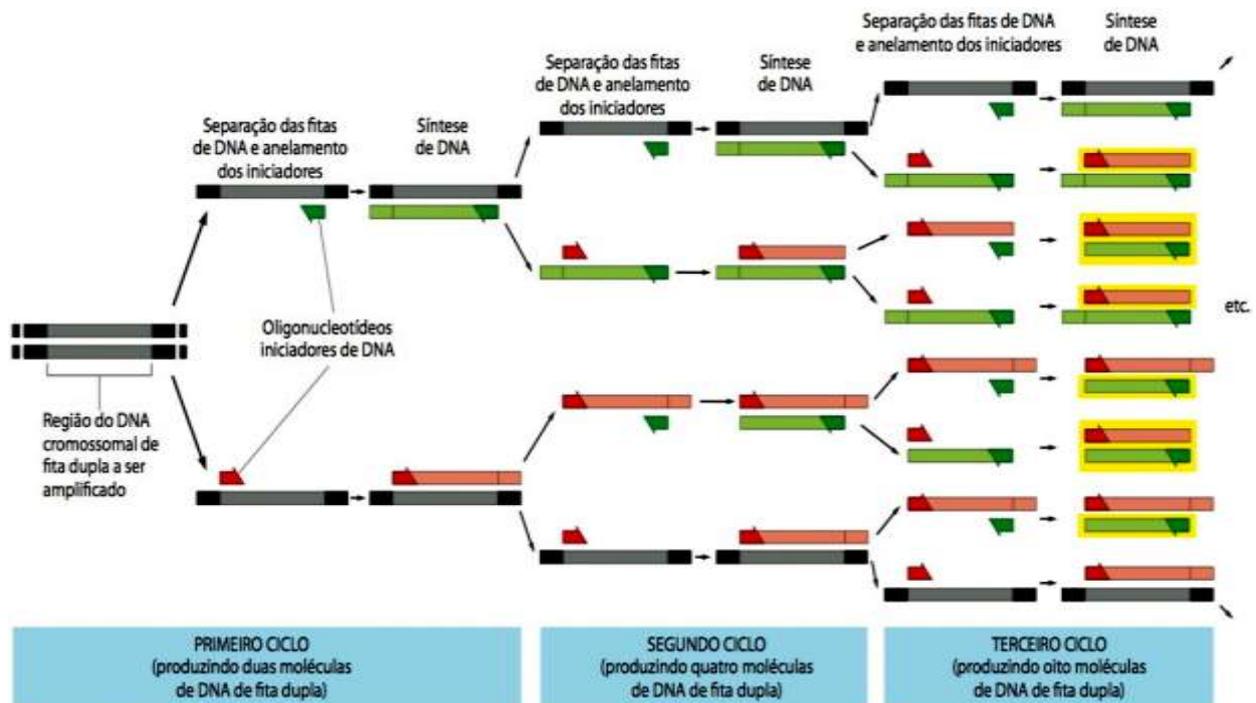


Figura 10. Técnica da Reação em Cadeia de Polimerase – PCR. (adaptado de Alberts *et al.*, 2009).

A reação de PCR envolve, geralmente, três fases: desnaturação, pareamento e extensão, sendo cada fase repetida vezes. A primeira etapa corresponde a desnaturação, onde o DNA, contendo a sequência a ser amplificada, é desnaturado através da elevação de temperatura (92-96°C), abrindo a dupla fita do DNA tornando-o então uma fita simples. A segunda etapa, geralmente ocorre a uma temperatura de 60-65°C, corresponde ao pareamento, onde um par de primers se dispõem nas fitas de DNA separadas. Os primers então se ligam a sequência de DNA complementar, indicando assim os pontos inicial e final da nova cópia de DNA que será sintetizada na próxima fase. A terceira etapa, que ocorre geralmente a uma temperatura de 72-76°C, é caracterizada pela ação da enzima DNA-polimerase que reconhece os sítios onde os primers se recombinaram na fita DNA na etapa anterior, ligando-se a eles. A DNA-polimerase adiciona bases complementares formando então fitas de DNA duplicadas. Ao final da técnica de PCR são obtidas milhares de cópias da sequência molde de DNA (Pimentel *et al.*, 2013).

No que se refere a técnica de PCR em tempo real, o mecanismo de detecção e quantificação é realizado através de fluorescência, o que maximiza o tempo de obtenção dos resultados, além de diminuir os riscos de contaminação das amostras manipuladas, uma vez que não é necessário verificar o resultado em gel utilizando a técnica de eletroforese. No decorrer do processo de amplificação, a enzima DNA-polimerase cliva as sondas que contém os fluoróforos VIC e FAM que se encontram ligados às fitas de DNA. A medida que essas moléculas são liberadas, emitem uma fluorescência (figura 11) que é capturada por um detector e é repassada ao software em forma de gráfico (*TaqMan[®] SNP Genotyping Assays Protocol, Thermo Fisher Scientific*).

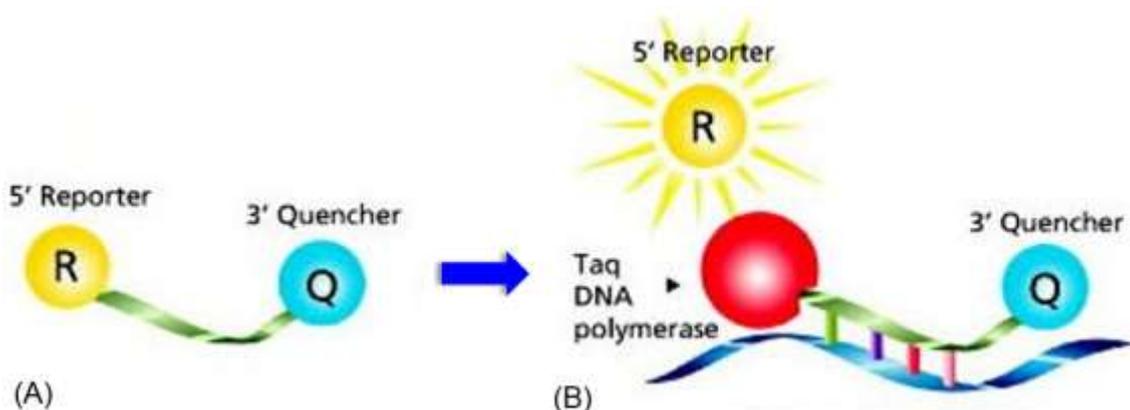
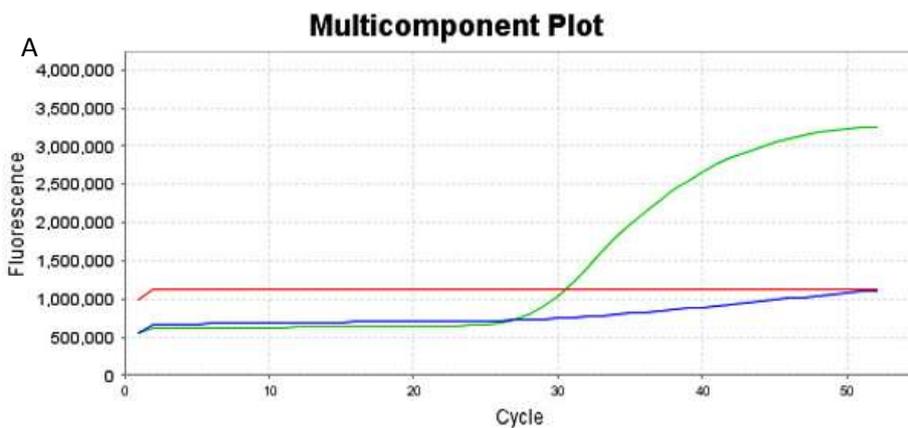


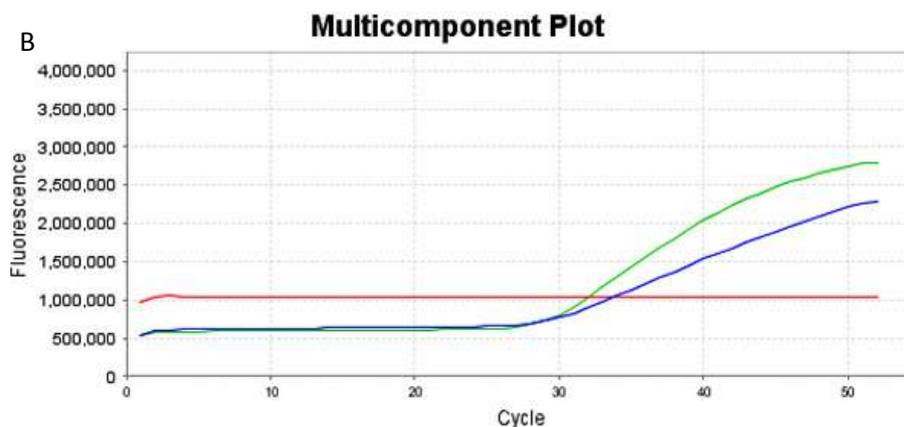
Figura 11. Representação esquemática do processo de emissão de fluorescência na técnica de PCR em tempo real pelo sistema TaqMan. (A) A molécula R (*reporter*) que está na posição 5' é capaz de emitir fluorescência, em comprimento de onda específico, enquanto que a molécula Q (*Quencher*), presente na extremidade 3', absorve a fluorescência emitida pelo R. Uma vez que essas moléculas se encontram associadas o sistema óptico do equipamento não é capaz de detectar a fluorescência da reação. (B) A medida que a DNA-polimerase se acopla a fita, a sonda sofrerá hidrólise, separando o *repórter* do *quencher* e, como consequência, ocorrerá a emissão de luz pelo *reporter*. Essa fluorescência será então capturada pelo software do equipamento. (Adaptado de: sigmaaldrich.com)

5.6 Curvas de Padronização

Cinco sondas *TaqMan[®]* para PCR em tempo real foram adquiridas. Para os genes *CLU* (*rs1136000*), *CR1* (*rs6656401*), *PICALM* (*rs3851179*) e *APOE* (*rs429358* e *rs7412*) foram realizadas as padronizações e as curvas são demonstradas, respectivamente, a seguir.



Homozigoto



Heterozigoto

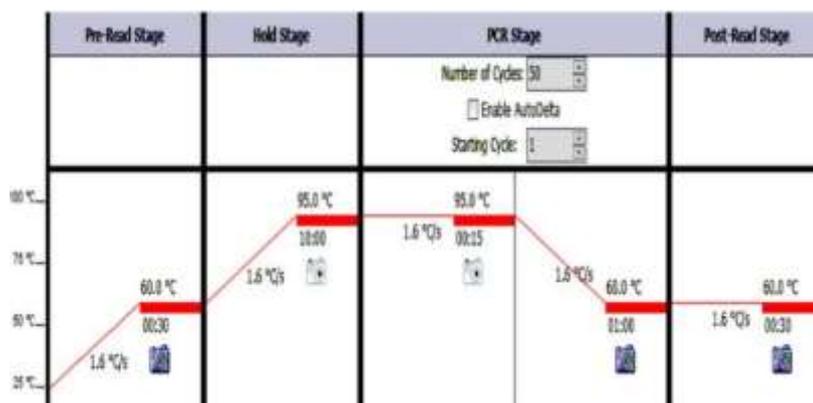


Figura 12. Gráficos multicomponentes do gene *CLU* (*rs1136000*) e o ciclo utilizado para amplificação. O eixo y indica a fluorescência do fluoróforo e o eixo x o número de ciclos. A curva verde indica a fluorescência do VIC e o azul é a fluorescência do FAM. O gráfico A representa um homozigoto selvagem e o B um heterozigoto.

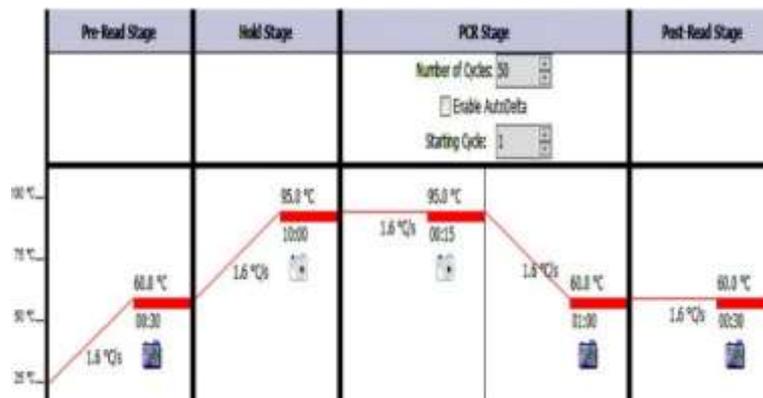
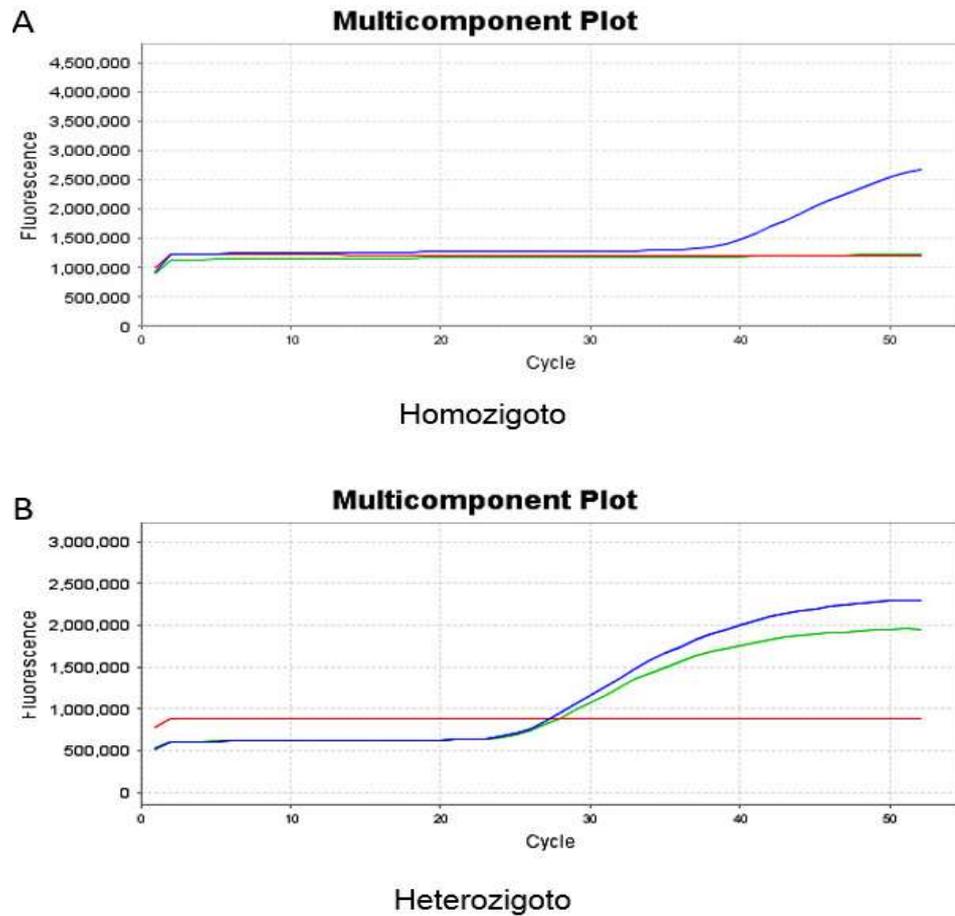


Figura 13. Gráficos multicomponentes do gene *CR1* (*rs6656401*) e o ciclo utilizado para amplificação. O eixo y indica a fluorescência do fluoróforo e o eixo x o número de ciclos. A curva verde indica a fluorescência do VIC e o azul é a fluorescência do FAM. O gráfico A representa um homozigoto selvagem e o B um heterozigoto.

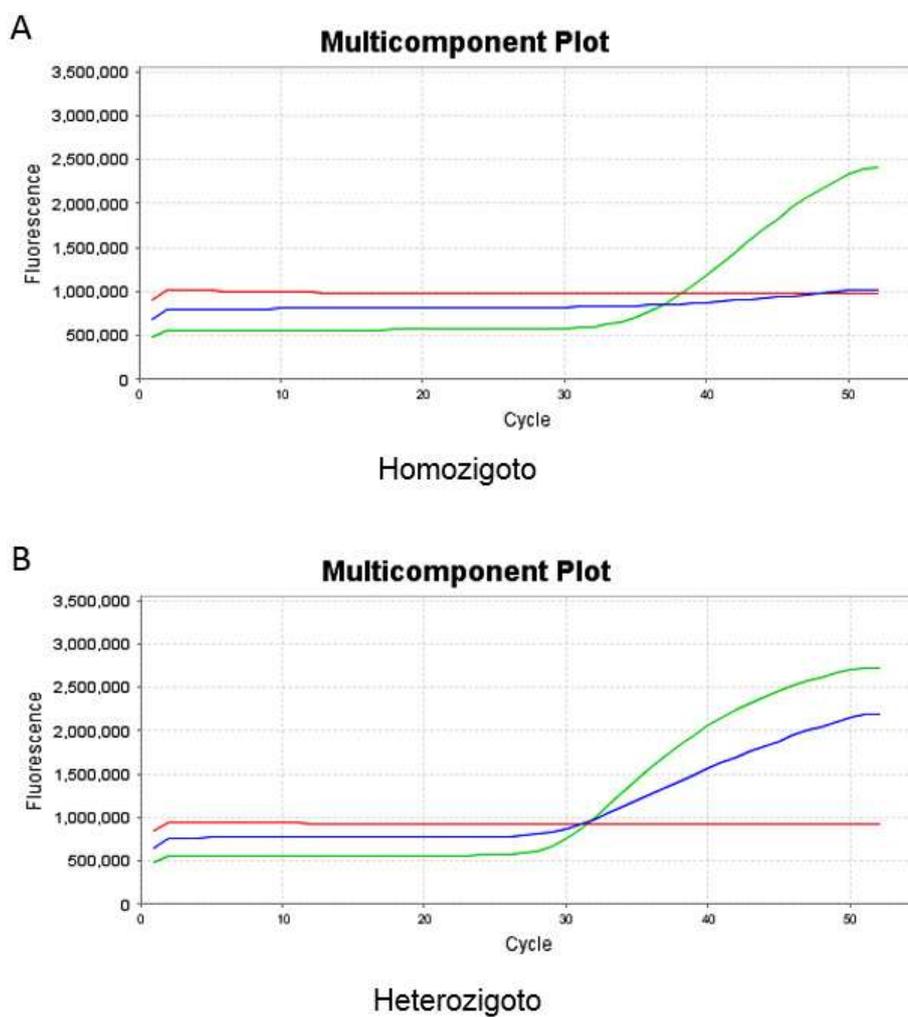


Figura 14. Gráficos multicomponentes do gene *PICALM* (*rs3851179*) e o ciclo utilizado para amplificação. O eixo y indica a fluorescência do fluoróforo e o eixo x o número de ciclos. A curva verde indica a fluorescência do VIC e o azul é a fluorescência do FAM. O gráfico A representa um homozigoto selvagem e o B um heterozigoto.

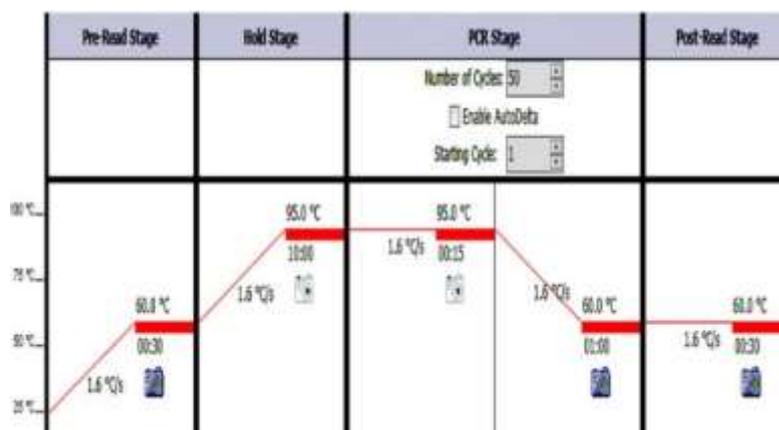
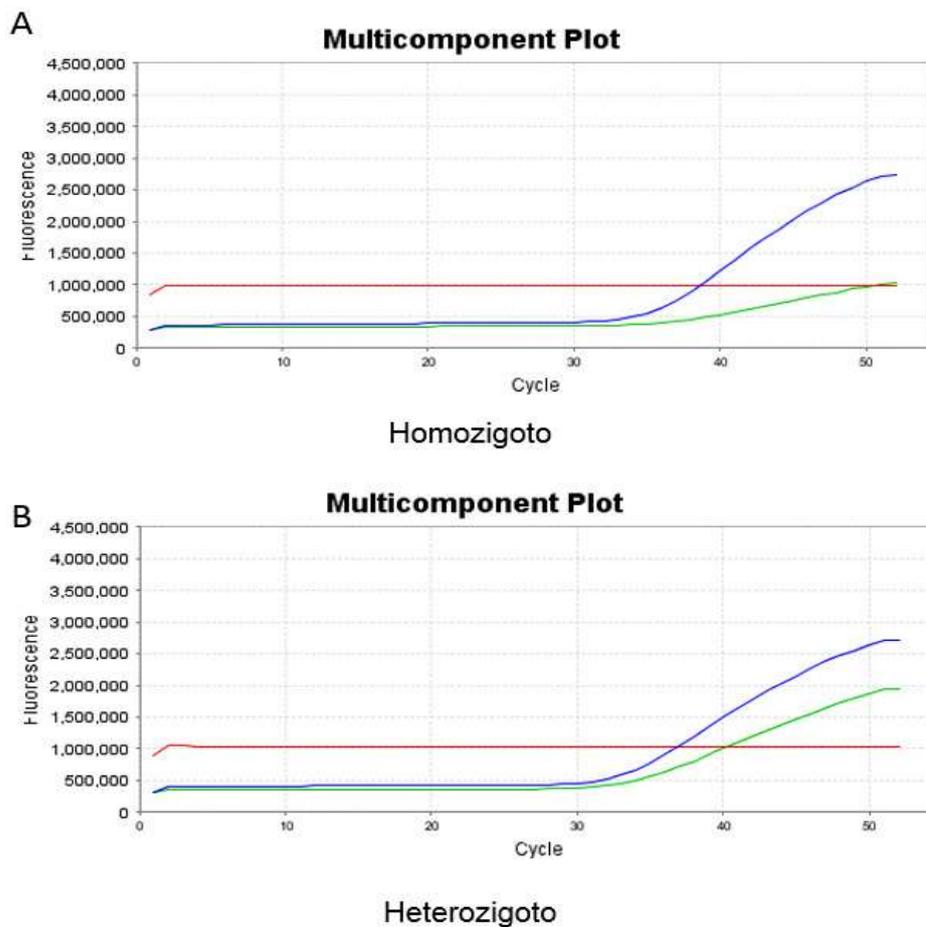
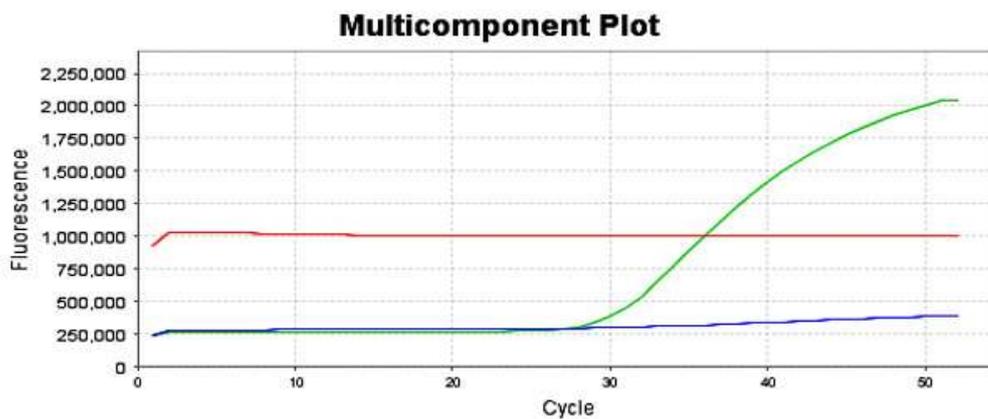


Figura 15. Gráficos multicomponentes do gene *APOE* (*rs429358*) e o ciclo utilizado para amplificação. O eixo y indica a fluorescência do fluoróforo e o eixo x o número de ciclos. A curva verde indica a fluorescência do VIC e o azul é a fluorescência do FAM. O gráfico A representa um homozigoto selvagem e o B um heterozigoto.

A



B

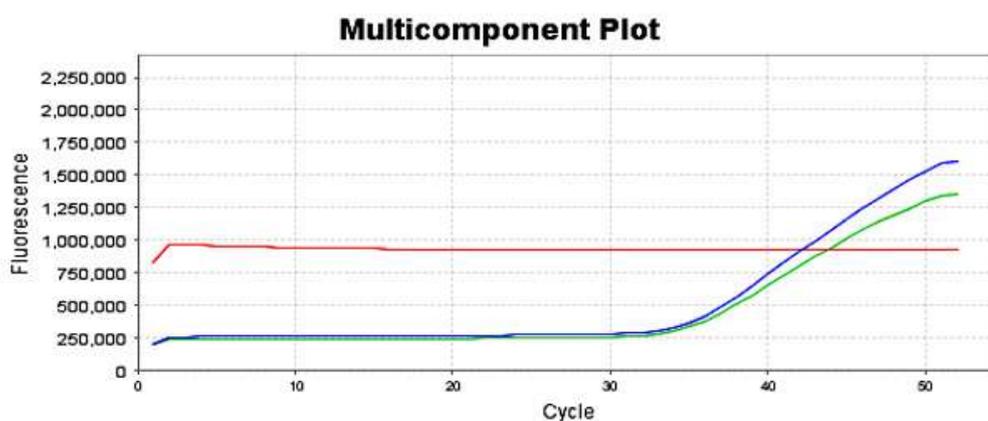


Figura 16. Gráficos multicomponentes do gene *APOE* (*rs7412*) e o ciclo utilizado para amplificação. O eixo y indica a fluorescência do fluoróforo e o eixo x o número de ciclos. A curva verde indica a fluorescência do VIC e o azul é a fluorescência do FAM. O gráfico A representa um homozigoto selvagem e o B um heterozigoto.

5.7 Análise estatística

Foi realizada uma análise descritiva das características sociodemográficas e clínicas dos indivíduos envolvidos no estudo, além da análise comparativa entre os grupos Paciente e o grupo Controle, determinando as estimativas de risco (ORs). Também foi realizada uma análise da relação entre as características quantitativas e os diversos polimorfismos. Basicamente, nos testes comparativos e sobre as características qualitativas, foi utilizado o teste de Qui-Quadrado. Na comparação de dois grupos, foram utilizados o teste de t-Student (para dados de distribuição normal) ou o teste Mann-Whitney (para dados não paramétricos). Nas comparações para mais de dois grupos, utilizamos a análise de variância (ANOVA para dados de distribuição normal) ou teste de Kruskal-Wallis (para dados não paramétricos).

Para execução das análises estatísticas foi utilizado o programa SPSS (versão 22.0) que é empregado na execução dos testes t- Student, ANOVA, Kruskal-Wallis, análise de regressão e correlação linear e análise de regressão logística. A inferência dos resultados foi avaliada ao nível de significância de 0,05. Para análise haplotípica utilizamos o *software Unphased*, versão 3.1.7, e o *EH program*, versão 24.0.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização Sociodemográfica da amostra

Foram realizadas as coletas de amostras de sangue de 268 indivíduos acima de 55 anos, do Programa de Atenção Integrada da Saúde do Idoso do Município de Duque de Caxias e do Instituto de Psiquiatria da Universidade Federal do Rio de Janeiro, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão do presente estudo. Desses 268 indivíduos, 199 fazem parte do grupo controle e 69 foram alocados no grupo pacientes. Em todos os 268 indivíduos participantes desta pesquisa foi aplicado o CDR onde o grupo controle foi classificado pelos scores 0 e 0,5 e o grupo paciente pelos scores 1, 2 e 3. Dos indivíduos que foram alocados no grupo paciente, 38 realizaram a tomografia computadorizada.

Com relação às características sócio-demográficas e clínicas (tabela 1), a amostra apresentou as seguintes características: a média de idade foi de 72,71 ± 8,71 anos no grupo controle e de 75,09 ± 9,29 anos no grupo pacientes. Em ambos os grupos houve predomínio do sexo feminino e uma significância estatística de $p=0,000$ e a escolaridade variou tanto no grupo caso quanto no grupo controle, apresentando significância estatística $p=0,002$.

Tabela 1. Análise descritiva das variáveis quantitativas para Paciente x Controle

Variáveis	Paciente (n=69)	Controle (n=199)	P
Idade (anos)	75,09±9,29	72,71±8,71	0,372
Sexo	♀46 ♂23	♀160 ♂39	0,000
Escolaridade			
Analfabeto	15	46	
Ensino Fundamental	30	118	
Ensino Médio	11	27	0,002
Superior	8	6	
Não informado	5	2	

Os valores representam média ± desvio padrão das variáveis quantitativas; n para variáveis qualitativas. O P representa a significância da comparação entre os dois grupos.

Quanto à comparação do CDR entre os grupos, nos casos o score 1 teve maior predomínio, seguido dos scores 2 e 3 observando-se diferenças estatísticas significantes em ambos os grupos ($p=0,000$) (tabela 2).

Tabela 2. Análise descritiva do CDR para Paciente x Controle

CDR	Paciente	Controle
0	-	121
0,5	-	78
1	39	-
2	22	-
3	8	-

A tabela 3 mostra uma comparação entre os CDRs obtidos e os gêneros, contudo não foi observada diferença significativa estatisticamente para ambos os grupos ($p=0,091$).

Tabela 3. Distribuição do CDR entre os gêneros

CDR	Feminino	Masculino	<i>P</i>
0	63	15	
0,5	97	24	
1	24	15	0,091
2	15	7	
3	7	1	

O *P* representa a significância da comparação entre os dois grupos.

6.2 Análise Genética

Com relação aos polimorfismos estudados, realizamos análises da distribuição alélica e distribuição genotípica para todos os polimorfismos. Entretanto para o gene *APOE*, foi adicionada a análise dos haplótipos entre os SNPs desse gene. Todos os SNPs apresentaram um alelo de menor frequência maior que 10%, o que indica uma boa penetrância dos alelos na população.

Na análise genotípica (tabela 4) o resultado obtido foi significativo para os polimorfismos *rs6656401* (do gene *CR1*), *rs429358* e *rs7412* (ambos incluídos no gene *APOE*). Na análise alélica (tabela 4), o alelo ancestral C do SNP *rs429358* do gene *APOE* mostrou-se associado com a Doença de Alzheimer ($OR= 4,009$, $p= 0,000$). Para os outros SNPs dos genes *CLU*, *CR1*, *PICALM* e *APOE* (*rs7412*), não foi observada nenhuma associação alélica (tabela 4).

Tabela 4. Análise da associação dos polimorfismos em estudo com a DA

Gene/SNP	Genótipo	Paciente n	Controle n	Total	p'
CLU rs11136000	T/T	36	78	114	0,168
	T/C	32	118	150	
	C/C	1	3	264	
	Total	69	199	268	
	p (H-W)	0,754	0,688		
	Alelos				p''
	T	104	274	378	0,350
C	34	124	158		
Total	138	398	536		
CR1 rs6656401	Genótipo				p'
	A/A	5	2	7	0,006
	G/A	24	96	120	
	G/G	40	101	141	
	Total	69	199	268	
	p (H-W)	0,246	0,251		
	Alelos				p''
G	104	298	402	0,993	
A	34	100	134		
Total	138	398	536		
PICALM rs3851179	Genótipo				p'
	T/T	15	22	37	0,084
	C/T	30	96	126	
	C/C	24	81	105	
	Total	69	199	268	
	p (H-W)	0,435	0,352		
	Alelos				p''
C	78	258	336	0,220	
T	60	140	200		
Total	138	398	536		
APOE rs429358	Genótipo				p'
	TT	21	122	143	0,000
	CT	26	73	99	
	CC	29	4	26	
	Total	69	199	268	
	p (H-W)	0,493	0,796		
	Alelos				p''
T	68	317	385	0,000	
C	70	81	151		
Total	138	398	536		
APOE rs7412	Genótipo				p'
	TT	0	13	13	0,028
	CT	29	59	88	
	CC	40	127	167	
	Total	69	199	268	
	p (H-W)	0,21	0,214		
	Alelos				p''
T	29	85	114	0,933	
C	109	313	422		
Total	138	398	536		

O valor de p é referente ao nível de significância no teste de Hardy-Weinberg. p' é o valor da significância no teste de homogeneidade entre as amostras; p'' é o valor da significância no teste das diferenças alélicas.

No gene *CR1* o genótipo AA apresenta um risco associado à DA, em relação a combinação GG+GA, bastante significativo (OR = 7.695; $P=0,005$) (tabela 5).

Tabela 5. Análise da associação do polimorfismo *rs6656401* do gene *CR1*

Genótipo	Paciente	Controle	Total	p	pa	Σpa
AA	5	2	7	0,714	3,571	19,265
GG+GA	64	197	261	0,245	15,693	
Total	69	199	268	0,257	17,765	

$X^2 = 7,846$ OR = 7,695

No gene *APOE* o genótipo TT do polimorfismo *rs7412* mostra-se como um fator de proteção associado à DA em relação a combinação CC+CT que apresenta um risco relativo estatisticamente significativo (OR= 10,107, $P=0,031$). Nestas análises, os dados foram ajustados de acordo com as sugestões de Mandel e Woolf (1995) e Haldane e Smith (1956) (tabela 6).

Tabela 6. Análise da associação do polimorfismo *rs7412* do gene *APOE*

Genótipo	Paciente	Controle	Total	p	pa	Spa
CC+CT	69	186	255	0,271	18,671	18,671
TT	0	13	13	0,000	0,000	
Total	69	199	268	0,257	17,765	

$X^2 = 4,675$ OR = 10,107

Foi realizada uma análise haplotípica entre os haplótipos do gene *APOE* e foram determinados os riscos relativos para cada épsilon (tabela 7), usando como referência o haplótipo $\epsilon 2$. Ademais, também foi realizada uma análise de combinação haplotípica entre os polimorfismos do gene *APOE* (tabela 8).

Tabela 7. Análise haplotípica dos polimorfismos do gene *APOE*

Haplótipo	Paciente	Controle	Total	OR	p
ε2	8	81	244	1	***
ε3	81	240	321	3,249	0,001
ε4	49	77	126	6,124	0,002
Total	138	398	536		

ε2= CC; ε3= CT; ε4= TT; $\chi^2= 24,501$

Tabela 8. Análise de combinação haplotípica dos polimorfismos do gene *APOE*

Comb Haplo	ε2/ε2	ε2/ε3	ε2/ε4	ε3/ε3	ε3/ε4	ε4/ε4
Paciente	0	8	0	19	35	7
Controle	10	37	24	78	47	3
Total	10	45	24	97	82	10

CC + CC= ε2/ε2; CC + CT= ε2/ε3; CC + TT= ε2/ε4; CT + CT= ε3/ε3; CT + TT= ε3/ε4; TT + TT= ε4/ε4

7 DISCUSSÃO

No Brasil, pode-se observar o predomínio da população feminina em relação à masculina e, segundo dados do IBGE em 2010, a população idosa feminina era de 11.434.487 enquanto a masculina correspondia a 9.156.112 indivíduos. No presente estudo a população feminina amostral foi muito maior que a masculina, tanto no grupo de pacientes (67%) quanto no grupo controle (80%), o que está de acordo com achados de caráter nacional e internacional (Shiau *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2009; Talmelli *et al.*, 2010). Essas diferenças podem ser atribuídas ao fato de que, de um modo geral, a população feminina possui um cuidado muito maior com a saúde, o que se reflete em uma proporção de mulheres idosas em relação à população masculina (Gomes *et al.*, 2007).

Quanto a escolaridade, a maioria estudou até 4 anos em ambos os grupos (47% e 35%) seguidos dos que estudaram até 8 anos (22% e 16%). De acordo

com o censo demográfico realizado pelo IBGE em 2010, a taxa de indivíduos que não tinham completado os primeiros anos da educação básica diminuiu cerca de 14,7% em relação ao ano 2000 (58,40%), ainda assim esse dado é considerado extremamente alto, visto que atualmente a taxa de indivíduos que não completaram o ensino fundamental é de 43,70%.

Diversas pesquisas indicam que exista uma “reserva cognitiva” proporcionada pelos feitos educacionais e profissionais que é capaz de retardar os sintomas clínicos decorrentes da DA (Evans *et al.*, 1993; Letenneur *et al.*, 1994; Stern *et al.*, 1994). Em um estudo realizado pelo grupo do Dr. Stern (1997) envolvendo 177 pacientes do *National Institute of Neurologic and Communicative Disorders and Stroke Alzheimer’s Disease*, sustenta a ideia de que os sintomas clínicos da Doença de Alzheimer avançam rapidamente em indivíduos com maior escolaridade e ocupação. Ademais, estudos de imagenologia sugerem que o nível da reserva cognitiva que o indivíduos possui pode influenciar diretamente a severidade das manifestações clínicas da doença (Stern *et al.*, 1992; Stern *et al.*, 1995; Alexander *et al.*, 1997). Contudo, sabe-se que a progressão dessa neuropatologia não difere em função da reserva cognitiva. Por isso, indivíduos que desenvolvem a Doença de Alzheimer e possuem um nível de escolaridade alto tendem a vivenciar os sintomas clínicos, por um período de tempo mais curto, quando comparados com indivíduos que possuem níveis mais baixos de escolaridade (Stern *et al.*, 1999).

Em relação ao desempenho cognitivo do grupo controle, segundo o CDR, 60% dos pacientes apresentaram pontuação 0 (sem comprometimento cognitivo) e 40% dos indivíduos apresentaram pontuação 0,5 (comprometimento cognitivo muito leve). O score de 0,5 na escala do CDR pode ser considerado como uma fase clínica causada pelo envelhecimento normal do indivíduo, este apresentando um comprometimento da memória episódica, algumas vezes um pouco maior que o esperado para sua idade (Hamdan e Bueno, 2005).

Por outro lado, verificou-se um comprometimento muito maior no grupo de pacientes alcançando-se as pontuações 1 (56%), estágio no qual o dano cognitivo se torna mais evidente devido às dificuldades que o paciente apresenta com as rotinas tanto doméstica quanto profissional, 2 (31%), em que

o paciente geralmente se encontra sob os cuidados de um médico especialista que coordena o tratamento clínico dos sintomas provocados pela doença, e 3 (11%) em que apesar da medicação administrada, o paciente se encontra totalmente dependente de terceiros para realizar qualquer tipo de tarefa e é comum, neste estágio, o indivíduo estar acamado.

7.1 Variantes polimórficas

7.1.1 *CLU*

O polimorfismo analisado no gene *CLU* foi o rs11163000 (T/C) e de acordo com o banco de dados *Ensemble* a prevalência do alelo C é de 62% na população mundial, apresentando uma maior frequência na população asiática (78%) e uma menor frequência na população africana (43%). No grupo controle de nosso estudo, a frequência do alelo C observada foi de 31%. Essa baixa frequência pode ser explicada não só pela intensa miscigenação étnica da população brasileira (Krieger *et al.*, 1965; Pena, 2011) que a torna singular em relação aos países claramente homogêneos. Deve-se somar a isto o fato da heterogeneidade observada entre as diversas regiões do país.

No estudo de Tycko e colaboradores (1996) foram analisados diversos polimorfismos do gene *CLU*, incluindo o rs11163000, e também o gene *APOE-ε4* em 341 indivíduos com DA e 495 controles, onde estes foram separados em grupos étnicos. Em relação ao genótipo CC do polimorfismo rs11163000 não foi observado nenhum resultado estatístico significativo, porém quando o combinaram com o genótipo ε4/ε4 do gene *APOE* observaram que essa combinação aumentava o risco de desenvolvimento da DA em 6 vezes.

Por outro lado, os estudos multicêntricos (*Genome Wide Association Studies*) desenvolvidos por Lambert e colaboradores e Harold e colaboradores, ambos no ano de 2009, identificaram o genótipo CC do polimorfismo rs11163000 como tendo um risco de 8,9 ($p = 0,000$), para o desenvolvimento da DA.

Komatsu e colaboradores (2011) realizaram um estudo envolvendo uma população japonesa onde avaliaram 6 polimorfismos do gene *CLU*, incluindo o

rs11163000, em 180 pacientes e 130 controles, contudo não encontraram associação do genótipo CC na população estudada ($p=0,47$). Um estudo similar ao nosso foi realizado por Belcavello e colaboradores (2015) em Vitória no Espírito Santo, no qual o rs11163000 foi avaliado em 82 pacientes com DA e 161 controles, não encontraram nenhuma associação deste polimorfismo com a DA.

Corroborando a constatação realizada pelas análises supracitadas, nosso estudo não mostrou nenhuma associação desse polimorfismo com a doença de Alzheimer ($p=0,168$). Esses dados nos sugerem a necessidade de aumentar o tamanho amostral, além de se testar a atuação conjunta dele com outros polimorfismos que mostram-se associados à DA em outras populações (Harold *et al.*, 2009; Lambert *et al.*, 2009).

7.1.2 CR1

O SNP rs6656401 do gene CR1 (G/A) foi também foi avaliado no presente estudo e de acordo com o banco de dados *Ensemble* a prevalência do alelo A é de 7% na população mundial, apresentando uma maior frequência na população europeia (17%) e uma menor frequência na população africana (1%). Em nosso estudo, a frequência do alelo A foi de 25%, se aproximando mais da população europeia, fato este que pode ser explicado pela intensa miscigenação, uma vez que muitos imigrantes europeus vieram para o Brasil devido as várias batalhas e à escassez de suprimentos em suas terras (Pena *et al.*, 2011).

Em relação ao genótipo AA do polimorfismo rs6656401 presente no gene CR1 foi encontrada uma associação significativa com a DA (OR= 7,695, $\chi^2=7,846$, $p=0,010$). Nossos dados mostram que o gene CR1 pode se enquadrar como um bom marcador para a Doença de Alzheimer, que poderia ser confirmado por estudos multicêntricos ou meta-análise de maneira a superar o problema do tamanho amostral reduzido.

Nossos resultados corroboram outros estudos como o de Carrasquillo e colaboradores (2010), que realizaram uma avaliação do genótipo AA no SNP rs6656401 em 1.829 indivíduos com DA e 2.576 indivíduos saudáveis, vindos do

Reino Unido e dos Estados Unidos da América, onde também encontraram esse genótipo associado significativamente com a doença ($p=1,4\times 10^{-2}$).

Igualmente, os estudos desenvolvidos por Lambert e colaboradores e Harold e colaboradores, ambos em 2009, identificaram o genótipo AA do polimorfismo *rs6656401* como tendo um risco de 3,1 ($p= 0,000$) para o desenvolvimento da DA.

Outrossim, Chen e colaboradores (2012) avaliaram, entre outros SNPs o *rs6656401* do gene *CR1* em 462 pacientes e 350 controles de uma amostra da população de Hong Kong e observaram resultados, estatisticamente significativos ($p = 0,034$), corroborados por nossos achados.

7.1.3 *PICALM*

A variante analisada do gene *PICALM* foi o *rs3851179* (C/T) e de acordo com o banco de dados *Ensemble* a prevalência do alelo T é de 31% na população mundial, apresentando maior frequência na população asiática (41%) e menor frequência na população africana (11%). Em nosso estudo, a frequência alélica observada foi de 35% sendo similar à frequência da população europeia (37%), cuja justificativa foi mencionada anteriormente.

No estudo de Kamboh e colaboradores (2012) foram avaliados 2.207 indivíduos caucasianos divididos em dois grupos, 1.348 pacientes com DA e 1.359 controles, sendo verificada uma tendência de associação com a DA ($p= 0,071$). Esse mesmo estudo apresentou similaridade com o estudo multicêntrico (*Genome Wide Association Study*) desenvolvido por Harold e colaboradores (2009), no qual também fora constatada uma associação do genótipo TT do *rs3851179* do gene *PICALM* com a doença de Alzheimer ($p= 0,014$).

Entretanto, Chen e colaboradores (2012) avaliaram a associação entre o gene *PICALM* e a doença de Alzheimer em 462 pacientes e 350 controles e não encontraram resultados estatisticamente significativos com relação ao genótipo TT ($p= 0,840$).

Na análise genotípica do presente estudo não verificamos a associação do genótipo TT do polimorfismo *rs3851179* do gene *PICALM* com a DA ($\chi^2=$

4.188, $p=0,123$). Assim como já mencionado no gene *CLU*, os resultados negativos obtidos para o gene *PICALM* podem ser devidos ao pequeno tamanho da amostra e, possivelmente, a necessidade da combinação com outros polimorfismos para obtenção de resultados consistentes.

7.1.4 APOE

Os polimorfismos analisados no gene *APOE* foram o rs429358 (C/T) e o rs7412 (C/T). Um dado interessante é que no polimorfismo rs429358 o alelo ancestral (C) é associado à Doença de Alzheimer (Kanekiyo *et al.*, 2014), diferentemente do polimorfismo rs7412 onde o alelo mutante (T) é o associado com esta doença.

De acordo com o banco de dados *Ensemble* a frequência do alelo T para o polimorfismo rs429358 é de 85% na população mundial, apresentando maior frequência na população asiática (91%) e uma menor frequência na população africana (73%). Em nosso estudo a frequência observada foi de 80%. Com relação ao polimorfismo rs7412 a prevalência do alelo C na população mundial é de 92%, apresentando maior frequência nos ameríndios (95%) e uma menor frequência nas populações africanas e asiáticas (90%). Em nosso estudo a frequência observada foi de 79%.

Tilvis e colaboradores (1998) avaliaram a presença de $\epsilon 4$ em 550 indivíduos (41 com DA, 28 com demência, 219 com doenças vasculares e 262 controles) com idade entre 75 a 85 anos, e associaram a presença de pelo menos um alelo $\epsilon 4$ no grupo de demência e no grupo com DA ($p=0,001$), entretanto não observaram associação significativa com o grupo de doenças cardiovasculares ($p=0,835$). Em um estudo anterior a este, realizado em indivíduos com Doença de Alzheimer por Farrer e colaboradores (1997), constatou-se que o odds ratio é de 2,6 para o genótipo $\epsilon 2/\epsilon 4$ e de 3,2 para o genótipo $\epsilon 3/\epsilon 4$. Contudo, para o genótipo $\epsilon 4/\epsilon 4$ o OR é elevado para 14,9 e o alelo $\epsilon 2$ mostra-se como sendo de proteção (OR= 0,6) na população estudada.

Em um estudo reproduzido por Kardaum e colaboradores (2000), foram genotipados para o gene *APOE* 105 homens nipo-americanos, com idade entre

71 a 93 anos, que desenvolveram a doença de Alzheimer. Observou-se uma associação de risco dos homozigotos $\epsilon 4$ significativamente maior quando comparado com a associação de risco dos heterozigotos (OR= 14,7, OR= 2,0).

Lambert e colaboradores (2002) realizaram um estudo de genotipagem do *APOE* em 1.732 indivíduos com DA e 1.926 controles. Esses indivíduos foram agrupados de acordo com a etnia (finlandeses, europeus, hispânicos e americanos), e, com base nas análises estatísticas, foi observada significância estatística para todos os grupos, exceto para o grupo dos finlandeses ($p=0,500$). O grupo de europeus apresentou uma significância de $p= 0,009$ que se aproxima da significância do grupo de americanos de Minnesota ($p= 0,008$). A significância para o grupo de hispânicos e para o grupo de americanos do Missouri foi de $p= 0,001$.

Os resultados encontrados em nosso estudo corroboram as conclusões apresentadas pelos estudos supracitados. Na análise genotípica verificamos a associação do genótipo CC do polimorfismo *rs429358* do gene *APOE* com a DA ($p= 0,000$) bem como para o polimorfismo *rs7412* ($p=0,028$). Foi realizada, para este mesmo polimorfismo, uma análise de associação entre os genótipos. A distribuição de CT e CC não são significativas e por isso fomos capazes de agrupá-los e testá-los contra o TT e, feito isso, o resultado se mostrou significativo ($\chi^2= 4,675$, $p= 0,031$). Além disso, verificamos uma distribuição de casos heterogênea, contudo, devido à falta de indivíduos na classe TT não foi possível calcular os riscos.

A análise haplotípica do gene *APOE* (*rs429358* e *rs7412*) mostrou uma forte associação do haplótipo $\epsilon 4$ com a doença de Alzheimer ($\chi^2= 9,944$, $p= 0,002$) mostrando que a presença do haplótipo $\epsilon 4$ aumentou o risco de desenvolvimento da doença nos indivíduos que carregam pelo menos um haplótipo $\epsilon 4$ em 6 vezes (OR= 6,124), sendo maior que o risco observado para os indivíduos que apresentam pelo menos um haplótipo $\epsilon 3$ (OR= 3,249). A análise de combinação haplotípica mostrou que o grupo controle apresentou 10 indivíduos com o genótipo $\epsilon 2/\epsilon 2$ (CC+CC), 37 com o genótipo $\epsilon 2/\epsilon 3$ (CC+CT), 24 com o genótipo $\epsilon 2/\epsilon 4$ (CC+TT), 78 com o genótipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ (CT+CT), 47 com o genótipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ (CT+TT) e 3 com o genótipo $\epsilon 4/\epsilon 4$ (TT+TT). Com relação ao grupo

de paciente, a análise de combinação haplotípica mostrou 8 indivíduos com o genótipo $\epsilon 2/\epsilon 3$ (CC+CT), 19 com o genótipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ (CT+CT), 35 com o genótipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ (CT+TT) e 7 com o genótipo $\epsilon 4/\epsilon 4$ (TT+TT), entretanto nenhum indivíduo foi encontrado com os genótipos $\epsilon 2/\epsilon 2$ (CC+CC) e $\epsilon 2/\epsilon 4$ (CC+TT). Os dados obtidos vão de encontro indo de encontro com a literatura uma vez que o $\epsilon 2$ é caracterizado como uma isoforma que confere proteção, o $\epsilon 3$ pode se apresentar ou não como sendo uma isoforma de proteção e o $\epsilon 4$ sendo caracterizado por favorecer o acúmulo de proteína A β aumentando os riscos de desenvolvimento da doença.

Diante dos resultados apresentados sobre os polimorfismos associados a Doença de Alzheimer, é possível observar a complexidade que envolve a realização desse tipo de estudo que envolve doenças multifatoriais e um número amostral pequeno. Por essa razão, se faz necessário uma maior captação de amostras para se obter resultados mais consistentes. Paralelo a essa limitação, o avanço da pesquisa se torna ainda mais difícil quando consideramos a complexidade e diversidade étnica na população brasileira e, particularmente no Rio de Janeiro, onde diferentes grupos ancestrais contribuíram para a formação de sua população, dentre eles Europeus (52%), Africanos (41%) e Ameríndios (7%) (Pena *et al.*, 2011).

8 CONCLUSÃO

- Na análise descritiva das variáveis quantitativas observamos diferenças significativas na comparação entre os gêneros e os grupos ($p= 0,000$), bem como na escolaridade ($p= 0,002$).
- Na comparação dos escores obtidos do CDR entre os grupos foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p= 0,000$).
- Entre os escores do CDR não foram observadas diferenças estatísticas quando comparados entre os gêneros ($p= 0,091$). Mas este valor, por encontrar-se perto do nível de significância, mostra a necessidade de ampliar o tamanho amostral ou efetuar estudos de meta-análise.
- Na análise genotípica realizada para os polimorfismos *rs6656401* do gene *CR1*, para o *rs429358* e *rs7412* do gene *APOE*, observa-se associações significativas destes polimorfismos com a Doença de Alzheimer ($p= 0,006$, $p= 0,000$, $p= 0,030$, respectivamente).
- Com relação aos polimorfismos *rs11136000* do gene *CLU* e *rs3851179* do gene *PICALM*, não foram observadas diferenças significantes na distribuição genotípica dos grupos Controle e Paciente ($p= 0,168$, $p= 0,084$, respectivamente).
- Na análise alélica o polimorfismo *rs429358* do gene *APOE* apresentou *odds ratio* 4,009 e $p= 0,000$ mostrando-se significativamente associado com a Doença de Alzheimer.
- Não foram observadas diferenças significantes entre as frequências alélicas dos grupos Controle e Paciente nos genes *CLU*, *CR1*, *PICALM* e *APOE* (*rs7412*).

- A análise de combinação haplotípica revelou que o risco de desenvolvimento da doença para os indivíduos que possuem o haplótipo $\epsilon 4$ é elevado (OR= 6,124) quando comparado ao haplótipo $\epsilon 3$ (OR= 3,249).

Este estudo foi relevante porque demonstrou uma associação dos genes *CR1* e *APOE* com a Doença de Alzheimer na amostra avaliada, porém outros estudos são necessários para uma melhor compreensão desta doença e sua relação genótipo-fenótipo na população brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIC - Alzheimer's Disease International Consortium AD International, World Alzheimer Report. Alzheimer's disease International, London, 2009. Disponível em <http://www.alz.co.uk>.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., e Walter, P. (2009). *Biologia molecular da célula*. Artmed Editora.

Alexander, G. E., Furey, M. L., Grady, C. L., Pietrini, P., Brady, D. R., Mentis, M. J., & Schapiro, M. B. (1997). Association of premorbid intellectual function with cerebral metabolism in Alzheimer's disease: implications for the cognitive reserve hypothesis. *American Journal of Psychiatry*, 154(2), 165-172.

Ali, R., Sheikha, I. A., Jabirb, N. R., e Kamal, M. A. (2012). Comparative Review of Decade's Research on Cholinesterase Inhibition. *American Journal of Neuroprotection and Neuroregeneration*, 4(2), 136-144.

Altmann, A., Tian, L., Henderson, V. W., e Greicius, M. D. (2014). Sex modifies the APOE-related risk of developing Alzheimer disease. *Annals of neurology*, 75(4), 563-573.

Alzheimer's Association. (2013). FDA-Approved Treatment for Alzheimer's. Available at: Accessed, v. 29, 2013.

Ando, K., Brion, J. P., Stygelbout, V., Suain, V., Authelet, M., Dedecker, R., ... e Rogaeva, E. (2013). Clathrin adaptor CALM/PICALM is associated with neurofibrillary tangles and is cleaved in Alzheimer's brains. *Acta neuropathologica*, 125(6), 861-878.

Belcavello, L., Camporez, D., Almeida, L. D., Morelato, R. L., Batitucci, M. C., e de Paula, F. (2015). Association of MTHFR and PICALM polymorphisms with Alzheimer's disease. *Molecular biology reports*, 42(3), 611-616.

Bell, R. D., Sagare, A. P., Friedman, A. E., Bedi, G. S., Holtzman, D. M., Deane, R., e Zlokovic, B. V. (2007). Transport pathways for clearance of human

Alzheimer's amyloid β -peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *Journal of Cerebral Blood Flow e Metabolism*, 27(5), 909-918.

Bettens, K., Sleegers, K., e Van Broeckhoven, C. (2010). Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Human molecular genetics*, ddq142.

BRASIL. Decreto nº 1.948 de 03 de Julho de 1996. Regulamenta a Lei nº 8.842 de 04 de Janeiro de 1994 sobre a Política Nacional do Idoso. Publicada no Diário Oficial da União em 04 de Julho de 1996, p12277. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/d1948.htm

BRASIL. Lei nº 8.842 de 04 de Janeiro de 1994. Política Nacional do Idoso. Publicada no Diário Oficial da União em 05 de Janeiro de 1994, p77. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L8842.htm

Broussard, J. I., Yang, K., Levine, A. T., Tsetsenis, T., Jenson, D., Cao, F., ... e Dani, J. A. (2016). Dopamine regulates aversive contextual learning and associated in vivo synaptic plasticity in the hippocampus. *Cell reports*, 14(8), 1930-1939.

Brucki, S. M., e Schultz, R. R. (2011). Recomendações para o diagnóstico e tratamento da doença de Alzheimer e demência vascular: Aspectos gerais. *Dementiae Neuropsychologia*, 5(1).

Bushlin, I., Petralia, R. S., Wu, F., Harel, A., Mughal, M. R., Mattson, M. P., e Yao, P. J. (2008). Clathrin assembly protein AP180 and CALM differentially control axogenesis and dendrite outgrowth in embryonic hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, 28(41), 10257-10271.

Calero, O., Hortigüela, R., Bullido, M. J., e Calero, M. (2009). Apolipoprotein E genotyping method by Real Time PCR, a fast and cost-effective alternative to the TaqMan® and FRET assays. *Journal of neuroscience methods*, 183(2), 238-240.

Carrasquillo, M. M., Belbin, O., Hunter, T. A., Ma, L., Bisceglia, G. D., Zou, F., ... e Petersen, R. C. (2010). Replication of CLU, CR1, and PICALM associations with Alzheimer disease. *Archives of neurology*, 67(8), 961-964.

Cedazo-Mínguez, A., e Cowburn, R. F. (2001). Apolipoprotein E: a major piece in the Alzheimer's disease puzzle. *Journal of cellular and molecular medicine*, 5(3), 254-266.

Chen, D. H. E. N., Jun Wu, Z. H. A. N. G., Zhen Xin, Z. H. A. N. G., Hua Lu, Z. H. A. O., Xiao Qing, L. I., Ya Ning, W. U., e Qiu Ming, Q. U. (2003). Apolipoprotein E gene polymorphisms and Alzheimer disease. *遗传学*30(12).

Chen, L. H., Kao, P. Y. P., Fan, Y. H., Ho, D. T. Y., Chan, C. S. Y., Yik, P. Y., ... e Song, Y. Q. (2012). Polymorphisms of CR1, CLU and PICALM confer susceptibility of Alzheimer's disease in a southern Chinese population. *Neurobiology of aging*, 33(1), 210-e1.

Chouraki, V., e Seshadri, S. (2014). Genetics of Alzheimer's disease. *Adv Genet*, 87, 245-294.

Cirrito, J. R., Kang, J. E., Lee, J., Stewart, F. R., Verges, D. K., Silverio, L. M., ... e Holtzman, D. M. (2008). Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid- β in vivo. *Neuron*, 58(1), 42-51.

Clifford J. R., Lowe, V. J., Weigand, S. D., Wiste, H. J., Senjem, M. L., Knopman, D. S., ... e Weiner, M. (2009). Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease. *Brain*, 62.

Coon, K. D., Myers, A. J., Craig, D. W., Webster, J. A., Pearson, J. V., Lince, D. H., ... e Halperin, R. F. (2007). A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Psychiatry*, 68(4), 613.

Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G., ... e Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E

type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261(5123), 921-923.

Crehan, H., Holton, P., Wray, S., Pocock, J., Guerreiro, R., e Hardy, J. (2012). Complement receptor 1 (CR1) and Alzheimer's disease. *Immunobiology*, 217(2), 244-250.

Cruz, V. T., Pais, J., Teixeira, A., e Nunes, B. (2004). Sintomas iniciais de demência de Alzheimer: a percepção dos familiares. *Acta Med Port*, 17, 435-444.

Cummings, J. L., Morstorf, T., e Zhong, K. (2014). Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimer's research e therapy*, 6(4), 1.

Cummings, J. L., Zhong, K., Kinney, J. W., Heaney, C., Moll-Tudla, J., Joshi, A., ... e Bena, J. (2016). Double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept trial of bexarotene in moderate Alzheimer's disease. *Alzheimer's research e therapy*, 8(1), 4.

Daw, E. W., Payami, H., Nemens, E. J., Nochlin, D., Bird, T. D., Schellenberg, G. D., e Wijsman, E. M. (2000). The number of trait loci in late-onset Alzheimer disease. *The American Journal of Human Genetics*, 66(1), 196-204.

Duthey, B. (2013). Background paper 6.11: Alzheimer disease and other dementias. *A Public Health Approach to Innovation*, 1-74.

Evans, D. A., Beckett, L. A., Albert, M. S., Hebert, L. E., Scherr, P. A., Funkenstein, H. H., e Taylor, J. O. (1993). Level of education and change in cognitive function in a community population of older persons. *Annals of epidemiology*, 3(1), 71-77.

Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., ... e Van Duijn, C. M. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Jama*, 278(16), 1349-1356.

Ford, J. M., Askari, N., Gabrieli, J. D., Mathalon, D. H., Tinklenberg, J. R., Menon, V., e Yesavage, J. (2001). Event-related brain potential evidence of spared knowledge in Alzheimer's disease. *Psychology and aging*, 16(1), 161.

Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M., e Wilcock, G. K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery e Psychiatry*, 66(2), 137-147.

Gibb, W. R., Mountjoy, C. Q., Mann, D. M., e Lees, A. J. (1989). The substantia nigra and ventral tegmental area in Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Journal of Neurology, Neurosurgery e Psychiatry*, 52(2), 193-200.

Gomes, R., do Nascimento, E. F., e de Araújo, F. C. (2007). Por que os homens buscam menos os serviços. *Cad. saúde pública*, 23(3), 565-574.

Haldane, J. B. S., e Smith, S. M. (1956). The sampling distribution of a maximum-likelihood estimate. *Biometrika*, 43(1/2), 96-103.

Hamdan, A. C., e Bueno, O. F. A. (2005). Relações entre controle executivo e memória episódica verbal no comprometimento cognitivo leve e na demência tipo Alzheimer. *Estudos de Psicologia*, 10(1), 63-71.

Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M. L., ... e Jones, N. (2009). Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease. *Nature genetics*, 41(10), 1088-1093.

Hollingworth, P., Harold, D., Jones, L., Owen, M. J., e Williams, J. (2011). Alzheimer's disease genetics: current knowledge and future challenges. *International journal of geriatric psychiatry*, 26(8), 793-802.

Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, J. C., Carrasquillo, M. M., ... e Dowzell, K. (2011). Common variants at *ABCA7*, *MS4A6A/MS4A4E*, *EPHA1*, *CD33* and *CD2AP* are associated with Alzheimer's disease. *Nature genetics*, 43(5), 429-435.

Hyten, D. L., Song, Q., Fickus, E. W., Quigley, C. V., Lim, J. S., Choi, I. Y., ... e Cregan, P. B. (2010). High-throughput SNP discovery and assay development in common bean. *BMC genomics*, 11(1), 475.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. 2010. Disponível em: www.ibge.gov.br.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. 2011. Disponível em: www.ibge.gov.br.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. 2013. Disponível em: www.ibge.gov.br.

Jones, S. E., e Jomary, C. (2002). Clusterin. *The international journal of biochemistry e cell biology*, 34(5), 427-431.

Jürgensen, S., Antonio, L. L., Mussi, G. E., Brito-Moreira, J., Bomfim, T. R., De Felice, F. G., ... e Ferreira, S. T. (2011). Activation of D1/D5 dopamine receptors protects neurons from synapse dysfunction induced by amyloid- β oligomers. *Journal of Biological Chemistry*, 286(5), 3270-3276.

Kamboh, M. I., Minster, R. L., Demirci, F. Y., Ganguli, M., DeKosky, S. T., Lopez, O. L., e Barmada, M. M. (2012). Association of CLU and PICALM variants with Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 33(3), 518-521.

Kanekiyo, T., Xu, H., e Bu, G. (2014). ApoE and A β in Alzheimer's disease: Accidental encounters or partners?. *Neuron*, 81(4), 740-754.

Kasuga, K., Shimohata, T., Nishimura, A., Shiga, A., Mizuguchi, T., Tokunaga, J., ... e Onodera, O. (2009). Identification of independent APP locus duplication in Japanese patients with early-onset Alzheimer disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery e Psychiatry*, 80(9), 1050-1052.

Kenyon, C. J. (2010). The genetics of ageing. *Nature*, 464(7288), 504-512.

Komatsu, M., Shibata, N., Kuerban, B., Ohnuma, T., Baba, H., e Arai, H. (2011). Genetic association between clusterin polymorphisms and Alzheimer's disease in a Japanese population. *Psychogeriatrics*, 11(1), 14-18.

Krieger, H., Morton, N. E., Mi, M. P., Azevedo, E., Freire-Maia, A., e Yasuda, N. (1965). Racial admixture in north-eastern Brazil. *Annals of human genetics*, 29(2), 113-125.

Kyriazis, G. A., Wei, Z., Vandermeij, M., Jo, D. G., Xin, O., Mattson, M. P., e Chan, S. L. (2008). Numb endocytic adapter proteins regulate the transport and processing of the amyloid precursor protein in an isoform-dependent manner implications for Alzheimer disease pathogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(37), 25492-25502.

Lambert, J. C., Araria-Goumidi, L., Myllykangas, L., Ellis, C., Wang, J. C., Bullido, M. J., ... e Frigard, B. (2002). Contribution of APOE promoter polymorphisms to Alzheimer's disease risk. *Neurology*, 59(1), 59-66.

Lambert, J. C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., ... e Letenneur, L. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nature genetics*, 41(10), 1094.

Lammel, A. Hetzel, O. Hackel, I. Jones, B. Liss, J. Roeper. (2008). Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron*, 57, pp. 760–773.

Lane, R. M., Potkin, S. G., e Enz, A. (2006). Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 9(1), 101-124.

Lee, J. A., e Lupski, J. R. (2006). Genomic rearrangements and gene copy-number alterations as a cause of nervous system disorders. *Neuron*, 52(1), 103-121.

Letenneur, L., Commenges, D., Dartigues, J. F., e Barberger-Gateau, P. (1994). Incidence of dementia and Alzheimer's disease in elderly community residents of south-western France. *International Journal of Epidemiology*, 23(6), 1256-1261.

Love, J. E., Hayden, E. J., & Rohn, T. T. (2015). Alternative splicing in Alzheimer's disease. *Journal of Parkinson's disease and Alzheimer's disease*, 2(2).

Machado, J., Caram, C. L. B., Frank, A. A., Soares, E. D. A., e Laks, J. (2009). Estado nutricional na doença de Alzheimer. *Rev Assoc Med Bras*, 55(2), 188-91.

Maia, A. L. G., Godinho, C., Ferreira, E. D., Almeida, V., Schuh, A., Kaye, J., e Chaves, M. L. F. (2006). Aplicação da versão brasileira da Escala de Avaliação Clínica da Demência (Clinical Dementia Rating-CDR) em amostras de pacientes com demência. *Arq Neuropsiquiatr*, 64(2-B), 485-9.

Mandel, L., e Wolf, E. (1995). *Optical coherence and quantum optics*. Cambridge university press.

McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Kawas, C. H., ... e Mohs, R. C. (2011). 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. *Alzheimer's e dementia*, 7(3), 263-269.

McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., e Stadlan, E. M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease Report of the NINCDS-ADRDA Work Group* under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, 34(7), 939-939.

Montaño, M. B. M. M., e Ramos, L. R. (2005). Validade da versão em português da Clinical Dementia Rating. *Revista de Saúde Pública*, 39(6), 912-917.

Moreno-Castilla, P., Rodriguez-Duran, L. F., Guzman-Ramos, K., Barcenas-Femat, A., Escobar, M. L., e Bermudez-Rattoni, F. (2016). Dopaminergic neurotransmission dysfunction induced by amyloid- β transforms cortical long-term potentiation into long-term depression and produces memory impairment. *Neurobiology of aging*, 41, 187-199.

Morgan, B. P., e Gasque, P. (1996). Expression of complement in the brain: role in health and disease. *Immunology today*, 17(10), 461-466.

Nobili, A. et al. (2017). Dopamine neuronal loss contributes to memory and reward dysfunction in a model of Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* 8, 14727. doi: 10.1038/ncomms14727.

Pekny, M., Wilhelmsson, U., Bogestål, Y. R., e Pekna, M. (2007). The role of astrocytes and complement system in neural plasticity. *International review of neurobiology*, 82, 95-111.

Pena, S. D., Di Pietro, G., Fuchshuber-Moraes, M., Genro, J. P., Hutz, M. H., Kehdy, F. D. S. G., ... e de Moraes, M. E. A. (2011). The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PloS one*, 6(2), e17063.

Pimentel, MMG; Gallo, CVM; and Santos-Rebouças CB. (2013). *Genética Essencial*. Guanabara Koogan.

Raber, J. (2008). AR, apoE, and cognitive function. *Hormones and behavior*, 53(5), 706-715.

Risch, N., e Merikangas, K. (1996). The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*, 273(5281), 1516-1517.

Rogers, J., Li, R., Mastroeni, D., Grover, A., Leonard, B., Ahern, G., ... e Sabbagh, M. (2006). Peripheral clearance of amyloid β peptide by complement C3-dependent adherence to erythrocytes. *Neurobiology of aging*, 27(12), 1733-1739.

Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R., Izquierdo, I., Medina, J. H., e Cammarota, M. (2009). Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science*, 325(5943), 1017-1020.

Rovelet-Lecrux, A., Frebourg, T., Tuominen, H., Majamaa, K., Campion, D., e Remes, A. M. (2007). APP locus duplication in a Finnish family with dementia

and intracerebral haemorrhage. *Journal of Neurology, Neurosurgery e Psychiatry*, 78(10), 1158-1159.

Ruiz, M., Arias, I., Rolón, G., Hernández, E., Garavito, P., e Silvera-Redondo, C. (2016). Análisis del polimorfismo del gen APOE en la población de Barranquilla, Colombia. *Biomédica*, 36(1), 52-58.

Russo, S. J., e Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(9), 609-625.

Sá Cavalcanti, J. L., e Engelhardt, E. (2012). Aspectos da fisiopatologia da doença de Alzheimer esporádica. *Rev Bras Neurol*, 48(4), 21-29.

Schjeide, B. M. M., Schnack, C., Lambert, J. C., Lill, C. M., Kirchheiner, J., Tumani, H., ... e von Arnim, C. A. (2011). The role of clusterin, complement receptor 1, and phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein in Alzheimer disease risk and cerebrospinal fluid biomarker levels. *Archives of general psychiatry*, 68(2), 207-213.

Schrijvers, E. M., Koudstaal, P. J., Hofman, A., e Breteler, M. M. (2011). Plasma clusterin and the risk of Alzheimer disease. *Jama*, 305(13), 1322-1326.

Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, 741–766.

Sennvik, K., Fastbom, J., Blomberg, M., Wahlund, L. O., Winblad, B., e Benedikz, E. (2000). Levels of α -and β -secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neuroscience letters*, 278(3), 169-172.

Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., e Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 1(1), a006189.

Shiau, M. Y., Yu, L., Yuan, H. S., Lin, J. H., e Liu, C. K. (2006). Functional performance of Alzheimer's disease and vascular dementia in southern Taiwan. *The Kaohsiung journal of medical sciences*, 22(9), 437-446.

Slegers, K., Brouwers, N., Gijssels, I., Theuns, J., Goossens, D., Wauters, J., ... e Van Broeckhoven, C. (2006). APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy. *Brain*, 129(11), 2977-2983.

Slegers, K., Lambert, J. C., Bertram, L., Cruts, M., Amouyel, P., e Van Broeckhoven, C. (2010). The pursuit of susceptibility genes for Alzheimer's disease: progress and prospects. *Trends in Genetics*, 26(2), 84-93.

Slooter, A. J., Cruts, M., Kalmijn, S., Hofman, A., Breteler, M. M., Van Broeckhoven, C., e van Duijn, C. M. (1998). Risk estimates of dementia by apolipoprotein E genotypes from a population-based incidence study: the Rotterdam Study. *Archives of neurology*, 55(7), 964-968.

Sonnenschein E., L. S., Bertram, L., e Visser, P. J. (2012). Relationship between genetic risk factors and markers for Alzheimer's disease pathology. *Biomarkers in medicine*, 6(4), 477-495.

Stern, Y. (2012). Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. *Lancet Neurology*, 11(11), 1006–1012.

Stern, Y., Albert, S., Tang, M. X., & Tsai, W. Y. (1999). Rate of memory decline in AD is related to education and occupation cognitive reserve?. *Neurology*, 53(9), 1942-1942.

Stern, Y., Alexander, G. E., Prohovnik, I., & Mayeux, R. (1992). Inverse relationship between education and parietotemporal perfusion deficit in Alzheimer's disease. *Annals of neurology*, 32(3), 371-375.

Stern, Y., Alexander, G. E., Prohovnik, I., Stricks, L., Link, B., Lennon, M. C., & Mayeux, R. (1995). Relationship between lifetime occupation and parietal flow Implications for a reserve against Alzheimer's disease pathology. *Neurology*, 45(1), 55-60.

Stern, Y., Gurland, B., Tatemichi, T. K., Tang, M. X., Wilder, D., e Mayeux, R. (1994). Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *Jama*, 271(13), 1004-1010.

Storga, D., Vrecko, K., Birkmayer, J. G. D., e Reibnegger, G. (1996). Monoaminergic neurotransmitters, their precursors and metabolites in brains of Alzheimer patients. *Neuroscience letters*, 203(1), 29-32.

Strachan, A.T. Read. *Genética molecular humana* (4ª ed.) Artmed, Porto Alegre (2012)

Talmelli, L. F. D. S., Gratão, A. C. M., Kusumota, L., e Rodrigues, R. A. P. (2010). Nível de independência funcional e déficit cognitivo em idosos com doença de Alzheimer. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 44(4), 933-939.

Thomsen, T., Zendej, B., Fischer, J. P., e Kewitz, H. (1991). In vitro effects of various cholinesterase inhibitors on acetyl- and butyrylcholinesterase of healthy volunteers. *Biochemical pharmacology*, 41(1), 139-141.

Tilvis, R. S., Strandberg, T. E., e Juva, K. (1998). Apolipoprotein E phenotypes, dementia and mortality in a prospective population sample. *Journal of the American Geriatrics Society*, 46(6), 712-715.

Tosto, G., e Reitz, C. (2013). Genome-wide association studies in Alzheimer's disease: a review. *Current neurology and neuroscience reports*, 13(10), 381.

Tycko, B., Feng, L., Nguyen, L., Francis, A., Hays, A., Chung, W. Y., ... e Mayeux, R. (1996). Polymorphisms in the human apolipoprotein-J/clusterin gene: ethnic variation and distribution in Alzheimer's disease. *Human genetics*, 98(4), 430-436.

Van Cauwenberghe, C., Van Broeckhoven, C., e Sleegers, K. (2015). The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genetics in Medicine*, 18(5), 421-430.

Viegas, F. P., Simões, M. C. R., da Rocha, M. D., Castelli, M. R., Moreira, M. S., e Viegas Jr, C. (2011). Doença de Alzheimer: caracterização, evolução e implicações do processo neuroinflamatório. *Revista Virtual de Química*, 3(4), 286-306.

Wei Xu, Tan, L., e Yu, J. T. (2015). The role of PICALM in Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology*, 52(1), 399-413.

Wilson, M. R., Yerbury, J. J., e Poon, S. (2008). Potential roles of abundant extracellular chaperones in the control of amyloid formation and toxicity. *Molecular Biosystems*, 4(1), 42-52.

Wimo, A., e Prince, M. (2010). *World Alzheimer Report 2010; The Global Economic Impact of Dementia*. 2010. London, Alzheimer's Disease International, 99.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *World Report on Ageing and Health*. Geneva. 2015

Xiang, P. Y., Janc, O., Grochowska, K. M., Kreutz, M. R., e Reymann, K. G. (2016). Dopamine agonists rescue A β -induced LTP impairment by Src-family tyrosine kinases. *Neurobiology of aging*, 40, 98-102.

Yang, Y., Chung, E. K., Wu, Y. L., Savelli, S. L., Nagaraja, H. N., Zhou, B., ... e Blanchong, C. A. (2007). Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans. *The American Journal of Human Genetics*, 80(6), 1037-1054.

Yudofsky, S. C., Hales, R. E., Gabbard, G. O. (2011). *Essentials of psychiatry*. American Psychiatric Pub.

Zhang, Y., Liu, Z. e Du, Y. (2004). *Association between Apolipoprotein E gene polymorphism and Vascular dementia and Alzheimer's disease*. *Shandong Med J.* 22, 1-2.

Anexo A



Duque de Caxias, 16 de Abril de 2015.

Do: Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO

Para Responsáveis Principais: Prof. Dr. Pedro Hermán Cabello Acero
 Profa. Dra. Danielle Dutra Voigt
 Profa. Dra. Verônica Marques Zembrzuski
 Profa. Dra. Viviane Galante Ramos

O Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO, após avaliação considerou **aprovado** o projeto de pesquisa **“GENÉTICA DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS NO ENVELHECIMENTO”**, protocolado sob o número de CAEE 43112214.0.0000.5283, encontrando-se a referida pesquisa e o Termo de consentimento Livre e Esclarecido em conformidade com a Resolução N.º 466, de 12 de Dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

Os pesquisadores deverão informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética em Pesquisa solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa, conforme cronograma apresentado, encaminhe a este comitê um sumário dos resultados do projeto, a fim de que seja expedido o certificado de aprovação final.


 Prof. Renato C. Zambrotti
 Coordenador do CEP-UNIGRANRIO


 Andreia Peter Christo Gomes
 Secretária do CEP/UNIGRANRIO

CEP/UNIGRANRIO – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA da UNIGRANRIO
 Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160 – 25 de Agosto – Duque de Caxias – CEP: 25071-202
 Tel.: 21 2672-7733 – E-mail: rzambrotti@unigranrio.com.br

Anexo B



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa – *Análise de Fatores Genéticos Envolvidos no Desenvolvimento de Doenças Neurodegenerativas durante o Processo de Envelhecimento*, no caso de você concordar em participar, favor assinar ao final do documento.

Sua participação não é obrigatória, e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador(a) ou com a instituição.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e endereço do pesquisador(a) principal, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação.

Título da pesquisa: *Análise de Fatores Genéticos Envolvidos no Desenvolvimento de Doenças Neurodegenerativas durante o Processo de Envelhecimento.*

Pesquisador(a) responsável: Dr. Pedro Hernán Cabello

Endereço: LabGen - Laboratório de Genética Humana/Escola de Ciências da Saúde / Universidade do Grande Rio – Bloco F – Rua José de Souza Herdy 1160, Duque de Caxias, RJ; CEP 25071-202; Telefone: (21) 2672-7881; Email: phca01@gmail.com

Objetivos: 1) Este projeto se propõe estudar fatores genéticos que possam estar influenciando o desenvolvimento de doenças próprias da população idosa como são aquelas relacionadas à perda de memória, tremor, depressão e demência.

2) Pretende-se ainda, estudar fatores que modulem o risco de desenvolver tais doenças.

3) Compreender a forma de atuação de todos esses fatores de maneira a identificar a doença de maneira precoce que permita adotar os tratamentos e cuidados médicos mais adequados para atenuar ou diminuir esses riscos.

Procedimentos do estudo: Após a leitura e assinatura do termo de consentimento para a participação da pesquisa serão coletadas amostras de 5 ml de sangue total e utilizadas para posterior extração de DNA, podendo ser solicitada uma segunda coleta, caso o material não seja suficiente ou sofra algum tipo de alteração (coagulação, hemólise), **sem que isto acarrete nenhum prejuízo ou risco para a saúde do paciente, exceto aqueles relacionados com um pequeno desconforto comum à retirada rotineira de sangue, que será realizada por pessoal previamente treinado.**

O material biológico coletado (sangue) será encaminhado ao LabGen (Laboratório de Genética Humana da UNIGRANRIO para o estudo molecular. Serão respeitadas as normas vigentes para Pesquisa em Seres Humanos segundo a resolução do Ministério da Saúde 196/96, especialmente relevantes aos estudos de caráter genético.

Custo/Reembolso para o participante: A participação nesta pesquisa não envolverá custo adicional com sua participação. As consultas, exames, tratamentos serão totalmente gratuitos, não recebendo nenhuma cobrança com o que será realizado. Você também não receberá nenhum pagamento com a sua participação.

Confidencialidade da pesquisa: O sigilo e a confidencialidade das informações obtidas pelo estudo serão preservados. A identidade dos participantes não será revelada, pois cada amostra de material biológico fará parte de um banco de dados identificados por códigos específicos. Os resultados, normais ou alterados, serão entregues a cada participante e serão utilizados com fins científicos, podendo ser publicados em revistas científicas. Os indivíduos que se opuserem a ingressar no projeto, ou que quiserem se retirar do mesmo, não sofrerão nenhum tipo de penalidade referente ao seu atendimento clínico, acesso a tratamentos disponíveis, ou acesso a qualquer outro tipo de atividade assistencial e/ou de pesquisa que por ventura possam existir no futuro.

Dr. Pedro H. Cabello
Pesquisador Responsável
Tel.: (21) 2672-7881
Email: phca01@gmail.com

Eu, _____, declaro que li as informações contidas nesse documento, fui devidamente informado(a) pelos procedimentos que serão utilizados, riscos e desconfortos, benefícios, custo/reembolso dos participantes, confidencialidade da pesquisa, concordando ainda em participar da pesquisa.

Foi-me garantido que posso retirar o consentimento a qualquer momento, sem qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento. Declaro ainda que recebi uma cópia desse Termo de Consentimento.

Poderei consultar o pesquisador responsável (acima identificado), a quem poderei contatar a qualquer momento que julgar necessário através do telefone 3865-8213 ou e-mail phca01@gmail.com sempre que entender necessário obter informações ou esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa e minha participação no mesmo.

Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados.

LOCAL E DATA:

NOME E ASSINATURA DO VOLUNTÁRIO:

(Nome por extenso)

(Assinatura)

Anexo B

AVALIAÇÃO CLÍNICA DA DEMÊNCIA - Registro Clinical Dementia Rating (CDR)

Esta é uma entrevista semi-estruturada. Por favor, faça todas as perguntas. Faça qualquer pergunta adicional necessária para permitir determinar o **CDR** do indivíduo. Por favor, anote todas as informações adicionais criadas para as questões.

QUESTÕES DE MEMÓRIA PARA O INFORMANTE:

		Sim	Não
1. Ele/ela tem problemas de memória ou raciocínio?			
a. Se sim, estes são persistentes (constantes, contínuos)?			
2. É capaz de lembrar uma lista curta (de compras)?	Geralmente	Às vezes	Raramente
3. Tem notado perda de memória no último ano?		Sim	Não
4. É capaz de lembrar acontecimentos recentes?	Geralmente	Às vezes	Raramente
5. A perda de memória interfere com as atividades diárias que o doente era capaz de realizar há uns anos atrás?		Sim	Não
6. Esquece completamente um evento mais importante em poucas semanas? (como viagem, aniversário, visita)	Geralmente	Às vezes	Raramente
7. Esquece detalhes significativos de um evento mais importante?	Geralmente	Às vezes	Raramente
8. Esquece completamente informação importante do passado? (data de nascimento, casamento, emprego...)	Geralmente	Às vezes	Raramente

9. Conte-me algum acontecimento que tenha ocorrido recentemente (último mês) um pouco diferente do habitual (passeio, viagem ou festa,...). (Para ser testado depois, obtenha detalhes como local do evento, momento do dia, participantes, quanto durou, quando terminou, e como o sujeito e outros participantes chegaram lá) (**Obs.:** obtenha este relato na ausência do paciente).

10. Data de nascimento:

11. Local de nascimento:

12. Última escola que frequentou?

Nome:

Local:

Nível de escolaridade:

13. Qual foi a principal ocupação/profissão do doente? (ou do cônjuge)

14. Qual foi o último emprego? (ou do cônjuge)

15. Quando se aposentou (ou o cônjuge) e porquê?

QUESTÕES DE ORIENTAÇÃO PARA O INFORMANTE

Com que frequência sabe corretamente:

1. Dia do mês

Geralmente	Algumas vezes	Raramente	NS
------------	---------------	-----------	----

2. Mês

Geralmente	Algumas vezes	Raramente	NS
------------	---------------	-----------	----

3. Ano

Geralmente	Algumas vezes	Raramente	NS
------------	---------------	-----------	----

4. Dia da semana

Geralmente	Algumas vezes	Raramente	NS
------------	---------------	-----------	----

5. Tem dificuldade com as relações temporais (em situar os acontecimentos no tempo uns em relação aos outros)?

Geralmente	Algumas vezes	Raramente	NS
------------	---------------	-----------	----

6. Consegue orientar-se em ruas familiares?

Geralmente	Algumas vezes	Raramente	NS
------------	---------------	-----------	----

7. Consegue orientar-se fora da sua vizinhança?

Geralmente	Algumas vezes	Raramente	NS
------------	---------------	-----------	----

8. Consegue orientar-se dentro de casa?

Geralmente	Algumas vezes	Raramente	NS
------------	---------------	-----------	----

Obs: NS – informante não tem condições de responder (não sabe)

QUESTÕES DE JULGAMENTO E SOLUÇÃO DE PROBLEMAS PARA O INFORMANTE:

1. Como considera a capacidade atual do doente para resolver problemas?

	Como sempre
	Boa, mas não tanto como anteriormente

	Suficiente
	Má
	Sem qualquer capacidade

2. E a capacidade para lidar com pequenas somas de dinheiro (trocos, gorjetas...)?

	Sem perda
	Perda moderada
	Perda grave

3. E a capacidade para lidar com assuntos financeiros mais complexos (pagar contas, usar talão de cheques..)?

	Sem perda
	Perda moderada
	Perda grave

4. Como lida com um acidente em casa? (pequeno incêndio, cano furado...)

	Tão bem quanto antes
	Pior do que antes, devido às alterações de memória e pensamento
	Pior do que antes, devido a outras razões – quais:

5. Compreende as situações e o que lhe é explicado?

	Geralmente
	Algumas vezes
	Raramente
	NS

6. Comporta-se adequadamente (da maneira como costumava ser normalmente) nas situações sociais e na interação com os outros?

	Geralmente
	Algumas vezes
	Raramente
	NS

Questões de Atividades na Comunidade* para o Informante:

OCUPAÇÃO

1. Ainda trabalha?	SIM	NÃO	Não aplicável
2. Se não, as alterações de memória interferiram na decisão de se aposentar?			

SIM	NÃO	Não aplicável	
3. Se sim, tem dificuldades devido às alterações de memória ou de raciocínio?			
Geralmente	Algumas vezes	Raramente	Não aplicável

ATIVIDADE SOCIAL

4. Alguma vez dirigiu automóvel? (ou outro veíco	SIM	NÃO	Não aplicável
Se sim, ainda dirige?	SIM	NÃO	Não aplicável
Se não dirige, é devido às alterações de memória ou raciocínio?	SIM	NÃO	Não aplicável
5. Se ainda dirige, há problemas ou risco por causa das alterações de memória ou raciocínio?			
SIM	NÃO	Não aplicável	

6. É capaz de fazer suas compras sozinho (a)?

Raramente ou nunca – precisa de ajuda em qualquer compra
Algumas vezes – compra algumas coisas, mas traz duplo ou esquece outros
Geralmente
NS

7. É capaz de realizar, de forma independente, alguma atividade fora de casa?

Raramente ou nunca – precisa de ajuda em qualquer atividade
Algumas vezes – limitada e/ou de rotina (participação na igreja, ida ao cabeleireiro..)
Geralmente
NS

8. É levado(a) a atividades sociais fora da casa da família?

SIM	NÃO
-----	-----

Se não, porque?

9. Um observador ocasional perceberia que se trata de uma pessoa doente por causa do comportamento?	SIM	NÃO
10. Se institucionalizado, participa de atividades sociais?	SIM	NÃO

Atividades na comunidade: ir à igreja, visitar amigos ou familiares, atividades políticas, organizações profissionais, associações recreativas, voluntariado, programas educativos.

NS – informante não tem condições de responder (não sabe)

IMPORTANTE:

Há informação disponível suficiente para graduar o nível de comprometimento nas atividades na comunidade? Se não, por favor, explore mais.

*Por favor, adicione notas se necessário para esclarecer o nível de funcionamento nesta área.

QUESTÕES SOBRE LAR E LAZER (CASA E PASSATEMPOS) PARA O INFORMANTE:

1.a. Tendo em mente apenas a perda cognitiva, que mudanças ocorreram no desempenho das atividades domésticas?

1.b. Que tarefas ainda consegue realizar corretamente?

2.a. Tendo em mente apenas a perda cognitiva, que mudanças ocorreram na realização de seus passatempos (hobbies)?

2.b. Que passatempos ainda consegue realizar corretamente?

3. Se institucionalizado, que atividades domésticas e passatempos ainda consegue realizar corretamente?

ATIVIDADES DO DIA-A-DIA

4. Capacidade para realizar tarefas domésticas?

<input type="checkbox"/>	Sem perda
<input type="checkbox"/>	Perda moderada
<input type="checkbox"/>	Perda grave

5. A que nível é capaz de realizar tarefas domésticas simples e rotineiras:

a. sem atividade significativa (executa atividades simples, como fazer a cama, mas com muita supervisão)

b. limite a algumas tarefas simples (com alguma supervisão lava louça, põe a mesa ...)

c. independente em algumas atividades (usa eletrodomésticos como aspirador de pó, televisão, prepara refeições simples)

d. executa todas as tarefas, mas com algumas falhas

e. executa todas as tarefas, como sempre

<input type="checkbox"/>

QUESTÕES SOBRE CUIDADOS PESSOAIS PARA O INFORMANTE:

A. VESTIR

a. Normal sem ajuda	0
b. Pequena ajuda, ocasional/botões mal colocados	1
c. Sequência errada e com esquecimento de peças	2
d. Incapaz de se vestir	3

B. HIGIENE E APARÊNCIA

a. Normal sem ajuda	0
b. Tem que se chamar a atenção	1
c. Algumas vezes necessita ajuda	2
d. Ajuda sempre ou quase sempre	3

C. ALIMENTAÇÃO

a. Limpo, utiliza corretamente os utensílios	0
b. Suja tudo e utiliza apenas a colher	1
c. Sem ajuda só consegue comer sólidos simples	2
d. Precisa ser alimentado	3

D. CONTROLE ESFINCTERIANO

a. Normal, controle total	0
b. Ocasionalmente, urina na cama	1
c. Frequentemente, urina na cama	2
d. Totalmente incontinente	3

MEMÓRIA - QUESTIONÁRIO PARA O PACIENTE

1. Tem problemas de memória ou de raciocínio?

SIM	NÃO
-----	-----

2. Há pouco o seu (marido, mulher...) me contou um acontecimento importante que ocorreu recentemente, com o Sr(a). Poderia me contar o que aconteceu? (incentivar que sejam referidos detalhes como datas, local, pessoas envolvidas, etc.) [se necessário identifique o acontecimento]

Correto	Parcialmente correto	Incorreto
---------	----------------------	-----------

3. Vou lhe dizer o nome e o endereço de uma pessoa - procure decorar, pois vou lhe pedir para repetir mais adiante. Espere eu lhe terminar, então pode repetir (até o máximo de 3 vezes – assinale os elementos repetidos corretamente).

Itens	1	2	3	4	5
	Maria	da Silva	Rua da Praia	54	Centro
	Maria	da Silva	Rua da Praia	54	Centro
	Maria	da Silva	Rua da Praia	54	Centro

Obs.: sublinhe os elementos repetidos corretamente em cada tentativa

4. Qual a sua data de nascimento?

5. Onde nasceu?

6. Qual o nome do colégio que estudou por último?

Nome: _____

Lugar: _____

Grau: _____

7. Pode repetir o nome e endereço que lhe disse agora há pouco?

Itens	1	2	3	4	5
	Maria	da Silva	Rua da Praia	54	Centro

Itens corretos: _____

ORIENTAÇÃO - QUESTIONÁRIO PARA O PACIENTE

Que dia é hoje?

Qual é o dia da semana?

Em que mês estamos?

E o ano?

Que lugar é este aqui?

Qual o nome desta cidade?

Sem olhar para o relógio, sabe me dizer que horas são agora? (aceitar \pm 1 hora) Hora verdadeira: _____

Hora referida pelo sujeito: _____

O sujeito sabe quem é o informante (em seu julgamento)?

Correto	Incorreto

JUÍZO CRÍTICO E SOLUÇÃO DE PROBLEMAS - QUESTIONÁRIO PARA O PACIENTE

INSTRUÇÕES: Se a primeira resposta do paciente não merecer pontuação máxima, insistir até compreender bem qual a capacidade do doente na compreensão do problema. Pontue a resposta mais aproximada.

SEMELHANÇAS

Se eu lhe perguntar qual a semelhança entre uma banana e uma laranja, uma resposta certa é dizer que as duas são frutas. Diga-me agora em que são semelhantes (parecidos)

1. Cachorro e Leão

Animais, mamíferos, carnívoros, (qualquer elemento abstrato – categoria)
 Resposta concreta (têm 4 patas, rabo, pêlo..)
 Resposta errada ou sem sentido, ou não sabe

0
1
2

2. Mesa e Cadeira

Mobília, móveis
 Resposta concreta (de madeira, com pés, servem para a cozinha, etc.)
 Resposta errada ou sem sentido, ou não sabe

0
1
2

DIFERENÇAS

Se eu lhe perguntar qual a diferença entre uma colher e uma pá, uma resposta certa é dizer que a colher é um utensílio para pegar alimentos e a pá para tirar ou botar terra/areia, abrir um buraco no chão, etc. Diga-me agora em que são diferentes.....

1. Açúcar e vinagre

Doce e ácido/azedo
 Concreto (um para colocar no café e outro na salada...)
 Errado ou sem sentido, ou não sabe

0
1
2

2. Roubo e engano

Intencional e não intencional
 Só explica um
 Errado ou sem sentido, ou não sabe

0
1
2

CÁLCULOS

3. Quantas moedas de 50 centavos são necessárias para R\$ 2,00?

4. Quantas notas de R\$ 5,00 são necessárias para ter uma nota R\$20?

5. Subtraia 3 de 20 e siga subtraindo 3 a partir de cada resultado:
20 – 17 – 14 – 11 – 8 – 5 – 2

Correto	Incorreto

CRÍTICA

6. Se chegasse numa cidade desconhecida e quisesse localizar um amigo, como faria?

- Consultava lista telefônica, telefonava para um conhecido em comum
- Telefonava para a polícia
- Resposta sem sentido ou não sabe

0
1
2

7. O que faria se visse fumaça saindo da janela de seu vizinho?

- Chamava os bombeiros, avisava as pessoas e/ou ajudava
- Dá apenas uma alternativa correta

0
1

c. Resposta sem sentido ou não sabe

2

8. Autocrítica: Porque veio ao médico? Qual é seu estado de saúde? etc... (insight)

Bom:

Razoável:

Ruim:

DESENHO DO RELÓGIO

Pedir para desenhar um relógio redondo, colocar todas as horas e os ponteiros e marcar a hora 2:45.

Pontuação:

0 – Mau desenho não reconhecível ou distorção grosseira

1 – Suficiente relógio deve conter um dos seguintes: face aproximadamente circular, números de 1 a 12

2 – Bom relógio deve conter 2 dos seguintes: face circular, números de 1 a 12, números simétricos

3 – Excelente representação perfeita ou quase perfeita