

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SARITHA SUELLEN LOPES DA SILVA

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS DO GENE *COX7A2L* ASSOCIADOS À DOENÇA DE
ALZHEIMER**

**CURITIBA
2015**

SARITHA SUELLEN LOPES DA SILVA



ESTUDO DE POLIMORFISMOS DO GENE COX7A2L ASSOCIADOS À DOENÇA DE ALZHEIMER

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Lehtonen
Rodrigues de Souza

Co-Orientadora: Dra. Cristiane Benincá

**CURITIBA
2015**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais Doroti e Sebastião, que caminharam junto comigo e me auxiliaram em toda esta jornada, sem me deixar desistir, juntamente com meus irmãos Adriano e Karina; foram meu porto seguro nesta caminhada.

Aos meus grandes amigos do curso, que cresceram junto comigo nestes cinco anos e aos novos que fui criando ao longo deste tempo, Rafael, Bianca, Amanda, Luciana Gama, Rui Cesar. São pessoas que aprendi a amar, com eles cresci não só profissionalmente, mas como pessoa também. Junto deles os amigos que correram comigo nos últimos momentos de curso, Alini, Bárbara, Bianca e Henrique.

Aos meus amigos de longa data, por vários tropeços neste caminho, Érica, Daniel, Josilene e Juliana. Aos meus amigos e irmãos da TMG, André, Bremo, Dédallo, Jader, Jéssica, Karen, Luiz Henrique e Mayara. Ao NPS que me ajudou em vários momentos em que eu precisei.

Ao meu orientador Ricardo Lehtonen, por todo trabalho desenvolvido neste tempo, por ter aceitado este novo projeto em mãos. À Cristiane Benincá, que além de grande orientadora se tornou grande amiga.

Aos amigos do laboratório de polimorfismos e ligação; todos foram essenciais para mim, se tornaram não só companheiros de trabalho, mas grandes amigos; agradeço muito por ter conhecido pessoas como vocês e por ter participado de um laboratório igual a este. Aos estagiários da UNIBRASIL.

Ao meu grande amigo e namorado, por ter aguentado principalmente os últimos momentos de correria e surtos.

So Long, and Thanks for All the Fish!

Douglas Adams

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação tradicional do transporte de elétrons pelos quatro complexos da cadeia respiratória e a ATP sintase, ou complexo V indicado pela seta..16
- Figura 2. A e B modelos aceitos atualmente. Em C, modelo proposto atualmente. Mostrando a diferença entre os modelos propostos para explicar a organização do sistema OXPHOS.17
- Figura 3. Sequência dos éxons codificadores do gene COX7A2L.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4. Comprovação da amplificação de DNA.....**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 5. Padrões de bandas após a coloração de prata da região de COX2...29
- Figura 6. Padrões de bandas após a coloração de prata da região de COX3..29
- Figura 7. Padrões de bandas após a coloração de prata da região de COX4..29
- Figura 8. Histograma de distribuição de idades...30
- Figura 9. Amostras escolhidas para sequenciamento segundo padrões de bandas obtidos.....32
- Figura 10. Alinhamento gerado pelo programa DNAbaser, indicando o que é cada sequência de nucleotídeos pelas flechas pretas, a troca de base e os picos de DNA detectados pelo retângulo vermelho.....34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes TKM1..... **Erro! Indicador não definido.**

Nenhuma entrada de índice de ilustrações foi encontrada.Tabela 3. Reagentes

TE..... **Erro! Indicador não definido.**

Nenhuma entrada de índice de ilustrações foi encontrada.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Doença de Alzheimer.....	13
2.2 Metabolismo Mitocondrial	15
2.2.2 Gene COX7A2L	18
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivos Gerais	20
3.2 Metas	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Coleta de Sangue e Extração de DNA.....	21
4.1.1 Reagentes e soluções para a extração de DNA	22

4.2	Quantificação e Diluição de DNA.....	24
4.3	Amplificação do DNA e Eletroforese.....	Erro! Indicador não definido.
4.4	Polimorfismo de Conformação de Fita Simples	25
4.4.1	Coloração com Nitrato de Prata	26
4.5	Sequenciamento de DNA.....	Erro! Indicador não definido.
4.6	Análise de dados.....	Erro! Indicador não definido.
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6.	CONCLUSÃO	36
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA), demência neurodegenerativa de maior ocorrência na população mundial, caracteriza-se pela perda de memória seguida de disfunções cognitivas. Sendo uma demência complexa, apresenta atualmente duas Hipóteses possíveis. De acordo com a Hipótese da Cascata Amilóide, o acúmulo de proteínas β -amilóide eleva a toxicidade, rompe a homeostase do cálcio e induz estresse oxidativo promovendo a disfunção mitocondrial. Já a Hipótese da Cascata Mitocondrial, propõe que esta disfunção geraria espécies reativas de oxigênio (EROs) acumulando mutações no DNA mitocondrial (DNAm) aumentando progressivamente sua disfunção. Um novo mecanismo para modulação da cadeia respiratória mitocondrial foi proposto com a descoberta do gene nuclear *COX7A2L* (2p21) como responsável por codificar uma proteína chaperona que ajuda na montagem de supercomplexos (SC) mitocondriais (respirossoma e SC CIII+CIV). Sabendo que alterações na formação de SC pode contribuir na Hipótese da Cascata Mitocondrial, o presente estudo propõe identificar polimorfismos existentes no gene *COX7A2L* associados a DA. Utilizaram-se amostras de pacientes com DA do Hospital das Clínicas da UFPR e do Instituto de Neurologia de Curitiba e amostras

de idosos saudáveis como controle (CI). Foram utilizados três pares de primers para os éxons 2, 3 e 4 e eletroforese em gel de poliacrilamida SSCP para a identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP). Para todos os exons foram apresentados padrões diferentes de bandas, COX2 (exon 2) com dois padrões, com diferença significativa entre DA e e uma amostra CI, e o outro padrão em apenas um CI. Em COX4 (exon 4), apenas CI ($p=0,0001$). Em COX3 (exon 3) três padrões foram observados, sendo um dos padrões encontrado em uma amostra DA um CI apresentou padrão diferente. Uma amostra de COX2 que apresentou o padrão menos frequente e as amostras com diferentes padrões de COX3 e COX4 foram sequenciadas. Obtivemos resultado apenas de COX4, encontrando um SNP já descrito (*rs79591809*), de baixa frequência. Concluímos que pode haver associação com DA no éxon 2, porém precisamos sequenciar novamente as amostras de COX2. Para COX3 também deve-se repetir o sequenciamento para identificação de polimorfismo, porém não há associação e para COX4 encontramos um SNP, mas também não há associação.

Palavras-chave: COX7A2L, Doença de Alzheimer, OXPHOS

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is characterized by loss of memory and cognitive dysfunction and the neurodegenerative dementia with highest incidence in the world population. As a complex dementia, there are two possible hypotheses to explain it, the first one is the Amyloid Cascade Hypothesis is the main theory for the pathophysiology, in which the accumulation of β -amyloid protein increases toxicity leading to breakage of calcium homeostasis and promoting oxidative stress inducing mitochondrial dysfunction. However the second one, the Mitochondrial Cascade Hypothesis proposes that this dysfunction would generate reactive oxygen species (ROS), accumulating mutations in the mitochondrial DNA (mtDNA) that will progressively increase organelle dysfunction. A new mechanism for modulating the mitochondrial respiratory chain was proposed recently with the discovery of the nuclear gene COX7A2L (2p21) as the responsible for encoding a chaperone protein that contribute in supercomplexes (SC) assembly (respirosome and SC CIII/CIV). Changes in SC assembly and regulation may contribute to the mitochondrial cascade

hypothesis; so this study intends to identify existing polymorphisms in COX7A2L gene associated with AD. Samples from patients with DA from *Hospital das Clínicas UFPR* and the *Instituto de Neurologia de Curitiba* and healthy elderly as control (CI) were collected and total DNA extracted. Three pairs of primers for exon 2, 3 and 4 were designed and fragments were PCR amplified and visualized by polyacrylamide gel electrophoresis (SSCP) to identify single nucleotide polymorphisms (SNP). Different band patterns were observed for all the exons analyzed. COX2 (exon 2) presented two patterns with different distribution between AD and CI ($p = 0.0001$). COX3 (exon 3) showed three patterns, but only one sample from DA and CI was observed for one pattern and one sample from CI with the other. For COX4 (exon 4) only one CI showed a different pattern. Samples from COX2 with the least frequent pattern and samples with different patterns from COX3 and COX4 were sequenced. Until this moment, only the sequencing of COX4 gave us trustable results, finding a SNP already described of low frequency (rs79591809). With these results, we can conclude that an association with AD is possible for an unidentified SNP in exon 2. For COX3 no association with AD was observed for the SSCP pattern of bands, but new sequencing of these samples are needed. A SNP was identified in COX4, but there is no association with AD.

Keyword: Alzheimer's Disease, COX7A2L, OXPHOS.

1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento da expectativa de vida resultando em um aumento da população idosa mundial, cresce o número de indivíduos portadores de doenças neurodegenerativas como as demências. Mesmo podendo atingir qualquer grupo de idade, elas estão mais presentes na população idosa. As demências são caracterizadas pelo declínio da memória associado ao déficit de outra função cognitiva como linguagem, capacidade viso-espacial ou funções executivas, com intensidade suficiente para interferir no desempenho social ou profissional do indivíduo e ocorrendo de forma progressiva, acarretando a perda de autonomia (CARAMELLI; BARBOSA, 2002).

Segundo a *WORLD HEALTH ORGANIZATION* (2012), cerca de 1 milhão de pessoas em 2010 apresentavam algum tipo de demência no Brasil. A Doença de Alzheimer (DA) e a Demência Vascular são responsáveis por 90% dos casos de demência (AZ, 2015). De acordo com a *Alzheimer's Disease International Consortium* (2015), apresentam alguma forma de demência 1 a cada 6 pessoas com mais de 80 anos e 1 em cada 20 pessoas acima de 65 anos. Há uma projeção de que em 2030, 66 milhões de pessoas apresentarão alguma forma de demência, aumentando para 115 milhões em 2050 (BETTENS et. al, 2013).

Como principal teoria para explicar a fisiopatologia da DA, foi elaborada a Hipótese da Cascata Amilóide, de acordo com a qual ocorre o acúmulo de proteína β -amilóide. Estas proteínas colaboram para que se eleve a toxicidade neuronal, que leva a quebra da homeostase do cálcio, indução de estresse oxidativo e consequentemente a disfunção mitocondrial (GEMELLI, 2013; SWERDLOW; BURNS; KHAN, 2014). Há estudos indicando que os radicais livres, produtor pelo estresse oxidativo, também podem estar envolvidos no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, sendo estes responsáveis por causar danos às células neuronais levando á apoptose (BARBOSA et. al, 2006).

Existem várias origens para a produção de radicais livres como por infecções crônicas, pois o sistema imune, especificamente os macrófagos, destroem células infectadas por atividade de metabólitos oxidativos; a partir de peroxissomas

degradando algumas moléculas e produzindo peróxido de hidrogênio. Neste caso a principal origem dos radicais livres é a partir do escape de elétrons oriundos da cadeia respiratória mitocondrial envolvendo o complexo da Coenzima Q (PÔRTO, 2001; SCHNEIDER; DE OLIVEIRA, 2004).

O cérebro é um órgão que requer alta quantidade de oxigênio e de energia, produzida principalmente pela cadeia respiratória mitocondrial, consumindo aproximadamente 20% do total de O₂ de um adulto em repouso (PÔRTO, 2001).

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas essenciais para o controle de vários mecanismos celulares e geração de energia em forma de ATP. Em várias doenças neurodegenerativas são encontradas desordens no funcionamento mitocondrial, como Síndrome de Leigh, Parkinson e Huntington, entre outras (REDDY & BEAL, 2005). De acordo com MOREIRA et al., (2010) a literatura nos mostra a importância da disfunção mitocondrial e do estresse oxidativo na patologia da DA precoce, além de haver indicações de que o estresse oxidativo também ocorre previamente em sintomas da DA tardia, em que danos oxidativos são encontrados nas regiões cerebrais afetadas pela demência, e também periféricamente.

Uma nova hipótese têm sido proposta para a DA tardia, a Hipótese de Cascata Mitocondrial, sugerindo que a atividade de transporte na cadeia de elétrons diminui e a quantidade de estresse oxidativo aumenta. Essa hipótese consiste em três principais sugestões, envolvendo principalmente as espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pela cadeia transportadora de elétrons. A hipótese propõe que a disfunção mitocondrial causa danos ao transporte de elétrons, o que geraria EROs que levariam ao acúmulo de mutações no DNAm, aumentando progressivamente sua disfunção (SWERDLOW; KHAN, 2004).

Recentemente, foi proposto um novo mecanismo para modulação da cadeia respiratória mitocondrial e nestes estudos, a partir de análises proteômicas, foi descoberto o gene nuclear *COX7A2L* (2p21) como responsável por codificar uma proteína chaperona que auxilia na montagem e funcionamento de supercomplexos (SC) mitocondriais (respirossoma CI+CIII+CIV e SC CIII+CIV) (LAPUENTE-BRUN et al., 2013). Mutações neste gene poderiam ocasionar uma mudança na conformação

destes supercomplexos, dificultando o transporte de elétrons e ocasionando o mau funcionamento da mitocôndria. Ocorrendo tal pressuposto, espera-se que esses fatores sejam contribuintes de risco para a DA.

A partir da problemática apresentada, o objetivo principal do presente trabalho é investigar presença de polimorfismos no gene *COX7A2L*, posteriormente verificando se há relação como fator de risco ou fator de proteção à DA, através de um estudo de associação entre controles idosos e pacientes diagnosticados com a DA.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) foi inicialmente caracterizada em 1906 pelo neurologista alemão Alois Alzheimer (1864-1915), sendo hoje a demência neurodegenerativa mais frequente em pessoas idosas, seguida por Corpos de Levi e Demência Vascular. Segundo Reitz et. al, (2011), a DA representa em média 70% dos casos de demência no mundo. O declínio das funções cognitivas e neuropsicológicas ocorre de maneira progressiva, com a formação de neuritos distróficos associados ao tecido neurofibrilar e às placas neuríticas (WILTFANG et al., 2001; BOCHE; NICOLL, 2010). Os sintomas apresentados pela DA são decorrentes de certas disfunções celulares no cérebro, além de alterações moleculares (HOLANDA et al., 2009). É caracterizada anatomicamente principalmente, pelo acúmulo de proteínas beta-amilóide ($A\beta$) depositados extracelularmente na forma de placas neuríticas, chamadas então de placas senis, e pela formação de emaranhados neurofibrilares decorrentes da hiperfosforilação da proteína tau (BRAAK; BRAAK, 1991; CHAUHAN; CHAUHAN, 2006). As principais áreas do cérebro que estão envolvidas neste processo degenerativo são o córtex entorrinal e o hipocampo. Todos estes processos moleculares alterados, interferem na neurogênese, reduzem e levam à morte neuronal de maneira progressiva, o que leva a uma atrofia cortical e um aumento no tamanho dos ventrículos, sendo bem evidentes em estágios de DA mais avançados (HOLANDA, et. al., 2009).

Conforme a degeneração progride nas regiões cerebrais, há acentuação do declínio de muitas funções, e aparecem os sintomas de comprometimento progressivo de domínios cognitivos. Normalmente este declínio começa a aparecer no envelhecimento, por volta dos 65 anos de idade, no entanto, pode aparecer também mais cedo, sendo classificada a DA com início precoce, que acomete pessoas com menos de 65 anos com frequência de incidência entre 1% a 5%; sendo que o outro grupo com DA mais comum (início tardio), ocorre em idosos com 65 anos ou mais, e é responsável por aproximadamente 95% dos casos, conhecida também como DA esporádica (REITZ; MAYEUX, 2014).

O grupo com início precoce, normalmente possui uma velocidade de progressão maior e segue um padrão de herança mendeliana, autossômica dominante, sendo que o principal gene envolvido neste caso é o gene codificador da proteína precursora amilóide *APP*, localizado no cromossomo 21. Outros genes também contribuem para a doença, que são as presinilinas *PSEN1* e *PSEN2* localizados nos cromossomos 14 e 1, respectivamente, que são proteínas envolvidas na formação de beta-amilóide e quando mutados levam à agregação dessa proteína e formação de placas senis, característica da DA (REITZ; MAYEUX, 2014). Já na DA esporádica, ou tardia, um dos principais riscos genéticos identificados é o alelo $\epsilon 4$ do gene *APOE*, localizado no cromossomo 19, precursor da proteína Apolipoproteína E (COON, 2007). Recentemente, outros genes, como a Butirilcolinesterase (*BCHE*) vem demonstrando seu papel no desenvolvimento da DA, já que esta enzima atua na via colinérgica. Uma das características da DA é a perda generalizada dos neurônios colinérgicos e redução do neurotransmissor acetilcolina (Ach) levando a uma disfunção colinérgica; por isso, os principais tratamentos para a doença são os inibidores colinérgicos, fármacos que não interrompem ou reverterem a progressão da DA, apenas melhoram alguns sintomas (SIMÃO-SILVA, 2014).

O envelhecimento se encontra como um dos principais fatores de risco para a DA, sendo influenciado principalmente por fatores ambientais; este processo ocorre devido a danos e falhas que ocorrem nas células, que acontece de forma progressiva devido ao acúmulo de mudanças metabólicas e ao estresse oxidativo (MATTSON; CHAN; DUAN, 2002). Ou seja, além dos fatores genéticos, há fatores ambientais que também estão associados como fatores de risco na DA, como doença cerebrovascular, hipertensão, diabetes do tipo dois, obesidade, altos níveis de lipídios no plasma, síndrome metabólica, tabagismo, muitos destes casos envolvidos principalmente com maior geração de estresse oxidativo nas células. São conhecidos também alguns fatores que atuam de forma protetiva contra DA como, uma boa dieta, chamada de dieta do mediterrâneo, atividade física diária e uma boa atividade intelectual (REITZ; MAYEUX, 2014).

2.2 Metabolismo Mitocondrial

A mitocôndria apresenta importantes funções no metabolismo celular, como apoptose e a homeostase de cálcio, sendo sua principal função a produção de energia em forma de ATP (metabolismo energético). A ATP é gerada pela ATP sintase a partir de um gradiente de prótons H^+ providos a partir do transporte de elétrons entre quatro complexos localizados na membrana interna da mitocôndria, conhecida como crista, sendo eles denominados, NADH: ubiquinona- oxidoredutase (Complexo I) que é o principal ponto de entrada de elétrons provenientes da oxidação de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide*); succinato: ubiquinona- oxidoredutase (Complexo II) onde ocorre a oxidação de succinato a fumarato e oxidação de dinucleotídeo de flavina e adenina (FADH do inglês *Flavin adenine dinucleotide*), essa enzima também participa do ciclo de Krebs, ou ciclo do ácido cítrico; ubiquinol- citocromo C-oxidoredutase (Complexo III) e citocromo C-oxidase (Complexo IV) (SEELERT et al., 2009). Estes complexos formam a cadeia respiratória mitocondrial (Figura 1), que unidos aos transportadores de elétrons coenzima Q e citocromo C e à ATP sintase (também chamada de Complexo V), formam o sistema de fosforilação oxidativa (OXPHOS), que é o mecanismo final de todas as vias metabólicas aeróbias de produção de energia (FERREIRA; AGUIAR; VILARINHO, 2008).

Todo o processo de OXPHOS produz aproximadamente 80% da ATP utilizada no organismo, sendo que alguns órgãos, como o cérebro, demandam um alto consumo energético, portanto qualquer alteração nesse sistema poderá causar grandes danos a este tecido (BRUN, 2012).

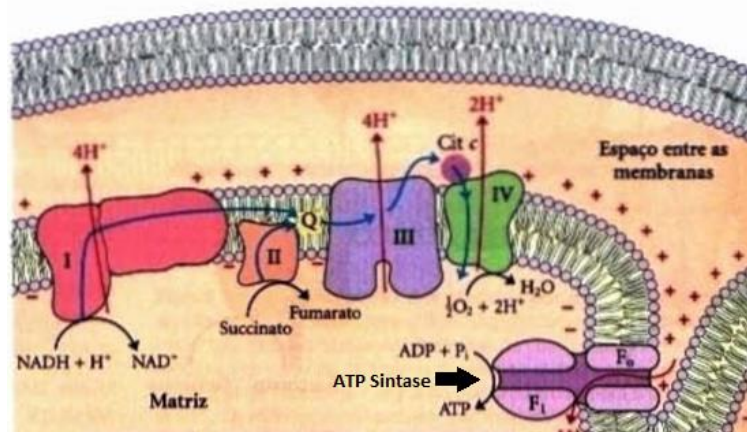


Figura 1. Representação tradicional do transporte de elétrons pelos quatro complexos da cadeia respiratória e a ATP sintase, ou complexo V indicado pela seta. (Adaptação de LEHNINGER, 2002).

Existem dois modelos propostos para a organização do sistema OXPHOS, sendo estes o “modelo sólido”, onde o transporte de elétrons deve seguir uma sequência ordenada, que vai do complexo I ao IV e os complexos são unidos entre si, e o “modelo fluido” que propõe que há a livre passagem dos elétrons entre os complexos, sendo que estes são independentes entre si (ACIN-PEREZ et. al, 2008).

Novos estudos indicam que o transporte de elétrons não pode ser explicado por estes modelos clássicos, havendo então uma nova proposta de reformulação (Figura 2), surgindo o “modelo de plasticidade” onde se sugere a formação de supercomplexos (SCs), ou seja, os complexos (I-IV) unidos entre si (I+III+IV, I+III e III+IV) permitindo uma melhor transferência de elétrons e uma possível diminuição de EROs (LAPUENTE-BRUN, 2012).

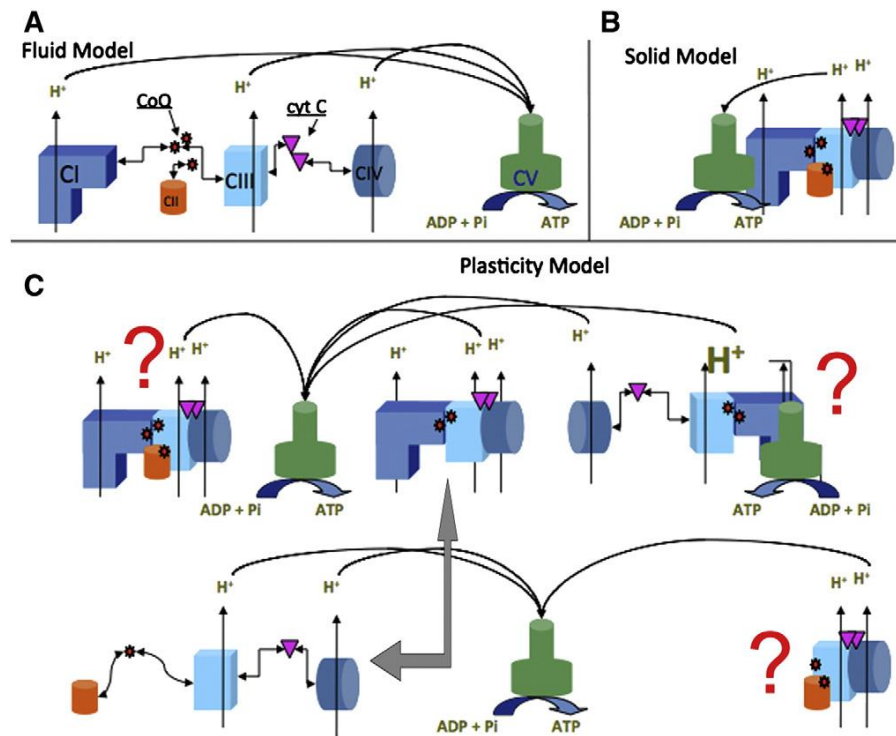


Figura 2. A e B modelos clássicos. Em C, modelo para explicar a organização do sistema OXPHOS proposto atualmente. (Fonte: ACIN-PEREZ; ENRIQUEZ, 2014)

Estes mesmos estudos têm mostrado evidências de como funcionam estes SCs, como eles interagem entre si e a estabilidade de cada complexo para um eficiente fluxo de elétrons, indicando que o Complexo I, é bastante instável e muito dependente do complexo III pois estes complexos, junto com o CIV utilizam como substrato NADH (ACIN-PEREZ et. al, 2004).

No Complexo IV, há subunidades que são codificadas por genes mitocondriais e outras subunidades que são codificadas por genes nucleares. Segundo SWERDLOW; KHAN, (2004), proteínas que afetem o transporte de elétrons da cadeia respiratória, podem influenciar na produção de EROS, ou seja, mutações que surjam nestes genes podem encadear deficiências neste complexo, comprometendo a respiração mitocondrial. Isto ocorre por exemplo na Síndrome de Leigh, causada por uma mutação no gene nuclear *SURF1* (IKEDA et al., 2013). Recentemente LAPUENTE-BRUN et al., 2013 investigando a interação do supercomplexo I+III+IV, conhecido também como respirossoma, encontrou a proteína citocromo c oxidase subunidade VIIa polipeptídeo *2-like* como parte

fundamental deste SC, sugerindo a importância do gene (*COX7A2L*) que a codifica para a formação e funcionamento deste SC.

2.2.1 Gene *COX7A2L*

O Citocromo C oxidase (COX) é um dos componentes finais da cadeia respiratória mitocondrial, tendo o oxigênio como receptor final de elétrons. O COX é composto de diferentes subunidades que são codificadas tanto por genes mitocondriais como genes nucleares que regulam como este complexo se molda. Ao total são 13 subunidades, três das maiores delas são codificadas por genes mitocondriais e as outras 10 por genes nucleares (KADENBACH et al., 1983).

O gene nuclear *COX7A2L* (*cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 like*), também conhecido como *COX7RP*, está localizado no braço curto do cromossomo 2 (2p21), possui quatro éxons, sendo que apenas três deles possuem regiões codificadoras (Figura 3). Codifica uma proteína chaperona do interior da membrana mitocondrial e é regulador das subunidades de COX, sendo sua presença necessária para a formação de SCs estabelecendo a interação entre os complexos III e IV (ACIN-PEREZ; ENRIQUEZ, 2014).

Não há muitos estudos com este gene, porém sabe-se que sua proteína é expressa em todos os tecidos e também está hiper-regulado em células de câncer de mama (WATANABE, 1998). IKEDA e colaboradores, (2013), realizaram comparações entre os camundongos *wild type* (WT) e camundongos *knockout* para *COX7A2L*. Os camundongos *knockout* apresentaram fraqueza muscular devido à atividade respiratória mitocondrial reduzida e a menor produção de ATP, consolidando ainda mais a ideia de que este gene deve ser essencial para o bom funcionamento mitocondrial. Além disso, sabe-se também que sua expressão é reduzida em camundongos modelos para o estudo da DA, porém seus mecanismos precisam ser melhor estudados (REDDY, 2004; SILVA et al., 2013).

GGAAC TTCATATTTCTACAGA C TCCGCCACAGCGACTTTGCGTGCTCTCTTAGAGCT GG
 TTTTGCCTTTTCGTGGTCTGAGAACCCTGGCTTTTGGTTCCCAATGCGGC TTAAGTGTG
 CAGGTTTTAAGTTAGGC CATCTTCGGGCAGCCCTAGTCCCAGCACCGGGTCTTTGCGCTG
 AGTCTCGGGACCACAGCCGG GAGGCGGGGTCTTCTCTGGGG CGTTCG CGTTG CAGCG
 GA TGC GGAAGC CG GACT CTGGGC ET CATG TACTACAA G TTTAGT GG CTTTAC C CAGAAG
 TTGGC A GG A GCATGGGCTTCGGAGGC CTATAGCCC SCAG

Éxon 2

gtacgagtgggcgctggccagctcg.....gccattttccttttttctctacag

G GATTAAAGCCTGT GGT TTCCACAGAA C CACCA CCT ATCATATTTGCCACACCAA CTAAA
 CT GACCTCC GATTCC ACA GTGTATGATTAT C TGGGAAA ACA AAGTTCCAGAGCTACAA
 AAGTTTTCCAG

Éxon 3

gtgaggggaagataactctacaacaga.....gcccttggttaattcttgctttcaag

AAAGCTGATGGTGTGC CCG TCTACCTGAAAC GAGGCCTGCCTGAC CAA ATGCTTTACCGG
 ACCACCATGG C GCTGACTGTGGGAGGGAC CATCTACTGCCTGATCGCCCTCTACATGGCT
 TC CAGCCCAA AAC AATGAGTTAGGCTGCA GAGG ACT GT TTGTTTTTGGCATAAAC
 CCTTTGAAGTTCCTTTTTTCATTGTTAAATTA AA TTTTTTTTTT TACTTGGATGGCTTAA
 CTTTTTGAAGAAAAATAGGAAGATATGAAGATGATGTT TTG CTTTGTATGAAATGC
 A TATGGCTT C CAGAGCT C ATTCGACAGTTAAAGCCATTGTTTAAAG AAA TGGTGC TTTG
 CTCT C GTTTGTGCTCCTGATTTCCCTGGAGGTTCTGGATGAAGGCTGAACACAGGCTTG
 TTAATGTC AG TCTGTGCTGAGGACCT CAGGGACTTGAGGTTGCATTTTTGAGCATGGGGT

Éxon 4

Figura 3. Sequência dos éxons codificadores do gene *COX7A2L*. Regiões apresentadas em roxo são regiões não codificadoras dos éxons; regiões em azul, são regiões codificadoras e regiões em cinza representam uma pequena parte da sequência dos íntrons. Destacados em amarelo indicam mutações de sentido trocado codificando assim outro aminoácido, destacados em verde indicam mutações sinônimas, destacados em vermelho indicam mutações que codificam um códon de parada e em rosa indica deleção de um códon. Os destaques em azul indicam mutações nas regiões não codificadoras (Fonte: EMBL, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar se há a presença de variantes já identificadas e eventualmente outras não descritas nos três éxons com regiões codificantes do gene *COX7A2L* nas amostras investigadas, e posteriormente verificando se há relação como fator de risco ou fator de proteção à Doença de Alzheimer (DA) por meio de um estudo de associação entre controles idosos com pacientes diagnosticados com (DA).

3.2 Metas

1. Genotipar os três éxons do gene *COX7A2L* por PCR-SSCP, procurando identificar variantes.
2. Sequenciamento de amostras que apresentarem variação no padrão eletroforético para sua identificação.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Coleta de sangue e extração de DNA

A coleta de sangue foi realizada em pacientes idosos do Ambulatório de Disfunção Cognitiva do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Curitiba) e do Ambulatório de Desordens de Memória e do Comportamento do Instituto de Neurologia de Curitiba já diagnosticados com a demência a partir de testes de rastreio.

O grupo controle foram feitas coletas em idosos acompanhantes de pacientes, no Centro Desportivo da UFPR (Curitiba), e na Igreja Adventista do 7º dia (Curitiba), todos os participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, autorizando a participação na pesquisa. Todos os indivíduos fizeram teste de rastreio Mini-Exame do Estado Mental (MEEM), que avalia a função cognitiva global do indivíduo.

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da instituição onde o estudo foi realizado (protocolo de aprovação: 1192.117.11.08).

O procedimento de coleta foi realizado em tubos a vácuo com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), por punção intravenosa.

A extração de DNA foi realizada pelo procedimento de *salting out*, no Laboratório de Polimorfismos e Ligação do Departamento de Genética da UFPR. Neste processo há a separação de uma camada de leucócitos, que é a utilizada para a extração. Esta camada de leucócitos foi submetida a diversos reagentes e soluções químicas com o objetivo de lisar as células, precipitar e desnaturar as proteínas para obtenção do DNA genômico e então armazenados em microtubos (adaptado da técnica do NONIDET P-40, modificado por LAHIRI & NURNBERGER, 1991).

4.1.1 Reagentes e soluções para extração de DNA

1. Tampões

O tampão TKM1 é preparado conforme a tabela 1, a preparação do tampão TKM2 pode ser vista na tabela 2 e o tampão TE na tabela 3.

Tabela 1. Reagentes para TKM1

Tris-HCl – pH 7,6	1M	5 mL
KCl	1M	5 mL
MgCl ₂	1M	5 mL
EDTA – pH 7,6	0,1M	10 mL
Água Destilada		475 mL
Volume Total		500 mL

Tabela 2. Reagentes para TKM2

Tris-HCl – pH 7,6	1M	0,5 mL
KCl	1M	0,5 mL
MgCl ₂	1M	0,5 mL
EDTA – pH 7,6	0,1M	1 mL
NaCl	1M	20 mL
Água Destilada		27,5 mL
Volume Total		50 mL

Tabela 3. Reagentes para TE

Tris-HCl – pH 8,0	1M	0,5 mL
EDTA – pH 8,0	0,1M	0,5 mL
Água Destilada		49 mL
Volume Total		50 mL

2. IGEPAL CA-630

3. SDS 10%

4. NaCl

5. Etanol

Procedimento:

1- Coletar 10 mL de sangue em EDTA. Centrifugar a 2500 rpm por 15 minutos. Retirar o plasma e separar a camada de leucócitos. Quando o material for congelado

por algum tempo antes da extração, estocar a camada de leucócitos com alguns mL de hemácias. Colocar os leucócitos com parte das hemácias, em um tubo de centrifugação, completar para 10mL com tampão TKM1.

2- Adicionar 125 μ L de Igepal (Sigma) para lisar as células. Misturar por inversão várias vezes.

3- Centrifugar a 2500 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente.

4- Desprezar o sobrenadante, e completar novamente para 10 mL com TKM1. Destruir o precipitado com uma pipeta pasteur e passar no vortex. Centrifugar novamente como no item anterior. Quando for sangue congelado repetir esse item mais uma vez.

5- Ressuspender o precipitado em 0,8 mL de tampão TKM2 e transferi-lo para um tubo de microcentrífuga (1,5 mL) com uma micropipeta.

6- Adicionar 100 μ L de SDS a 10%, misturar a suspensão, com uma pipeta, várias vezes e incubar por 2 horas em banho-maria a 55°C, podendo ficar por cerca de 12 horas.

7- Adicionar 0,30 mL de NaCl 6M e misturar bem.

8- Centrifugar a 12000 rpm por 20 minutos, em uma microcentrífuga.

9- Salvar o sobrenadante, que contém o DNA, passando-o para um tubo de ensaio e descartar o precipitado de proteínas.

10- Adicionar ao sobrenadante 2 volumes de etanol 100%, gelado, e inverter o tubo várias vezes até precipitar o DNA.

11- Remover o DNA precipitado para um tubo de microcentrífuga e lavar o DNA com etanol 70%, gelado. Dispensar o etanol e colocar o tubo aberto na estufa a 37°C até evaporar o resto de etanol.

12- Ressuspender o DNA em 200 μ L de tampão TE.

13- Levar ao banho-maria a 55° C por 1 hora, podendo ficar até 3 dias para que ocorra a solubilização, depois deixar na geladeira por mais 3 dias antes de congelar.

4.2 Quantificação e diluição de DNA

Após serem realizadas as extrações de DNA, as amostras foram quantificadas no Nonodrop®, pelo método de espectrofotometria de absorção no ultravioleta (EUV).

Após as quantificações, foram feitas as diluições em água ultra pura, deionizada (Milli-Q, *Millipore Corporation*) de acordo com cada concentração obtida, para uma concentração de 100 ng/μL de DNA.

4.3 Amplificação do DNA e Eletroforese

A amplificação foi realizada pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para três conjuntos de primers escolhidos para a região codificante do gene *COX7A2L*, denominados COX2, região do éxon 2; COX3, região do éxon 3 e COX4 região do éxon 4.

COX2: Primer *Forward*: CCCAATGCGGCTTAAGTGTG Tm: 59.8

Primer *Reverse*: CCACTTCTCATGTCCGAGC Tm: 58.3

Tamanho do Fragmento: 278 pb

COX3: Primer *Forward*: CAGACAGCCTCCTCAGACATACT Tm: 61.19

Primer *Reverse*: GAAGGAGGGTGGGTAGTAACTAGA Tm: 60.81

Tamanho do Fragmento: 291 pb

COX4: Primer *Forward*: TTCTTCTCAACCATGCCCTTGT Tm: 60.16

Primer *Reverse*: GGAACTTCAAAGGGTTTATGCCAA Tm: 59.96

Tamanho do Fragmento: 232 pb

Foram usados microtubos de 0,2 mL, cada tudo contendo 7 μL de água Milli-Q autoclavada, 1 μL de cada primer (10 μM), 10 μL de mastermix Platinum Taq (Invitrogen) e 1 μL de amostra (100 ng), resultando em um volume total de 20μL. Os

parâmetros para a PCR (Tabela 4) foram otimizados a partir das temperaturas de anelamento ($\pm 5^{\circ}\text{C}$ abaixo da T_m dos primers).

Tabela 4. Etapas da PCR

Etapa	Temperatura	Tempo	
<i>Hot Start</i>	95°C	2 minutos	
Desnaturação	95°C	30 segundos	
Anelamento	55°C ou 56°C	30 segundos	30 vezes
Extensão	72°C	30 segundos	
Extensão Final	72°C	10 minutos	

Em seguida, realiza-se a corrida horizontal em gel de agarose (1%) por eletroforese a 100 V por 50 minutos, para verificar se houve amplificação de DNA das amostras.

4.4 Polimorfismo de conformação de fita simples

Após a corrida em gel de agarose realizada para verificar as amostras que amplificaram DNA, utiliza-se tais amostras para realizar eletroforese SSCP (do inglês *Single Strand Conformation Polymorphism*) em gel de poliacrilamida, utilizado para identificar polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*). Neste método o DNA amplificado é desnaturado em fita simples, formando duas bandas no gel, este forma uma estrutura secundária com uma conformação única. Quando uma única base desta fita se modifica, essa conformação também se modifica, sendo possível sua visualização, pois as conformações mudam sua mobilidade no gel (ORITA et al., 1989), portanto neste caso, espera-se que se houver a presença de alguma variante, apareça padrões de bandas diferentes devido à diferente migração.

Para a técnica são utilizados 12 μL do produto amplificado da PCR aos quais são adicionados 8 μL de corante (95% de formamida, 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol, 10 mM de EDTA e 10 mM de NaOH). As amostras com corante são então aquecidas a 95°C por 10 minutos e em seguida são resfriadas em banho de gelo, sendo então, aplicadas no gel.

Foram utilizados para os fragmentos de COX2 e COX4 géis de poliacrilamida à 8% e para COX3 à 9% em TBE (solução estoque de poliacrilamida, 29 g de acrilamida, 1 g de bisacrilamida, 5 mL de glicerol completados até 100 mL com água bidestilada).

A corrida eletroforética foi realizada a 250 V, 35 mA (para placas de 20x20cm e 0.8mm de espessura) por 5h30.

4.4.1 Coloração com Nitrato de Prata

Após a corrida, o gel é corado por nitrato de prata. Para isso é feita fixação do gel em 1% HNO₃ por 3 min em agitação, impregnação da prata (0.2% AgNO₃) de 30 a 40 minutos sempre em agitação, lavagem duas vezes com H₂O destilada e por último é realizada a revelação do gel com 3% Na₂CO₃ com 0.3% formaldeído até verificar o aparecimento de bandas, então novamente lavagem duas vezes com H₂O destilada para realizar a fixação com 10% ácido acético por 3 minutos (Este último passo não é obrigatório, não interferindo na leitura do gel) (BUDOWLE et al., 1991).

4.5 Sequenciamento de DNA

O método utilizado para a realização do sequenciamento das amostras de DNA escolhidas foi o de Sanger. Utilizando sequenciador automático de DNA, modelo ABI-377, pela reação de “Big Dye Terminator Cycle Kit”.

As análises do sequenciamento realizadas pelo programa DNAbaser disponível em <http://www.dnabaser.com/> e pelo BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>; submetidas a um alinhamento de sistema BLAST, para comparação da sequência com a disponível no banco de dados da NCBI.

4.6 Análise de Dados

As frequências alélicas e genotípicas foram obtidas por contagem direta de quantidade de amostras que apresentarem diferentes padrões no gel SSCP, e então analisadas por Teste de Qui-quadrado (χ^2), através do programa CLUMP, adotando-se um nível de significância de 5%.

Para testar a normalidade da distribuição das idades, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. As comparações entre as médias foram realizadas pelo teste Teste de Mann-Whitney, para variáveis não paramétricas, utilizando o programa R (R Development Core Team, 2008)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados alguns testes com diferentes temperaturas para determinar qual seria a temperatura ideal de anelamento para cada par de primers. Na figura 4 é possível ver as amplificações para cada par de primer. O par de primers COX2 amplificou à uma temperatura de 56° os outros dois pares de primers, COX3 e COX4 amplificaram a uma temperatura de 55°C.

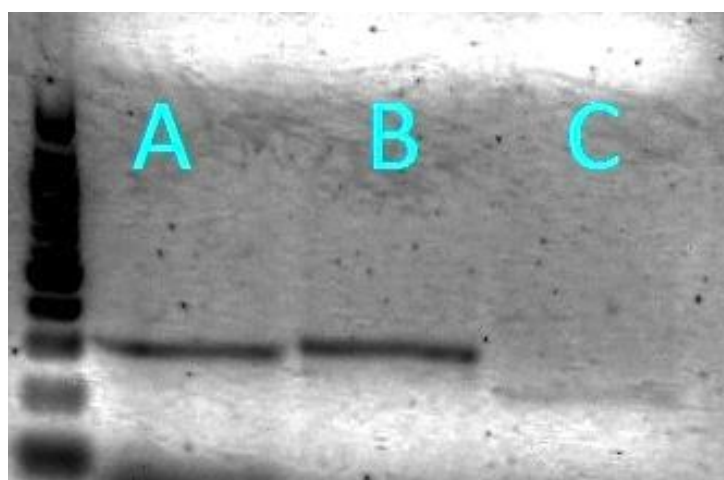


Figura 4. Comprovação da amplificação de DNA. Primeiro poço do gel com marcador de peso de 100 pb. A) COX2 com 278 pb, B) COX3 com 291 pb e C) COX4 com 232 pb.

Foram amplificados para COX2 um total de 87 amostras de controle idoso (CI) e 118 de DA, para o COX3 87 amostras de CI e 71 de DA e para o COX4 97 amostras de CI e 105 DA, todas amplificações comprovadas por eletroforese em gel de agarose de 1%.

Após as comprovações de amplificação, realizou-se eletroforese SSCP em gel de poliacrilamida para a identificação de variantes. Quando padrões diferentes de bandas eletroforéticas são verificados no gel pode haver diferença na sequência amplificada das amostras.

Para as três regiões foram encontrados padrões diferentes de bandas. COX2 e COX4 apresentaram dois padrões diferentes e COX3 apresentou três, indicando

possíveis variantes. Os padrões observados nos géis de SSCP, são apresentados nas figuras a seguir (5, 6 e 7).

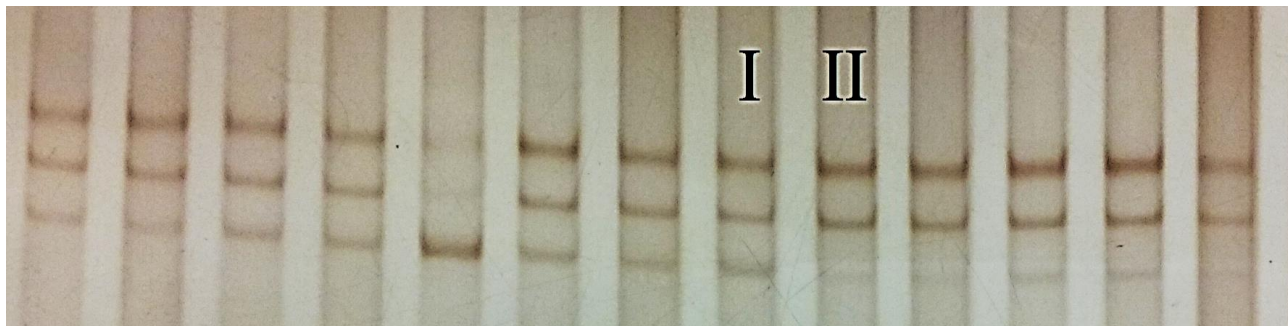


Figura 5. Padrões de bandas após a coloração de prata da região de COX2. Indicando dois padrões diferentes representados por I e II. O padrão II é referente ao homozigoto usual e o padrão I é referente ao heterozigoto para uma variante.



Figura 6. Padrões de bandas após a coloração de prata da região de COX3. Indicando três padrões diferentes representados por I, II e III. O padrão I é referente ao homozigoto usual e os padrões II e III são referentes a dois heterozigotos para variantes diferentes.



Figura 7. Padrões de bandas após a coloração de prata da região de COX4. Indicando dois padrões diferentes representados por I e II. O padrão I é referente ao homozigoto usual e o padrão II é referente ao heterozigoto para uma variante

A idade, tanto em amostras de pacientes quanto em controles idosos, não apresentou distribuição normal ($p=0,002$ e $p=0,018$, respectivamente; figura 8). Isto pode se dar ao fato de que foram selecionadas amostras de uma porção delimitada

da população, de idosos. Comparando as médias das idades entre pacientes e controles encontrou-se diferença significativa ($p=0,0004$). Essa diferença possivelmente se deve ao fato de existir uma grande dificuldade em encontrar controles idosos com idade mais avançada como os pacientes, pois nessa idade muitos já apresentam alguma disfunção cognitiva, impossibilitando a sua inclusão no grupo controle.

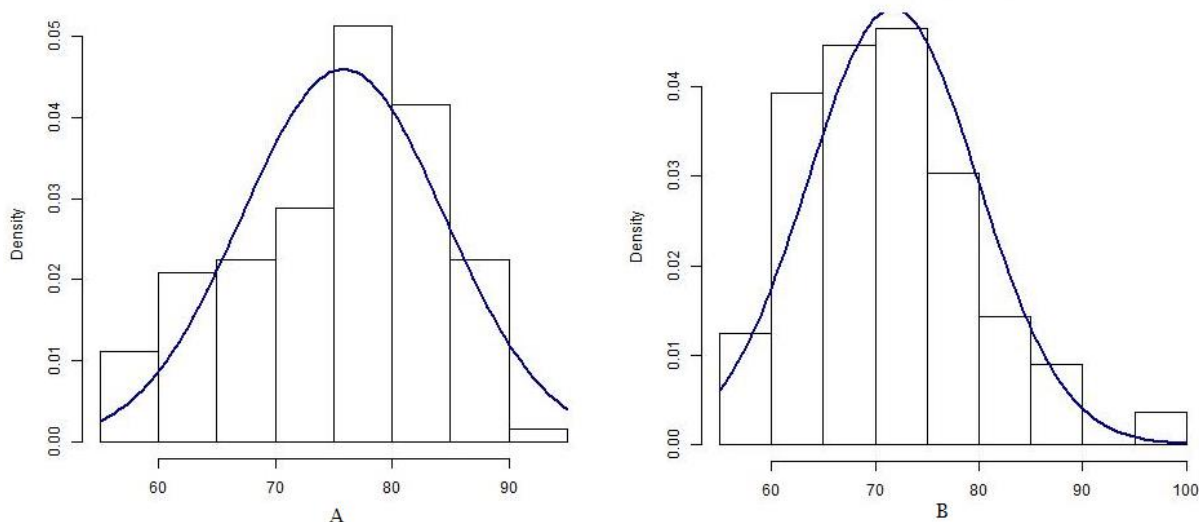


Figura 8. Histograma de distribuição de idades. A) Pacientes com DA e B) Controles. A curva em azul representa a distribuição normal esperada.

Foi realizada contagem direta para analisar as frequências dos padrões de bandas que foram apresentados anteriormente em pacientes DA e CI. Comparando a frequência de padrões obtidos pacientes com os controles foi encontrada diferença significativa ($\chi^2= 6,65$ e $p=0,001$), salientando que para o segundo padrão a proporção de controles que o apresenta é quase o dobro (Tabela 5).

Devido a esses resultados, uma vez também que nossos controles não se apresentam em uma distribuição normal da variável idade, foi realizada uma análise da frequência desta mutação entre os controles, comparando indivíduos que estivessem acima e abaixo da mediana.

Considerando o grupo com idade abaixo da mediana, 19 controles apresentaram o padrão heterozigoto de bandas. Já entre o grupo com idade acima da mediana 10 indivíduos apresentaram este mesmo padrão. A comparação entre

as frequências (frequência de padrões obtidos abaixo x acima da mediana de idade) demonstrou que há homogeneidade da frequência desta mutação entre os controles ($\chi^2 = 2,64$, $p=0,10$). Esses resultados nos mostram que se comprovado um SNP nessa região, pode estar atuando de forma protetiva para a DA, já que é distribuído de forma homogênea e mais frequente no grupo controle.

Tabela 5. Dados obtidos após a análise dos dados da primeira região (COX2). DA = Doença de Alzheimer, CI= Controle Idoso, n= Número Absoluto.

	DA (n=119)		CI (n=87)		χ^2	p
	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)		
COX2						
Homozigoto	99	83%	59	68%	6,65	0,001
Heterozigoto	20	17%	28	32%		

Já, para COX3 não se verificou diferença entre as frequências de padrões obtidos, pois dentre 70 pacientes, apenas um apresentou padrão de banda diferente (Indicado como II na figura 6), todos os outros apresentam o padrão de banda I. Para controles, de 87 indivíduos, apenas 1 mostrou o segundo padrão de banda e 1 mostrou o terceiro (Tabela 6).

Tabela 6. Dados obtidos após a análise dos dados da segunda região (COX3). DA = Doença de Alzheimer, CI= Controle Idoso, n= Número Absoluto.

	DA (n=70)		CI (n=87)	
	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)
COX3				
Homozigoto	69	99%	85	98%
Heterozigoto (II)	1	1%	1	1%
Heterozigoto (III)	0		1	1%

Na última região, COX4 também não se encontrou diferença entre as frequências de padrões, já que, de 202 indivíduos, sendo 104 pacientes e 97 controles (Tabela 7), apenas um indivíduo controle apresentou padrão diferente de banda (indicado como II na figura 7).

Tabela 7. Dados obtidos após a análise dos dados da terceira região (COX4). DA = Doença de Alzheimer, CI= Controle Idoso, n= Número Absoluto.

	DA (n=104)		CI (n=97)	
	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)
COX4				
Homozigoto	104	100%	96	99%
Heterozigoto	0		1	1%

Como para as três regiões foram encontrados diferentes padrões de bandas eletroforéticas, foi importante seguir com o sequenciamento de algumas amostras para a confirmação e identificação destas variantes.

Foi realizado o sequenciamento de cinco amostras escolhidas, uma do COX2, três do COX3 e uma do COX4, mostradas a seguir na figura 9, que apresentaram diferentes padrões de bandas. Um controle idoso (CIHC22) foi escolhido de COX2, dois controles idosos (CIHC110 e CIHC113) e um paciente (AHC24) foram escolhidos para COX3 e o único controle (CIHC110) que apresentou padrão diferente de banda em COX4 foi sequenciado.

Mesmo que as regiões de COX3 e COX4 não tenham apresentado associação, o sequenciamento é importante para verificar se há alguma variante já descrita na literatura ou identificar novas variantes.

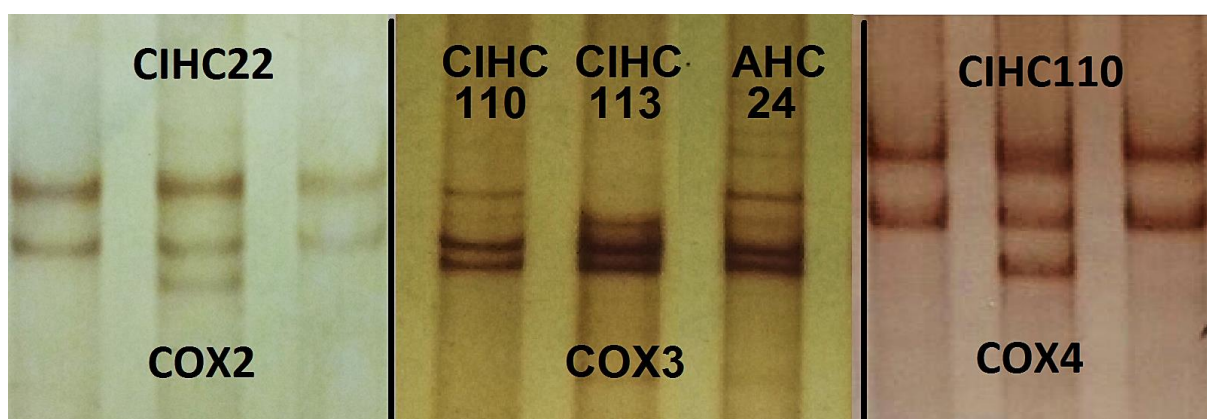


Figura 9. Amostras escolhidas para sequenciamento segundo padrões de bandas obtidos.

Das cinco amostras que foram sequenciadas, apenas a CIHC 110 para COX4 saiu em boas condições. Para as outras amostras, foi possível a leitura de uma das fitas apenas e ainda assim a qualidade não foi muito boa. Apareceram alguns possíveis SNPs, porém a qualidade da leitura do sequenciamento impossibilita qualquer conclusão.

Após o sequenciamento para a amostra de COX4, foi verificada uma substituição entre purinas, onde uma Adenina substituiu uma Guanina (G>A), caracterizando um indivíduo heterozigoto. Essa modificação está localizada na posição 382 do mRNA, sendo uma mutação sinônima que codifica um aminoácido serina. É um SNP já descrito na literatura, *rs79591809* e, com frequência populacional A muito baixa (0,05%) (MCVEAN et al., 2012). A tabela 8 expõe as frequências alélicas e genotípicas nas populações mundiais, mesmo com número amostral variável, mostra como este alelo se dispõe na população mundial.

Tabela 8. Frequências alélicas e genotípicas do *rs79591809* encontrado em diferentes populações mundiais.

<i>rs79591809</i>	N	Frequência alélica		Frequência Genotípica		
		G	A	GG	GA	AA
Mundial	2524	0,995	0,005	0,990	0,009	0,000
Africana	661	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000
Americana	347	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000
Leste Asiático	504	0,976	0,024	0,954	0,044	0,002
Européia	503	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000
Sul Asiático	489	0,999	0,001	0,998	0,002	0,000

Fonte: 1000 *genomes*.

A partir destas frequências, nota-se que só se encontrou este alelo em populações asiáticas. Interessante observar que a amostra sequenciada é de um indivíduo de origem japonesa, corroborando com a literatura de que esse alelo é mais frequente em asiáticos. Na figura 10, mostramos o alinhamento realizado com as sequências obtidas pelo sequenciamento.

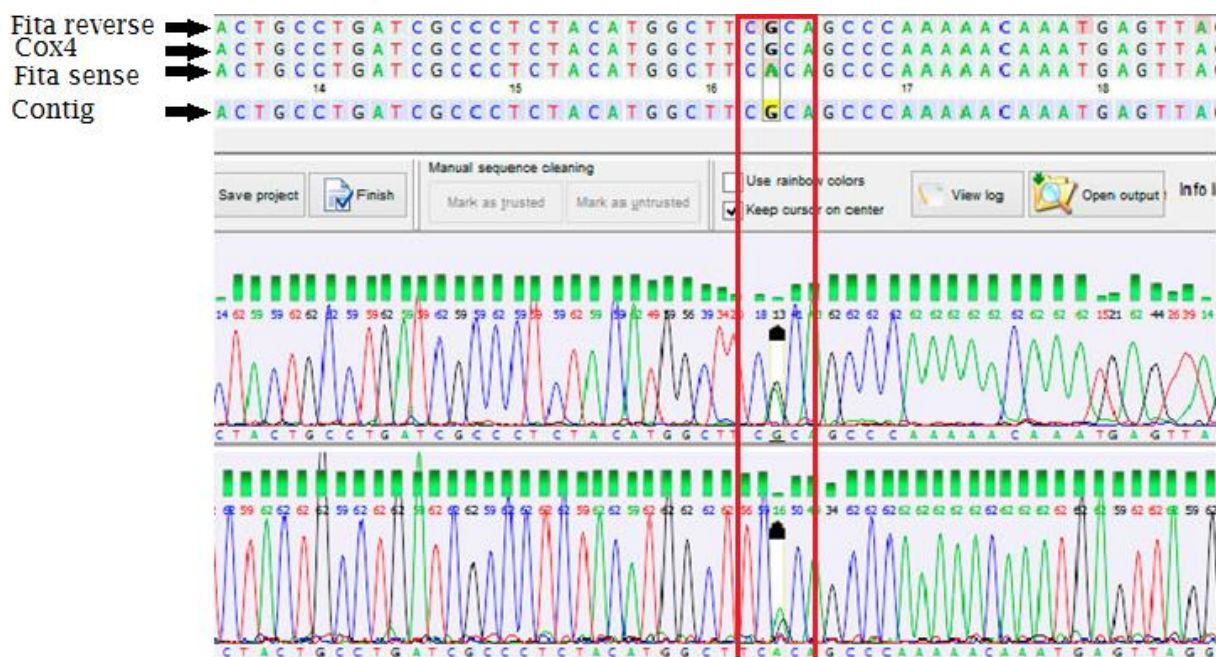


Figura 10. Alinhamento gerado pelo programa DNABaser, indicando o que é cada sequência de nucleotídeos pelas flechas pretas, a troca de base e os picos de DNA detectados pelo retângulo vermelho.

De acordo com a literatura (1000 *genomes*), os SNPs encontrados nessa região são de baixíssima frequência, o que sugere que a região é bem conservada nas populações, indicando que, mutações que ocorram neste gene possam acarretar em uma mudança no funcionamento da cadeia de transporte de elétrons, como observado em camundongos por IKEDA e colaboradores, (2013). Porém na região de COX2, que representa parte não codificante e codificante do éxon 2, e também uma parte da região intrônica, há indicação de uma possível associação como fator protetivo para DA. Se confirmada futuramente, por sequenciamento, a presença de um SNP, pode ser que ainda não tenha sido descrito para nenhuma população, já que as frequências apresentadas para os SNPs nessa região são baixíssimas.

Segundo REDDY et al, (2004), a expressão de *COX7A2L* é reduzida em camundongos com Alzheimer. Neste estudo foi realizada uma comparação entre camundongos de 2, 5 e 18 meses apresentando a demência e camundongos normais (resultados apresentados na tabela 9), mostrando que há uma redução significativa da expressão de *COX7A2L*, principalmente em camundongos com 18 meses, de acordo com a progressão da doença.

Esta diminuição na expressão, pode estar associada à algum SNP, ou seja, a presença de um SNP na região amplificada por COX2 poderia atuar mudando a expressão do gene, mesmo não havendo estudos indicando este caso, poderia explicar a teoria de que há algum SNP atuando de maneira protetiva para a DA.

De acordo com o que foi encontrado no 1000 *genomes*, a região do éxon 3, representada pelo COX3, apresenta algumas variantes, porém todas de baixíssima frequência, o que explica termos encontrado apenas três indivíduos com padrões de banda diferente. Estes devem ser sequenciados novamente para identificação de tais polimorfismos.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que há a presença de possíveis variantes nas sequências amplificadas para COX2 e COX3.

Em relação a região referente à COX2 pode haver associação de algum SNP no gene *COX7A2L* com a Doença de Alzheimer, atuando de maneira protetiva. Para melhores resultados será necessário seguir com sequenciamento para identificar a presença de algum variante.

Para COX3 deve-se seguir com sequenciamento das amostras que apresentaram padrões diferentes para a identificação das possíveis variantes encontradas.

Na região de COX4 foi encontrado um SNP já descrito em apenas uma amostra, identificado pelo *rs79591809*. Para esse SNP apenas foi descrito sua presença em populações asiáticas e a amostra sequenciada é de um controle idoso de origem japonesa, corroborando com a literatura.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIN-PEREZ, R. et. al, Respiratory Complex III Is Required to Maintain Complex I in Mammalian Mitochondria. **Molecular Cell**. v. 13(6): p. 805–815, 2004.

ACIN-PEREZ, R.; ENRIQUEZ, J. A. The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1837, n. 4, p. 444–450, 2014.

BARBOSA, L. F.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: O quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1352–1360, 2006.

BETTENS, K.; SLEEGERS, K.; VAN BROECKHOVEN, C. Genetic insights in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 1, p. 92–104, 2013.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica* p. 239–259, 1991.

BRUN, E. L. Organización modular de la cadena respiratoria de mamíferos y optogenética mitocondrial. 2012.

BUDOWLE, B.; CHAKRABORTY, R.; GIUSTI, A.M.; EISENBERG, A.J.; ALLEN, R.C. Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 48, p. 137-144, 1991.

CARAMELLI, P.; BARBOSA, M. T. Como diagnosticar as quatro causas mais freqüentes de demência? **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 24, n. Supl I, p. 7–10, 2002.

CHAUHAN, V.; CHAUHAN, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Pathophysiology**, v. 13, p. 195–208, 2006.

DE ALMEIDA HOLANDA, M. M. et al. Papel dos canais iônicos na Doença de Alzheimer. **Revista Neurociências**, v. 17, p. 141–145, 2009.

FERREIRA, M.; AGUIAR, T.; VILARINHO, L. Cadeia respiratória mitocondrial: Aspectos clínicos, bioquímicos, enzimáticos e moleculares associados ao déficit do complexo I. **Arquivos de Medicina**, v. 22, p. 49–56, 2008.

GEMELLI, T. E. A. Estresse oxidativo como fator importante na fisiopatologia da Doença de Alzheimer. **Revista Uniara**, 2013.

IKEDA, K. et al. A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. **Nature communications**, v. 4, p. 2147, 2013.

KADENBACH, B. et al. Separation of mammalian cytochrome c oxidase into 13 polypeptides by a sodium dodecyl sulfate-gel electrophoretic procedure. **Analytical biochemistry**, v. 129, n. 2, p. 517–21, mar. 1983.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LAPUENTE-BRUN, E. et al. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. **Science (New York, N.Y.)**, v. 340, n. 2013, p. 1567–70, 2013.

MATTSON, M. P.; CHAN, S. L.; DUAN, W. Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior. **Physiological reviews**, v. 82, p. 637–72, 2002.

MCVEAN, G. A. et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. **Nature**, v. 491, n. V, p. 56–65, 2012.

MOREIRA, P. I. et al. Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 1, p. 2–10, 2010.

ORITA, M. et al. 05. Rapid and Sensitive Detection of Point Mutations and DNA Polymorphisms Using the Polymerase Chain Reaction. **Genomics**, v. 5, p. 874–9, 1989.

PÔRTO, W. G. Radicais Livres e Neurodegeneração . Entendimento Fisiológico : Base para Nova Terapia ? v. 9, n. 2, p. 70–76, 2001.

REDDY, P. H. Gene expression profiles of transcripts in amyloid precursor protein transgenic mice: up-regulation of mitochondrial metabolism and apoptotic genes is an early cellular change in Alzheimer's disease. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 12, p. 1225–1240, 2004.

REDDY, P. H.; BEAL, M. F. Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? **Brain Research Reviews**, v. 49, p. 618–632, 2005.

REITZ, C.; BRAYNE, C.; MAYEUX, R. Epidemiology of Alzheimer disease. **Nature reviews. Neurology**, v. 7, n. 3, p. 137–52, mar. 2011.

REITZ, C.; MAYEUX, R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. **Biochemical Pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 640–651, 2014.

SCHNEIDER, C. D.; DE OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: Mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 9, p. 308–318, 2004.

SEELERT, H. et al. From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: Structure-dynamics-function relationships of energy-transducing membranes. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1787, n. 6, p. 657–671, 2009.

SILVA, D. F. et al. Bioenergetic flux, mitochondrial mass and mitochondrial morphology dynamics in AD and MCI cybrid cell lines. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 19, p. 3931–3946, 2013.

SWERDLOW, R. H.; BURNS, J. M.; KHAN, S. M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: Progress and perspectives. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, p. 1219–1231, 2014.

SWERDLOW, R. H.; KHAN, S. M. A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer's disease. **Medical Hypotheses**, v. 63, p. 8–20, 2004.

WILTFANG, J. et al. Elevation of β -Amyloid Peptide 2-42 in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease and Its Generation in PS1 Knockout Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 46, p. 42645–42657, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dementia: a public health priority. **Dementia**, p. 112, 2012.