

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARLA DANIELA SULZBACH

ENVOLVIMENTO DE POLIMORFISMOS DOS GENES *ABCA1*, *ABCA7* E
ABCG1 NA DOENÇA DE ALZHEIMER

CURITIBA

2016

CARLA DANIELA SULZBACH

ENVOLVIMENTO DE POLIMORFISMOS DOS GENES DAS PROTEÍNAS
TRANSMEMBRANA Abca1, Abca7 E Abcg1 NA DOENÇA DE ALZHEIMER

Dissertação apresentada como requisito à
obtenção do grau de Mestre ao Programa de
Pós Graduação em Genética, Departamento
de Genética, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof^o. Dr. Ricardo L. R. de Souza

CURITIBA

2016



PARECER

Os abaixo assinados, membros da banca examinadora da defesa de dissertação de mestrado, a qual se submeteu **CARLA DANIELA SULZBACH**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética são de parecer que se aprove a candidata.

Secretaria da Coordenação do Programa do Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 30 de março de 2016

Doutora Daiane Priscila Simão

Pontifícia Universidade Católica do Paraná - Membro Titular

Doutora Lupe Furtado Alle

Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR - Membro Titular

Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza

Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR - Presidente

Visto

Lupe Furtado Alle

Coordenadora do PPG-GEN / UFPR
Matrícula 200309

Doutora Lupe Furtado Alle

Coordenadora

Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR

AGRADECIMENTOS

Início agradecendo a Deus, por me guiar diante das distintas estradas e fazendo com que nelas encontre conhecimento e pessoas únicas.

Agradeço aos meus pais, Rudi e Marli, por sempre me incentivar a buscar realizações, sejam elas onde for, e por muitas vezes acreditar mais em mim do que eu mesma e de tanto dizerem “Vai dar certo”, eu começo a acreditar. Também a minha irmã, Angélica, pois, a seu modo, sempre se orgulha de mim e confia em meu trabalho. Obrigada pela confiança!

Há todos os amigos e familiares (de todos os lugares desse Brasil) que sempre deram força pra continuar, ouvindo minhas lamúrias, conquistas e saudades.

A todos os amigos que conquistei aqui em Curitiba, agradeço de todo meu coração por terem me acolhido de forma carinhosa, sempre dispostos a me inserir em novos grupos e contribuírem com grandes ensinamentos.

Ao meu orientador Prof^o Ricardo, primeiramente por ter me escolhido e acreditado em minha capacidade. Depois por ter uma paciência imensurável com todas as situações que nos foram impostas. Muito obrigada por suas ideias, por seus ensinamentos e por sempre ter uma resolução para os problemas!

Obrigada a Universidade Federal do Paraná e a CAPES por terem tornado possível à realização de um sonho.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma das doenças mais frequentes ligadas ao avanço da idade, devido à prevalência aumentada da expectativa de vida da população mundial. Por ser uma doença multifatorial, o seu desenvolvimento e progresso não estão bem esclarecidos, assim, pesquisas para um melhor entendimento são necessárias. O que é conhecido sobre a DA, são as características neuropatológicas da doença, que incluem a formação de placas amilóides, emaranhados neurofibrilares e atrofia hipocampal e de córtex cerebral. Porém, para o surgimento e a evolução destas características existem hipóteses relacionadas a vias de desenvolvimento, que incluem o metabolismo de colesterol. As proteínas transportadoras ABC (*ATP-binding cassette*) em humanos são divididas em 7 subfamílias, contendo 48 genes distintos. O objetivo foi analisar associação entre polimorfismos de 3 genes responsáveis pela produção de proteínas ABC transportadora, em pacientes com Doença de Alzheimer, por meio de um estudo caso-controle. Sendo esses genes vinculados com o transporte de substratos, como o colesterol, foram investigados dois SNPs (*single nucleotide polymorphism*) de cada um dos seguintes genes, *ABCA1* (rs1800977 e rs2230806), *ABCA7* (rs2279796 e rs3764650) e *ABCG1* (rs692383 e rs3827225) em pacientes com DA esporádica e um grupo de idosos cognitivamente saudáveis. Foram encontradas associações entre os polimorfismos dos genes *ABCA1*, *ABCA7* e *ABCG1* e idade de início da DA, progressão, déficit cognitivo e com tratamento de colesterol. Os resultados corroboram que o desenvolvimento e a progressão da doença estão ligados com a homeostase do metabolismo de colesterol. Além disso, o desequilíbrio no efluxo de colesterol pode interferir no sistema imune, o qual também está envolvido com a DA.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer (DA), Metabolismo de Colesterol, Proteínas Transportadoras ABC.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is one of the most common diseases related to aging, marked by increased life expectancy of the world population. This is a multifactorial disease development and progression of the disease is not well understood, thereby searches for a better understanding are needed. Neuropathological characteristics are well established, being the formation of amyloid plaques, neurofibrillary tangles and also atrophy in the hippocampus and cortex brain regions. However, for the evolution and developing of these features there are hypotheses which the cholesterol metabolism is included. Human ABC transporters (ATP-binding cassette) are categorized in seven subfamilies, divided into 48 distinct genes. Our objective was to test the association between polymorphisms of genes responsible for the production of carrier protein ABC, in patients with Alzheimer's disease, by means of a case-control study. As these genes linked to the transport of substrates such as cholesterol, two were investigated SNPs (single nucleotide polymorphism) of the following genes, *ABCA1* (rs1800977 and rs2230806), *ABCA7* (rs2279796 and rs3764650) and *ABCG1* (rs692383 and rs3827225) in patients with sporadic AD and a group of cognitively normal elderly. Associations were found in the polymorphisms of the *ABCA1* gene, *ABCA7* and *ABCG1* related to age of onset of AD, progression, cognitive impairment and treatment of cholesterol. Results confirm that the development and progression of the disease are somehow connected with the metabolism of cholesterol homeostasis. In addition, the imbalance in cholesterol efflux can interfere with the immune system, which is also involved in AD.

Keywords: Alzheimer's disease (AD), cholesterol metabolism, ABC Transporters.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CLIVAGEM DA PROTEÍNA PRECURSORA AMILÓIDE (APP).	18
FIGURA 2 – FATORES DE RISCO PARA DA.	22
FIGURA 3 – VIAS DE DESENVOLVIMENTO DA DA.	23
FIGURA 4 – ESTRUTURAS DAS PROTEÍNAS ABC.....	25
FIGURA 5 – LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA DO GENE <i>ABCA1</i> (NM005502).	26
FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA DO GENE <i>ABCA7</i> (NM019112).	27
FIGURA 7 - LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA DO GENE <i>ABCG1</i> (NM207627).....	28
FIGURA 8 – CONDIÇÕES DO TAQMAN®.....	34
FIGURA 9 - GEL COM PADRÕES DE BANDAS DA GENOTIPAGEM DE rs3764650.	35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESTUDOS QUE ASSOCIAM POLIMORFISMOS DOS GENES ABCA1, ABCA7 E ABCG1 COM DA.....	29
TABELA 2 - PONTUAÇÃO DO MEEM.....	32
TABELA 3 - DADOS GERAIS SOBRE A POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	33
TABELA 4 - REAÇÃO DO TAQMAN®.....	33
TABELA 5 - CONDIÇÕES DE PCR CONVENCIONAL PARA rs3764650.....	34
TABELA 6 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DOS SNPs EM PACIENTES (DA) E GRUPO CONTROLE.(CI).....	37
TABELA 7 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS GENÓTIPOS DO SNP rs2230806 (ABCA1) SEGUINDO O MODELO DE DOMINÂNCIA EM PACIENTES (DA) E GRUPO CONTROLE.(CI).....	39
TABELA 8 - RESULTADO DA REGRESSÃO LOGÍSTICA MÚLTIPLA COM ABCA1 e ABCA7.....	39
TABELA 9 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICA DO SNP rs3764650 (ABCA7) COM OS VALORES DE MEEM DOS PACIENTES E A IDADE DE INÍCIO DA DA.....	40
TABELA 10 - RESULTADO DA REGRESSÃO LOGÍSTICA MÚLTIPLA COM ABCA7.....	41
TABELA 11 - COMPARAÇÕES DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO SNP rs2279796 ENTRE INDIVÍDUOS QUE NÃO REALIZAM TRATAMENTO PARA CONTROLE DOS NÍVEIS DE COLESTEROL	

(COL 0) E OS QUE FAZEM TRATAMENTO PARA O COLESTEROL (COL 1).....	41
TABELA 12 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO SNP rs3827225 (ABCG1), COM VALORES CALCULADOS A PARTIR DO TEMPO DE DOENÇA.	42
TABELA 13 - RESULTADO DA REGRESSÃO LOGÍSTICA MÚLTIPLA COM ABCG1.....	43
TABELA 14 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICA DO SNP rs692383 (ABCG1) COM OS VALORES DE MEEM DOS PACIENTES (DA).	43
TABELA 15 - PRESENÇA DO ALELO E4 (APOE) AUMENTANDO RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA.	44
TABELA 16 - ALELO T DO rs2230806 (ABCA1) É PREDITOR DE RISCO PARA DA.	45
TABELA 17 - IDADE DE ÍNICIO DA DOENÇA INFLUENCIADA PELOS rs1800977 (ABCA1) E rs3764650 (ABCA7).....	46
TABELA 18 - rs2279796 (ABCA7) ASSOCIADO AO AUMENTO DO RISCO DE TRATAMENTO PARA CONTROLE DE NÍVEIS DE COLESTEROL. ..	47
TABELA 19 - O GENÓTIPO A/A DO rs3827225 (ABCG1) COMO FATOR DE RISCO NO TEMPO DE PROGRESSÃO DE DOENÇA.	48
TABELA 20 - O GENÓTIPO A/A DO rs3827225 (ABCG1) COMO FATOR DE RISCO NO VALOR DE CDR.....	48
TABELA 21 - INFLUÊNCIA DO rs692383 (ABCG1) NOS VALORES DE MEEM	48

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER, EM PACIENTES COM SINTOMAS VARIADOS.....	19
---	----

GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DA PROGRESSÃO DA DOENÇA ALZHEIMER NOS GENÓTIPOS G/G+G/A E A/A.	43
GRÁFICO 2 - PREDIÇÃO DE RISCO PARA DA E CI COM O ALELO E4 (APOE)..	45
GRÁFICO 3 - PREDIÇÃO DE RISCO ENVOLVENDO COLESTEROL, PRESENÇA DE E4 E GENÓTIPOS DO rs2230806 (ABCA1) AGRUPADOS COMO T/T +C/T E C/C, EM DA E CI.....	45
GRÁFICO 4 - PREDIÇÃO DE RISCO ENVOLVENDO COLESTEROL E GENÓTIPOS DO rs2230806 (ABCA1) AGRUPADOS COMO T/T +C/T E C/C, EM DA E CI.....	46
GRÁFICO 5 - PREDIÇÃO DE RISCO COM A INFLUÊNCIA DOS rs1800977 (ABCA1) E rs3764650 (ABCA7) NOS GRUPOS FORMADOS A PARTIR DA DIFERENÇA DE IDADE DO INÍCIO DA DOENÇA.	46
GRÁFICO 6 - DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS QUE FAZEM O TRATAMENTO PARA O COLESTEROL OU NÃO A PARTIR DA PREDIÇÃO DE RISCO E O ENVOLVIMENTO DOS GENÓTIPOS A/A + A/G DE rs2279796 (ABCA7).	47
GRÁFICO 7 - PREDIÇÃO DE RISCO NOS DOIS GRUPOS GERADOS A PARTIR DO TEMPO DE PROGRESSÃO DA DOENÇA, SENDO UM FATOR DE RISCO O GENÓTIPO A/A DE rs3827225 (ABCG1).	48
GRÁFICO 8 - PREDIÇÃO DE RISCO NOS DOIS GRUPOS GERADOS A PARTIR DO VALOR DE CDR, OBSERVANDO O GENÓTIPO A/A DE rs3827225 (ABCG1).	49

GRÁFICO 9 - VARIAÇÃO DOS VALORES DE MEEM SOBRE INFLUENCIA DE rs692383 (ABCG1).....	49
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 TRANSTORNOS COGNITIVOS.....	16
2.2 DOENÇA DE ALZHEIMER.....	16
2.2.1 Aspectos gerais	16
2.2.2 Fisiopatologia	17
2.2.3 Diagnóstico.....	18
2.2.4 Tratamento	20
2.3 ASPECTOS GENÉTICOS NA DA.....	20
2.4 FATORES DE RISCOS E VIAS DE DESENVOLVIMENTO DA DA.....	21
2.5. METABOLISMO DE COLESTEROL NA DA.....	22
2.6 TRANSPORTADORES ATP-BINDING CASSETTE (ABC).....	24
2.6.1 Proteína Abca1	26
2.6.2 Proteína Abca7	27
2.6.3 Proteína Abcg1	27
2.7 ABCA1, ABCA7 E ABCG1 EM DA.....	28
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL.....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 JUSTIFICATIVA.....	31
5 MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1 AMOSTRAS.....	32
5.2 EXTRAÇÃO E GENOTIPAGEM.....	33
5.3 ANÁLISE DOS DADOS	35
6 RESULTADOS.....	37
6.1 ABCA1.....	38
6.2 ABCA7.....	39

6.3 ABCG1	41
6.4 PREDIÇÕES DE RISCO	44
7 DISCUSSÃO	50
8 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXOS.....	68
APÊNDICE	72

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a expectativa de vida está aumentando, e com isso, o desenvolvimento de doenças ligadas à idade está mais evidente. Entre estas, as classificadas como neurodegenerativas progressivas vêm sendo muito estudadas tanto em relação à sua manifestação e desenvolvimento, como ao tratamento.

As demências são caracterizadas por comprometimento cognitivo, apresentando interferências nas atividades diárias (FROTA *et al.*, 2011). As principais características são as funções neuronais prejudicadas, como a memória, comunicação e linguagem, capacidade de se concentrar, raciocínio e julgamento, e percepção visual (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2016). Pessoas com demência podem ter problemas com perda de memória episódica, desorientação de espaço e tempo, declínio na função executiva, instabilidade comportamental, alteração na fala, e com a progressão da doença há interferência no funcionamento de sistemas respiratórios e digestivo (CAIXETA *et al.*, 2012).

A doença de Alzheimer (DA) é uma das demências mais frequentes e a maior incidência é em pessoas de baixa escolaridade. Características neuropatológicas são o acúmulo de placas β -amiloides e emaranhados neurofibrilares extracelulares, no cérebro humano (BRAAK; BRAAK, 1991), levando à perda neuronal e atrofia cerebral. As causas do desenvolvimento da DA ainda não estão bem definidas, principalmente porque a doença atinge indivíduos em idades distintas e progride de forma diferente nos pacientes.

Sabe-se que a DA é multifatorial, sofrendo influência do ambiente e de fatores genéticos, tendo um diagnóstico mais clínico, do que laboratorial. Exames de imagem e marcadores moleculares já conhecidos podem auxiliar na identificação da doença, porém, ainda assim não são suficientes para uma total compreensão. Portanto, estudos com biomarcadores em populações diferentes ajudam a elucidar o desenvolvimento e a progressão do DA, além de auxiliar seu diagnóstico.

As famílias *ATP-binding cassette* (ABC) são proteínas transmembrana que utilizam a energia da hidrólise de ATP para transportar certos substratos, como lipídios, açúcar, proteínas, aminoácidos, carboidratos, vitaminas e hormônios esteroides (HIGGINS, 1992). O cérebro é um órgão rico em colesterol, o qual é muito importante nas membranas da glia e do neurônio, além de ser o maior

componente da mielina (DIETSCHY; TURLEY, 2001). O metabolismo de colesterol é alvo de muitos estudos relacionados à Doença de Alzheimer e para o presente estudo foram selecionados alguns genes *ABC* ligados ao efluxo de colesterol. Há estudos que indicam conexão da expressão dos genes *ABCA1* e *ABCG1* com o desenvolvimento da DA (HIRSCH-REINSHAGEN *et al.*, 2009; PIEHLER *et al.*, 2012), enquanto que o gene *ABCA7* foi evidenciado por estudos de associação de genoma completo (GWAS) (ROSENTHAL *et al.*, 2014). Assim, o presente estudo tem, como objetivo, verificar associação de polimorfismos dos genes *ABCA1*, *ABCA7* e *ABCG1* com DA, em um estudo caso-controle.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TRANSTORNOS COGNITIVOS

A definição de demência por *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DMS-5)*, consiste por um estado clínico caracterizado por perda de múltiplos domínios cognitivos, afetando as atividades diárias do indivíduo. Na quinta edição do DSM o termo “demência” foi renomeado para transtorno cognitivo (APA DSM-5, 2014).

Critérios para diagnóstico de transtornos cognitivos leves e graves são diferenciados em distintos países, assim Frota *et al.* (2011) citam formas de avaliar os transtornos cognitivos. O diagnóstico diferencial é realizado baseado em exames laboratoriais, de neuroimagem e de perfil neuropsicológico característico. Esses exames permitem a principal diferenciação entre transtornos reversíveis, outras condições que podem levar a demências (ex. tumores, hipotireoidismo, deficiência em vitamina B12), e transtornos neurodegenerativos (CARAMELLI; BARBOSA, 2002).

2.2 DOENÇA DE ALZHEIMER

2.2.1 Aspectos gerais

A doença de Alzheimer (DA) é neurodegenerativa progressiva, dentre os transtornos cognitivos, é a mais frequente, abrangendo 60% dentre os transtornos (LOGIUDICE, 2002). As características clínicas da demência apresentam um início insidioso, com um declínio cognitivo progressivo, perda da memória episódica, desorientação de espaço e tempo, declínio na função executiva, instabilidade comportamental e alteração na fala (CAIXETA *et al.*, 2012).

A DA caracteriza-se por processo degenerativo que acomete inicialmente a formação hipocampal, com posterior comprometimento de áreas corticais associativas e relativa preservação dos córtices primários. Essa distribuição do processo patológico faz com que o quadro clínico da doença seja caracterizado por alterações cognitivas e comportamentais, com preservação do funcionamento motor e sensorial até as fases mais avançadas da doença (CARAMELLI; BARBOSA, 2002).

Quanto à mortalidade, a DA está na lista de doenças que ocasionam morte, não especificamente pelo transtorno cognitivo, mas devido às consequências que a doença traz ao corpo do paciente. Além disso, a DA provoca incapacidade e falta de saúde (morbidade) nos pacientes em progressão (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2016).

Em cerca de 95% dos casos, a doença é de início tardio (causada pela interação entre fatores genéticos e ambientais). Porém, mutações autossômicas dominantes nos genes da proteína precursora amiloide (*APP*), presenilina 1 (*PSEN1*) e presenilina 2 (*PSEN2*) são encontradas em cerca de 5% dos casos com Alzheimer Familiar, muitas vezes caracterizada por início precoce (GALIMBERTI; SCARPINI, 2012).

2.2.2 Fisiopatologia

A DA é caracterizada pela perda sináptica e morte neuronal nas regiões cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas, iniciando pelo hipocampo. Histopatologicamente são evidenciados, o acúmulo de placas senis de β -amilóide e emaranhados neurofibrilares extracelulares (BRAAK; BRAAK, 1991).

A formação de placas β -amilóides (β A) ajuda a explicar a etiologia da DA, sendo ocasionadas principalmente pela clivagem de APP (ROGERS; MORRISON, 1985). A proteína precursora amiloide é um peptídeo do tipo transmembrana que é clivada por β - e γ -secretases, formando monômeros de β A que devem ser retirados por proteínas chaperonas, mas, se isso não ocorrer formam-se oligômeros tóxicos, que podem levar à formação das placas amiloides (FIGURA 1) (CREWS; MASLIAH, 2010).

Quanto à formação de emaranhados neurofibrilares, são causados pela hiperfosforilação da proteína Tau. Esta é responsável por estabilizar os microtúbulos neuronais. Com sua função comprometida, ocorre o acúmulo de neurônios defeituosos, formando os emaranhados (SELKOE DJ, 2001).

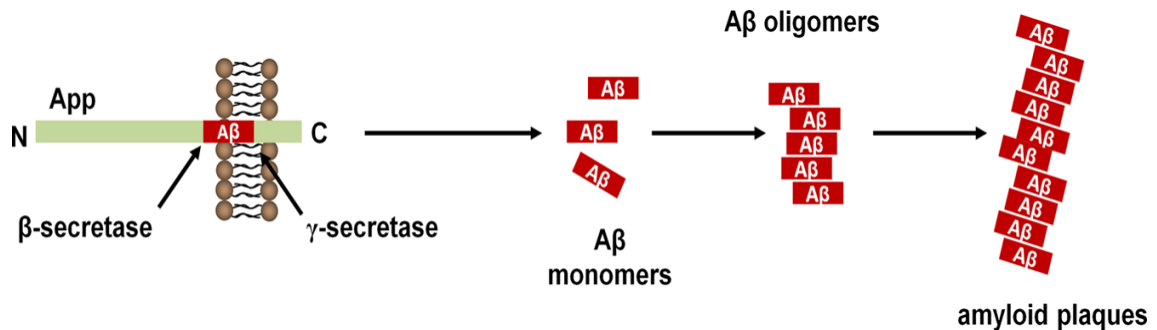


FIGURA 1 – CLIVAGEM DA PROTEÍNA PRECURSORA AMILÓIDE (APP).

FONTE: ABUZNAIT; KADDOUMI, 2012.

NOTA: A proteína precursora amiloide (APP) é clivada sequencialmente por β-secretase e γ-secretase, liberando vários peptídeos βA. Na DA, o aumento da produção de monômeros βA resulta na formação de oligômeros e de placas amiloides.

2.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico específico da DA só é possível com análises histológicas do cérebro do paciente, em geral pós-morte. Por este motivo foram desenvolvidos critérios para um provável quadro clínico da doença. Assim NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*) do Instituto Nacional Neurológico do EUA (QUADRO 1) (MCKHANN et al., 1984) e o DSM-5 especificaram critérios onde se identificam pacientes que já possuem sintomas (APA DSM-5, 2014).

Atualmente, existem novos testes que podem auxiliar no diagnóstico clínico, como: perfil anormal de βA e de Tau em fluido cefalorraquidiano; visualização de atrofia hipocampal através de ressonância magnética; ou a presença de uma mutação patogênica conhecida em genes que codificam para a *APP*, *PSEN1* e *PSEN2*. Os fatores genéticos citados são bem descritos em pacientes com Alzheimer familiar (GALIMBERTI; SCARPINI, 2012).

No entanto, a utilização de biomarcadores ainda é pouco empregada para o auxílio do diagnóstico clínico. Na maioria das situações, os biomarcadores são usados somente em pesquisa, para um melhor conhecimento sobre desenvolvimento, patologia e progressão da Doença de Alzheimer (ALUISE *et al.*, 2008).

<p>I. Critérios para o diagnóstico clínico de doença de Alzheimer PROVÁVEL:</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Demência estabelecida por exame clínico e documentada pelo Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) e confirmação por testes neuropsicológicos; • Piora progressiva da memória e/ou outras funções cognitivas; • Ausência de distúrbio da consciência; • Início entre os 40 e 90 anos, mais frequentemente após os 65 anos; • Ausência de doenças sistêmicas ou outras doenças cerebrais que, por si só, possam provocar declínio progressivo de memória e cognição.
<p>II. O diagnóstico de doença de Alzheimer PROVÁVEL é auxiliado por:</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Deterioração progressiva de funções cognitivas específicas como afasia, apraxia e agnosia; • Prejuízo nas atividades do dia-a-dia e padrões anormais de comportamento; • História familiar de demência (particularmente se confirmada por exame neuropatológico); • Exames laboratoriais compatíveis com o diagnóstico: <ul style="list-style-type: none"> « punção lombar: normal, pelas técnicas usuais; « TC de crânio: atrofia cerebral, com progressão documentada por exames seriados.
<p>III. Outras características clínicas consistentes com o diagnóstico de doença de Alzheimer PROVÁVEL, após exclusão de outras causas de demência, incluem:</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sintomas associados: depressão, insônia, incontinência, delírios, ilusões, alucinações, incontinência verbal, explosões emocionais, agitação, distúrbios sexuais, perda de peso; • Outras anormalidades neurológicas, observadas em alguns pacientes, especialmente com doença avançada e incluindo sinais motores, aumento de tônus muscular, distúrbio da marcha; • Convulsões em doença avançada; • TC de crânio normal para a idade.
<p>IV. As características que tornam o diagnóstico de doença de Alzheimer PROVÁVEL incerto ou pouco provável incluem:</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Início abrupto; • Sinais neurológicos focais (tais como hemiparesia, déficits sensitivos, déficits em campos visuais, distúrbio da coordenação motora) no início do curso da doença; • Convulsões ou distúrbios da marcha nos estágios iniciais da doença.

QUADRO 1 – CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER, EM PACIENTES COM SINTOMAS VARIADOS.

FONTE: Adaptação de MCKHANN G *et al.*, 1984.

2.2.4 Tratamento

Os principais medicamentos utilizados em pacientes com Doença de Alzheimer são os anticolinesterásicos, responsáveis por inibir a degradação de acetilcolina. A acetilcolina é um neurotransmissor necessário para ativar os receptores sinápticos, onde se sabe que este está diminuído em pacientes com DA (GROSSBERG, 2003).

Os anticolinesterásicos atualmente aprovados para o tratamento de DA são: Donepezil, Galantamina e Rivastigmina. A Rivastigmina tem um efeito maior, pois inibe ambas as colinesterases (acetilcolinesterase e butirilcolinesterase), apresentando maior eficácia no aumento dos níveis de acetilcolina cerebrais (GROSSBERG, 2003), porém de difícil administração nos pacientes por causa dos efeitos colaterais do medicamento. Donepezil e Galantamina inibem somente a enzima acetilcolinesterase, porém sabe-se que os três anticolinesterásicos agem de forma paliativa nas questões clínicas das doenças (QASEEM *et al.*, 2008).

Outro tipo de droga utilizada no tratamento de DA é a Memantina, que atua na transmissão neuronal glutamatérgica. Este medicamento é um antagonista do receptor N-metil-D-aspartato, geralmente utilizado em pacientes em fase moderada ou grave de DA (ENGELHARDT *et al.*, 2005).

2.3 ASPECTOS GENÉTICOS NA DA

A Doença de Alzheimer pode ser dividida em familiar ou esporádica. Essa diferença pode ser verificada pela presença de mutações autossômicas dominantes em *APP* (21q21.2), *PSEN1* (14q24) e *PSEN2* (1q31–42), levando ao início precoce da doença (antes dos 60 anos), caracterizada como Alzheimer familiar (CAMPION *et al.*, 1999; TILLEY *et al.*, 1998).

Já a forma esporádica tem características multifatoriais, onde o fator de risco genético com maior evidência de associação é a presença do alelo E4 da apolipoproteína E em pacientes com a DA (STRITTMATTER *et al.*, 1993). O gene da apolipoproteína E (*APOE*) está localizado no braço longo do cromossomo 19

(19q13.2). Os alelos mais frequentes (E2, E3 e E4) são diferentes apenas pela troca que ocorre nos aminoácidos presentes nas posições 112 e 158. O alelo E2 possui na posição 112 e 158 cisteína (Cys); o alelo E3 na posição 112 apresenta Cys e na 158 Arg; e o alelo E4 apresenta Arg nas posições 112 e 158 (OLAISEN *et al.*, 1982). Sabe-se que o alelo E4 não é necessário e nem suficiente para causar DA, mas que pode interferir na antecipação e no desenvolvimento da doença (OJOPI *et al.*, 2004).

Como a forma esporádica é a mais comum dentre os pacientes com DA, há muitos estudos genéticos observando várias vias metabólicas que estão envolvidas na doença. Os mais verificados são: metabolismo de colesterol, sistema imune, disfunções sinápticas e processamento nas membranas celulares (MORGAN, 2011; MEDWAY; MORGAN, 2014). Seguindo a mesma estratégia, autores de estudos de associação genômica (GWAS) recentes identificaram muitos genes (*ABCA7*, *BIN1*, *CD33*, *CLU*, *CR1*, *CD2AP*, *EPHA1*, *MS4A6A-MS4A4E* e *PICALM*), como associados com a doença (LAMBERT *et al.*, 2013).

2.4 FATORES DE RISCOS E VIAS DE DESENVOLVIMENTO DA DA

A DA esporádica é multifatorial, com diferentes fatores de risco para o seu desenvolvimento, não tendo um caminho etiológico único que leve a doença. No artigo de Morris *et al.* (2014), foram discutidas manifestações sistêmicas e físicas da DA, verificando que fatores ambientais, associados a variantes de genes nucleares e mitocondriais (FIGURA 2) podem levar ao surgimento da doença em idades distintas e com progressões diferentes em cada paciente (MOSER; PIKE, 2015).

Existem múltiplos fatores de risco, mas também já foram delineadas vias de desenvolvimento da DA. As vias já bem estabelecidas são a do metabolismo de colesterol, imunológico e de endocitose (FIGURA 3). A ApoE e membros da família transportadores ABC desenvolvem um importante papel na regulação lipídica e homeostase lipoproteica no sistema nervoso central, sendo que a via do metabolismo de colesterol está envolvida no desenvolvimento da DA (HIRSCH-REINSHAGEN; WELLINGTON, 2007).

A reciclagem da APP, através das vias de endocitose, desempenha um papel fundamental na geração de peptídeo β -amilóide, na doença de Alzheimer (ROGAEVA et al., 2007). Enquanto que produtos de genes envolvidos nas respostas inflamatórias e na sinalização destas, também tem importante função no desenvolvimento da doença (MEDWAY; MORGAN, 2014).

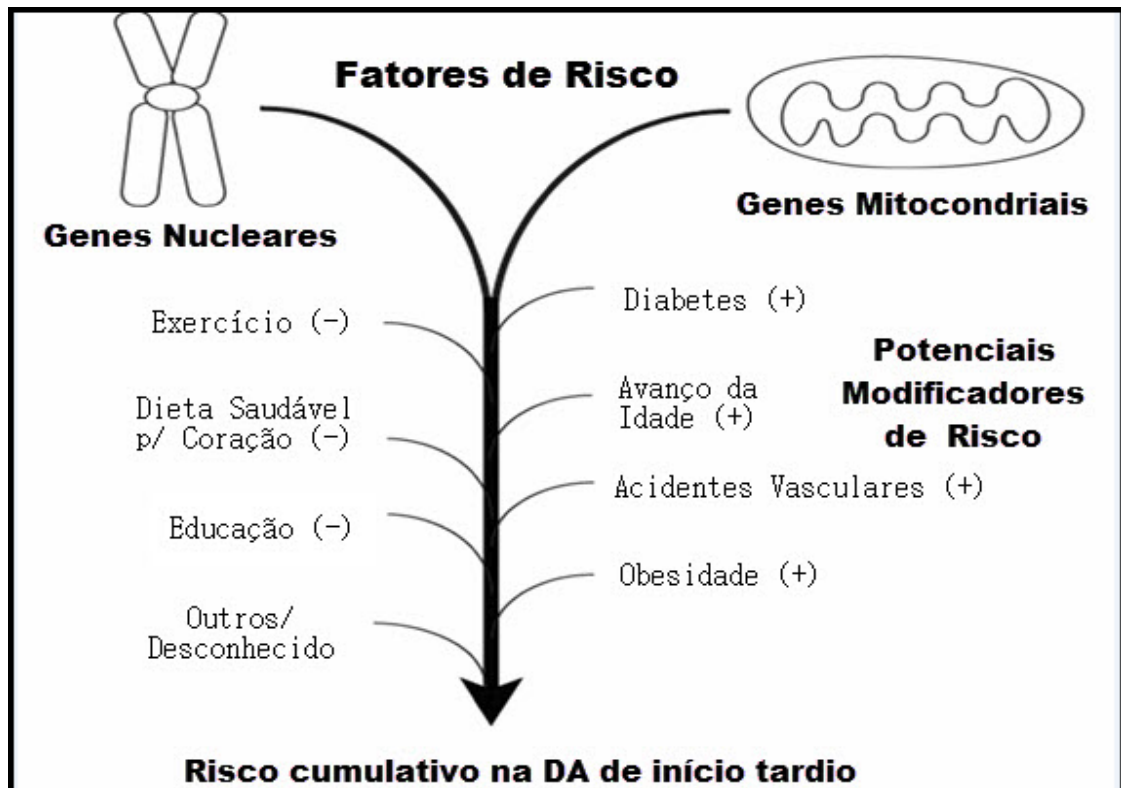


FIGURA 2 – FATORES DE RISCO PARA DA.

FONTE: MORRIS *et al.*, 2014.

NOTA: Esquema dos fatores de risco para DA, demonstrando que a associação entre qualquer aumento (+) ou diminuição (-) por uma grande variedade de fatores ambientais, (dieta, exercício) e fatores socioeconômicos (educação), combinados com polimorfismos de genes nucleares e mitocondriais pode levar a doença.

2.5. METABOLISMO DE COLESTEROL NA DA

O sistema nervoso central (SNC) representa 2% da massa corporal, mas contém um quarto do colesterol do corpo, presente nas membranas plasmáticas dos neurônios e células da glia, também na membrana especializada da mielina. Isso faz do colesterol um substrato importante para a manutenção e o bom funcionamento do SNC (DIETSCHY; TURLEY, 2001).

O colesterol presente no cérebro é sintetizado *in situ*, pois a barreira hematoencefálica dificulta a passagem de substratos. Sendo assim, são necessários formas de transporte do colesterol ou de seus convertidos; em geral, lipoproteínas e proteínas transmembranares (HIRSCH-REINSHAGEN *et al.*, 2009).

Dados sugerem que o metabolismo anormal de lipídios influencia na clivagem de APP e consequentemente na deposição de β A (REITZ, 2013), bem como a desregulação de colesterol no cérebro pode levar a hiperfosforilação da Tau (LIU; ZHANG, 2014; SATO; MORISHITA, 2015), assim estando envolvido no desenvolvimento e progressão da DA. Já é sabido que a apolipoproteína E (variantes apoE2, apoE3 e apoE4) tem um papel importante na remoção de β A e que uma de suas variantes (apoE4) é um fator de risco para a doença de Alzheimer (LIDDELL *et al.*, 1994; STRITTMATTER *et al.*, 1994).

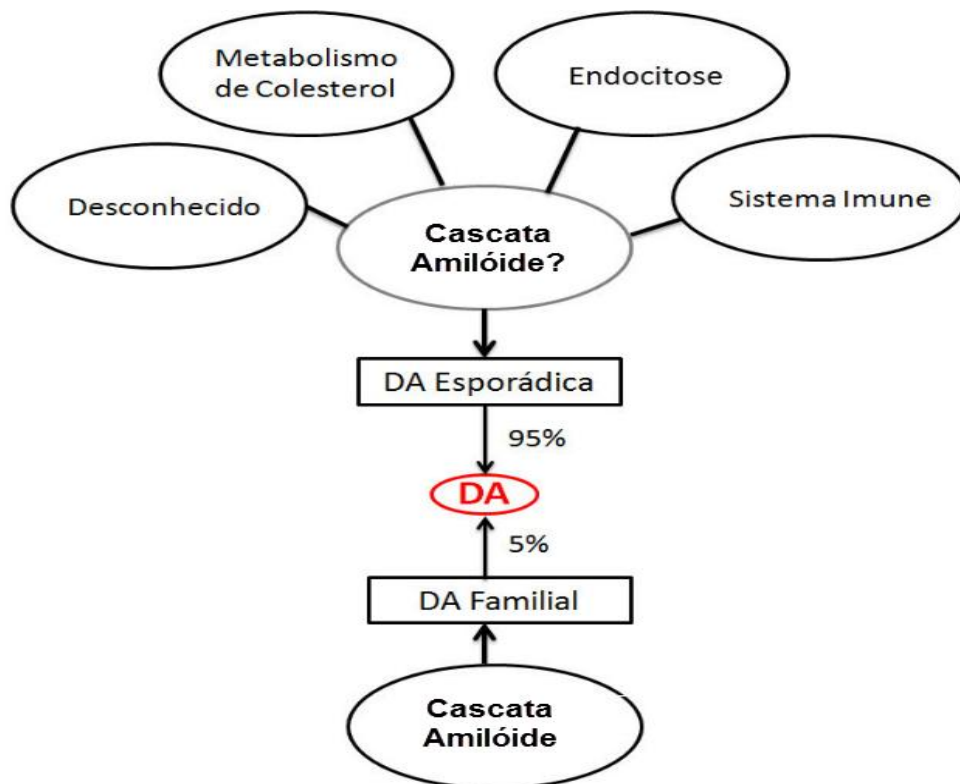


FIGURA 3 – VIAS DE DESENVOLVIMENTO DA DA.

FONTE: MEDWAY; MORGAN, 2014.

NOTA: Esquema de vias para o desenvolvimento da DA. Doença de Alzheimer familiar é causado por um dos três genes (*PSEN1*, *PSEN2* e *APP*) envolvidas na via de processamento de amilóide (a cascata amiloide). Não existe um único caminho que explica a DA esporádica. O número de genes candidatos é enriquecido em várias vias: Metabolismo do colesterol, Sistema Imunológico e Endocitose. Estas vias podem ser dependentes ou independentes de processamento de amiloide.

No entanto, ainda é necessária a verificação de outras proteínas que possam influenciar na homeostase do colesterol cerebral. Assim, as proteínas de transporte

transmembrana ABC, do inglês *Adenosina triphosphate-binding cassette*, ajudam na homeostase do colesterol no cérebro, por isso são estudadas quanto à sua associação com a patogênese da Doença de Alzheimer (HIRSCH-REINSHAGEN *et al.*, 2009).

2.6 TRANSPORTADORES ATP-BINDING CASSETTE (ABC)

As proteínas de transporte transmembranar ABC, dependentes da hidrólise de ATP, são responsáveis por transportar produtos pela membrana celular ou de organelas. As proteínas ABC são altamente conservadas, encontradas em procariotos e eucariotos (HIGGINS, 1992). Os genes são classificados em subfamílias ABCs com base na sequência de domínios de ligação a ATPs (NBF – *nucleotídeo binding folds*) e domínios transmembrana (TMD – *transmembrane domains*) (DEAN *et al.*, 2001).

As subfamílias são subdividas em proteínas com 2 NBF e 2 TMD completos, 1 NBF e 1 TMD com terminações N ou C e ainda proteína sem domínio TMD só NBF (Figura 3) (DEAN, 2005). Em humanos são encontradas 7 subfamílias, denominadas de A - G, nas quais são agrupados 48 genes distintos (DEAN *et al.*, 2001).

Os TMDs variam consideravelmente entre as proteínas ABC, podendo ser encontradas de 6-11 α -hélices transmembranares, responsáveis por atravessar substratos pela bicamada lipídica. Já os NBFs são altamente conservados, constituídos por três elementos (*walker* A e B e um motivo de assinatura – FIGURA 4), estes tem como função se ligar a nucleotídeos e na hidrólise para fornecimento de energia, utilizada para translocar substratos através das membranas celulares, de modo que ocorra a exportação ou importação de substratos (LI *et al.*, 2013).

A partir destas informações, há um grande interesse em entender as proteínas ABC como parte da maquinaria celular. É conhecida a influência das proteínas ABC em doenças, na resistência a fármacos, no surgimento de células cancerosas (DEAN, 2005). Recentemente, autores têm verificado o importante papel de proteínas ABC no efluxo de colesterol, sendo que mutações nestes genes estão associadas a doenças metabólicas (MOITRA; DEAN, 2011).

O transporte de colesterol é importante na manutenção e bom funcionamento no sistema nervoso central (SNC) (SATO; MORISHITA, 2015). As proteínas ABC auxiliam na homeostase do colesterol no cérebro, sendo por isso estudadas quanto à sua ligação com a patogênese da Doença de Alzheimer (HIRSCH-REINSHAGEN *et al.*, 2009).

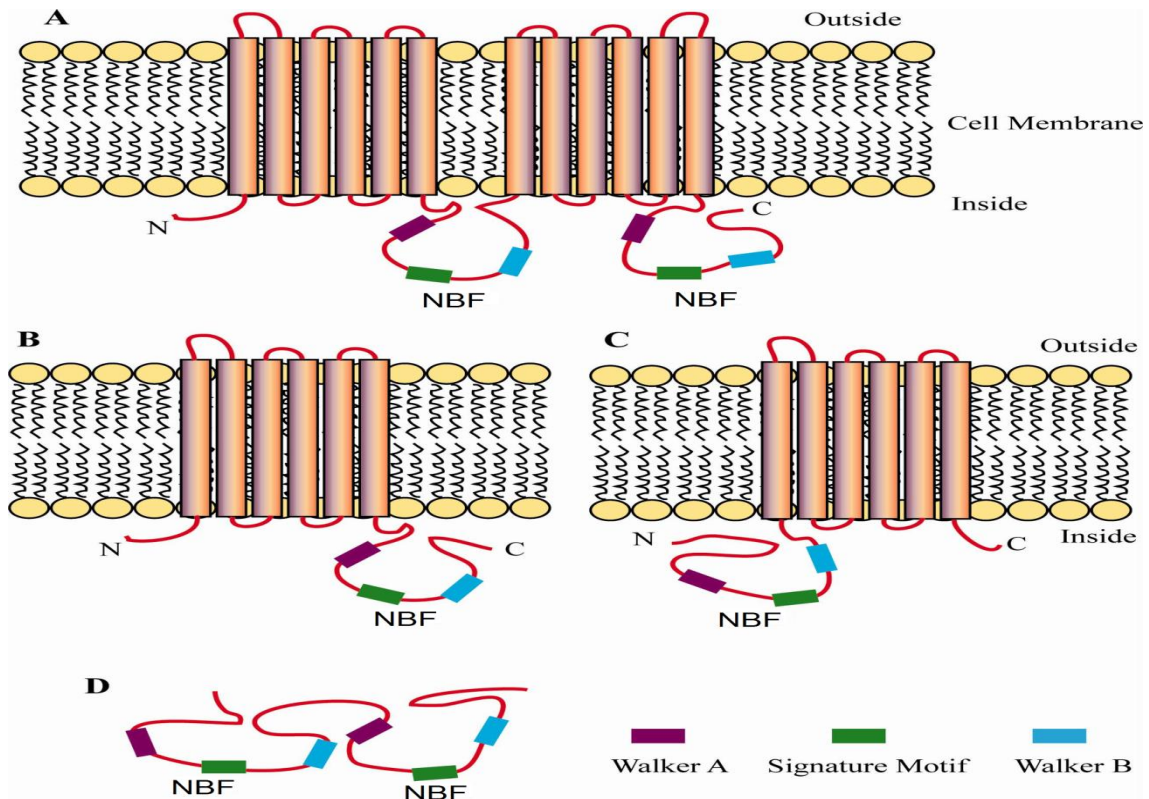


FIGURA 4 – ESTRUTURAS DAS PROTEÍNAS ABC.

FONTE: LI *et al.*, 2013.

LEGENDA: (A) Proteína com 2 TMD e 2 NBF. (B) Proteína com 1 TMD de terminação N e 1 NBF com terminação C. (C) Proteína com 1 TMD de terminação C e 1 NBF com terminação N. (D) Proteína somente com NBF

Há trabalhos com as proteínas Abca1, Abca7 e Abcg1, associadas com a DA, a variação dos polimorfismos e também através da expressão dos seus produtos podem ser correlacionados com o desenvolvimento e progresso da demência (WOLLMER *et al.*, 2003; SUNDAR *et al.*, 2007; WOLLMER *et al.*, 2007; HOLLINGWORTH *et al.*, 2011; ALLEN *et al.*, 2012; KARCH *et al.*, 2012; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2013; NORDESTGAARD *et al.*, 2015). Além disso, os três transportadores estão envolvidos no transporte de colesterol (HIRSCH-REINSHAGEN *et al.*, 2004; JEHL *et al.*, 2006; KARTEN *et al.*, 2006).

2.6.1 Proteína Abca1

O transportador Abca1 faz parte da subfamília A das proteínas ABC. Em humanos, a subfamília A, é constituída por doze proteínas transportadoras completas (2 NBF e 2 TMD – Figura 3A) e seus tamanhos variam de 1543 a 5058 aminoácidos (KAMINSKI *et al.*, 2006). Abca1 e Abca2 foram identificados primeiramente por Luciani e colaboradores, em ratos (LUCIANI *et al.*, 1994).

O gene que codifica *ABCA1* está localizado no cromossomo 9q31.1 e compreende 147 kb DNA, 50 éxons (Figura 5) e traduz uma proteína de 254 kDa constituída por 2261 aminoácidos (PIEHLER *et al.*, 2012). Abca1 mostra um padrão de expressão com níveis mais elevados em músculo liso, sangue total, placenta, fígado, pulmão, glândulas suprarrenais, órgãos fetais (LANGMANN *et al.*, 1999), e no cérebro na glia e em neurônios (LAWN *et al.*, 2001).

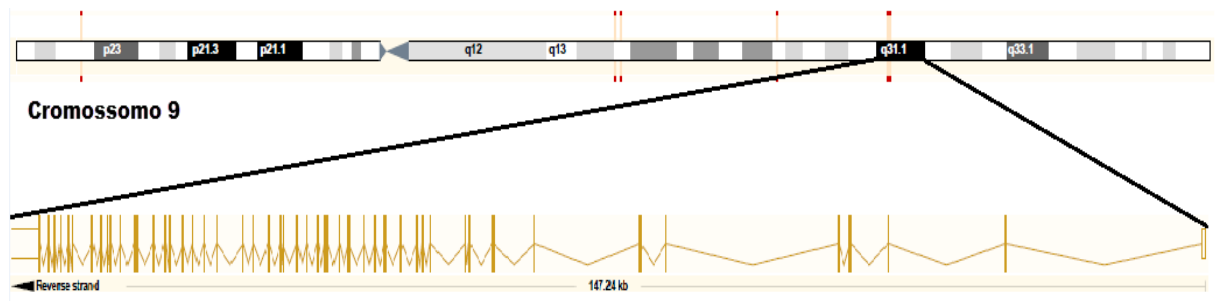


FIGURA 5 – LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA DO GENE *ABCA1* (NM005502).
 FONTE: Site Ensembl em 10/2015.

As funções da proteína Abca1 no SNC não são totalmente conhecidas, mas pode ser citada a sua participação na formação e na expressão da ApoE, estudos confirmam esta hipótese demonstrando que quando inibem Abca1 em cérebros de ratos os níveis de ApoE estão diminuídos (HIRSCH-REINSHAGEN *et al.*, 2004; WAHRLE *et al.*, 2004). Também participa no efluxo de colesterol em excesso para extracelular através de lipoproteínas como ApoE, onde está associada a lipídios interfere no clareamento de β A, assim influenciando na patogenicidade da DA (HIRSCH-REINSHAGEN *et al.*, 2009). Outro estudo, também em ratos, verificou que a expressão de Abca1 está envolvida na expressão de APOE e esta aumentada pode ser relacionada ao declínio de proteínas sinápticas (TACHIBANA *et al.*, 2015).

2.6.2 Proteína Abca7

A proteína Abca7 pertence à subfamília A, como Abca1, portanto é uma proteína completa, contendo dois NBF e dois TMD. O Abca7 foi identificado em 2000, por Kaminski e colaboradores (KAMINSKI *et al.*, 2000).

O gene *ABCA7* está no cromossomo 19p13.3, tendo o tamanho de 24 kb, com 46 éxons (FIGURA 7), formando uma proteína com 2146 Aa e de peso de 235 KDa, com 54% de homologia com *ABCA1* e 49% com *ABCA4* (KAMINSKI *et al.*, 2000; BROCCARDO *et al.*, 2001). A expressão da proteína Abca7 no cérebro é verificada em neurônios e glia (KIM *et al.*, 2006).

As funções no SNC ainda precisam ser melhor elucidadas, no entanto, alguns autores têm citado que a proteína Abca7 é capaz de realizar efluxo de colesterol e promover fagocitose de detritos apoptóticos (JEHLE *et al.*, 2006). Há também estudos em animais em que foi verificado que o nocaute do gene *ABCA7* leva a memória espacial prejudicada (LOGGE *et al.*, 2012).

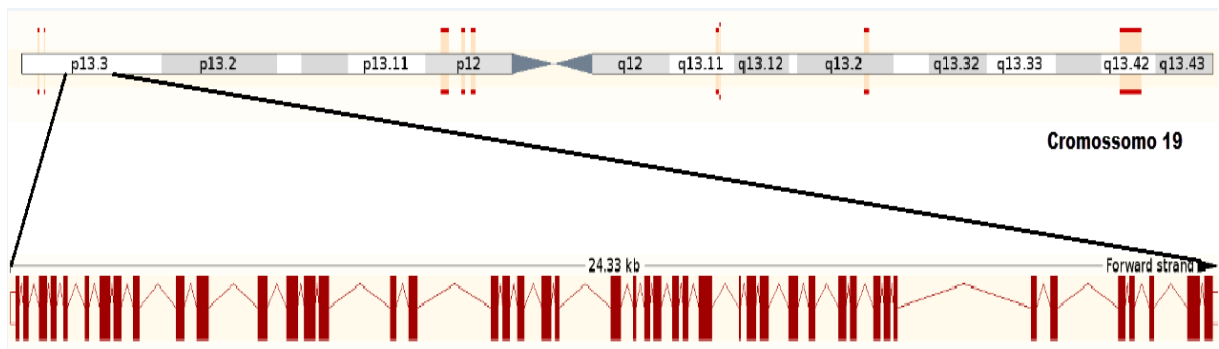


FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA DO GENE *ABCA7* (NM019112).
 FONTE: Site Ensembl em 10/2015.

2.6.3 Proteína Abcg1

A proteína Abcg1 pertence à subfamília G, que é composta por cinco proteínas ABC transportadoras em humanos. A subfamília ABCG humana contém um NBF com terminação N e um TMD com terminação C (Figura 3C), citada como semi-completa em alguns estudos (DEAN *et al.*, 2001).

O gene *ABCG1* é codificado no cromossomo 21q22.3 (FIGURA 8), contendo 15 éxons (CHEN *et al.*, 1996). A expressão da proteína no SNC ocorre na glia e em neurônios. A atividade funcional do Abcg1 como transportador de colesterol influencia a distribuição subcelular e processamento proteolítico da APP (TANSLEY *et al.*, 2007).

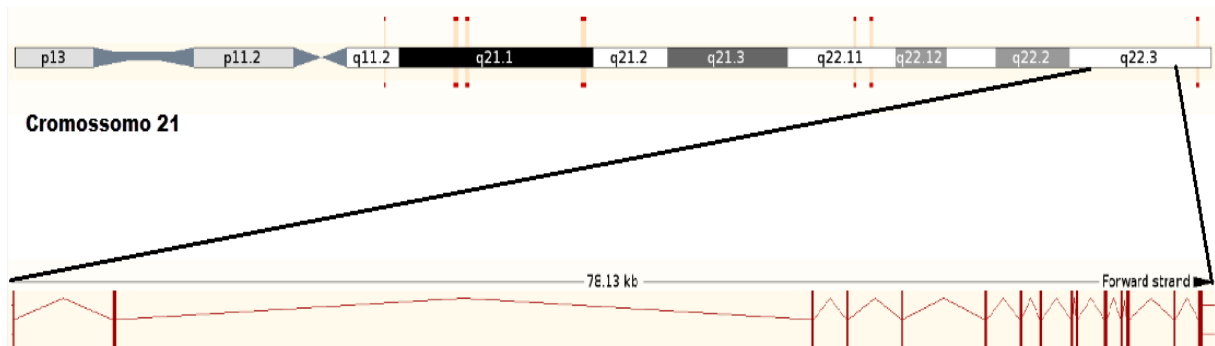


FIGURA 7 - LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA DO GENE *ABCG1* (NM207627).
 FONTE: Site Ensembl em 10/2015.

As proteínas Abcg1 e Abca1 tem funções muito similares e, por este motivo, são estudadas muitas vezes de forma conjunta. Pesquisadores avaliaram a expressão de Abcg1 e Abca1 e constataram que quando um dos genes está reprimido, há uma diminuição no efluxo de colesterol (KARTEN *et al.*, 2006).

2.7 ABCA1, ABCA7 E ABCG1 NA DA

Há evidências de que o metabolismo anormal do colesterol pode constituir um fator chave na patogênese da Doença de Alzheimer (HIRSCH-REINSHAGEN *et al.*, 2009; ALLINQUANT *et al.*, 2014). Transportadores ABC têm sido associados a processos de excreção de peptídeos tóxicos e comprometimento no mecanismo de exportação de colesterol, podendo levar à DA (PAHNKE *et al.*, 2014). Assim, na TABELA 1 estão descritos alguns dos SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) já avaliados na literatura científica, associados com a DA.

A maior parte dos estudos com a proteína Abca1 na DA relaciona com a diminuição da sua expressão, tanto o acúmulo de colesterol, como no desenvolvimento da proteína apoE (WOLLMER *et al.*, 2003; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2009; JASMIN *et al.*, 2014). Um estudo de Nordestgaard e

colaboradores com mais de 90 mil participantes, verificaram que a presença da mutação (N1800H – rs146292819) no gene *ABCA1*, fazendo perder sua função, está relacionada a diminuição dos níveis de apoE, aumento do risco de DA e doenças cerebrovasculares (NORDESTGAARD *et al.*, 2015).

Em relação à *Abcg1*, em estudos muito similares aos de *Abca1*, com avaliações de expressão e interferência na expressão de *APOE* (TAI *et al.*, 2014), mas também com análises de variantes genéticas (SNPs), foram associadas com DA (KARTEN *et al.*, 2006; WOLLMER *et al.*, 2007).

TABELA 1 - ESTUDOS QUE ASSOCIAM POLIMORFISMOS DOS GENES *ABCA1*, *ABCA7* E *ABCG1* COM DA.

Gene	SNPs	Tipo de Estudo	Significância (p)	Referência
<i>ABCA1</i>	rs2234884 rs2234886	Associação (caso/controle)	> 0,05	WOLLMER <i>et al.</i> , 2003
	rs2230806 rs2740483	Associação (caso/controle)	0,0003* > 0,05	SUNDAR <i>et al.</i> , 2007
	rs1800977 rs2422493	Associação (caso/controle)	0,02 0,02	RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ <i>et al.</i> , 2009
	rs7247087 rs757232 rs2072102	Associação (caso/controle)	> 0,05** 6,25x10 ^{-5**} 6,74x10 ^{-5**}	ALLEN <i>et al.</i> , 2012
<i>ABCA7</i>	rs3764650	Associação (caso/controle)	> 0,05	RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ <i>et al.</i> , 2013
	rs3764650	Meta-análise	4,5x10 ⁻¹⁷	HOLLINGWORTH <i>et al.</i> , 2011
	rs3764650	Associação (caso/controle)	0,004	KARCH <i>et al.</i> , 2012
<i>ABCG1</i>	rs692383 rs1378577 rs3827225	Associação (caso/controle)	0,0007 > 0,05	WOLLMER <i>et al.</i> , 2007

* Diferença significativa da amostra feminina dos controles de DA.

** Significância encontrada através de níveis de expressão no cérebro.

Já a *Abca7* foi analisada por meio de estudos de grande escala, onde foram verificados marcadores de diferentes genes, associados com a DA (ALLEN *et al.*, 2012). Além disso, trabalhos de associação alguns polimorfismos candidatos e DA também são descritos na literatura (KARCH *et al.*, 2012; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2013). Estudos que verificaram a ação da perda de função de *ABCA7* evidenciaram o aumento da proteólise de APP, produção de β A e risco de DA (SATO *et al.*, 2015; STEINBERG *et al.*, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar associação entre polimorfismos dos genes *ABCA1*, *ABCA7* e *ABCG1* e Doença de Alzheimer, por meio de um estudo caso-controle.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar as frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos dos genes *ABCA1*, *ABCA7*, *ABCG1* e *APOE* em pacientes e controles.
- Avaliar possíveis correlações entre polimorfismos dos genes *ABCA1*, *ABCA7* e *ABCG1* com variáveis clínicas, cognitivas (desempenho cognitivo, idade de início dos sintomas, tempo de doença) e presença do alelo *APOE4* no grupo de pacientes com DA e realização de controle de níveis de colesterol.

4 JUSTIFICATIVA

Com o aumento da expectativa de vida, o desenvolvimento de doenças ligadas à idade está mais evidente, sendo a Doença de Alzheimer uma das mais frequentes. Ainda existe muito a ser descoberto sobre as mudanças biológicas específicas que levam ao desenvolvimento da Doença de Alzheimer, a progressão desta, podendo ser diferente nos indivíduos afetados; além de formas de prevenir e tratar a doença.

Desse modo, o desenvolvimento de estudos que têm o intuito de melhor compreender a etiologia da DA e as particularidades na sua progressão, são de grande importância. Neste contexto, o metabolismo de colesterol, a deposição de placas amiloides e a formação de emaranhados neurofibrilares necessitam de um entendimento mais adequado quanto à sua influência na DA.

Seguindo uma das vias sugeridas por outros estudos, serão verificadas SNPs de genes de transportadores *ABC* envolvidos no metabolismo de colesterol. Assim, a análise da associação de genes envolvidos com o metabolismo do colesterol e também com a formação da ApoE pode contribuir na compreensão questões patológicas no desenvolvimento e progressão da doença de Alzheimer. A verificação da associação de SNPs dos genes *ABCA1*, *ABCA7* e *ABCG1* traz conhecimentos sobre o desenvolvimento e progressão da doença de Alzheimer.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 AMOSTRAS

A amostra é constituída por dois grupos: pacientes e controles. Ambos os grupos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aprovado pelo comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná, (ANEXO 1) concordando em participar das pesquisas.

Os pacientes com DA esporádica foram diagnosticados, segundo os critérios de diagnóstico, pelos médicos participantes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC - UFPR) e Instituto de Neurologia de Curitiba (INC) com base em anamnese e testes cognitivos. O grupo controle foi constituído por indivíduos com mais de 60 anos de idade, triados pelo teste Mini Exame de Estado Mental (MEEM – ANEXO 2), cujos valores de corte estão citados na TABELA 2, a fim de atestar ausência de déficits cognitivos. Foram coletadas informações sobre colesterol, diabetes, alterações na tireoide e alcoolismo.

A presença de doenças infectocontagiosas foi critério de exclusão no grupo de pacientes e no grupo controle. Nos pacientes os critérios de exclusão foram: possuir demência diferente da DA, ser etilista ou possuir diagnóstico inconclusivo.

TABELA 2 - PONTUAÇÃO DO MEEM.

MEEM	
ANOS DE ESCOLARIDADE	PONTUAÇÃO MÍNIMA*
0 (Analfabetos)	20
1 – 4	25
5 – 8	26
9 – 11	28
> 11	29

* Se o resultado do teste for menor que a pontuação mínima é indício que o indivíduo possui déficit cognitivo.

FONTE: BRUCKI *et al.*, 2003.

A amostragem do presente estudo possui a distribuição demográfica conforme citado na TABELA 3. Todos os indivíduos foram genotipados, para seis SNPs de genes de transportadores ABC: rs1800977, rs2230806 (ABCA1), rs2279796, rs3764650 (ABCA7), rs692383 e rs3827225 (ABCG1).

TABELA 3 - DADOS GERAIS SOBRE A POPULAÇÃO DE ESTUDO.

	DA	CI
N	196	129
Idade	76,55*	70,02*
Feminino	123	96
Masculino	73	33

*Média da idade dos indivíduos na data de coleta.

5.2 EXTRAÇÃO E GENOTIPAGEM

O material coletado dos participantes foi aproximadamente 4 mL de sangue periférico em tubo com anticoagulante (EDTA). Este foi processado e então realizada a extração de DNA a partir do protocolo adaptado de Lahiri e Nurnberger (LAHIRI; NURNBERGER.; 1991, adaptação TURECK, 2015). O DNA foi quantificado e armazenado nas concentrações que foram utilizados para as genotipagens por ensaios *TaqMan* (*Applied Biosystems*) em termociclador de PCR *Real Time* (concentração - 20 ng/μL) e PCR - RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (concentração - 100 ng/μL).

A genotipagem por *TaqMan*® consiste na captura de fluorescências distintas, por sonda e *primers* específicos para cada SNP. Os seguintes polimorfismos foram genotipados com esta técnica: rs1800977 e rs2230806 (*ABCA1*), rs2279796 (*ABCA7*), rs692383 e rs3827225 (*ABCG1*). Onde seguiram as condições de PCR conforme TABELA 4 e FIGURA 8.

TABELA 4 - REAÇÃO DO TAQMAN®.

SNPs			
rs1800977, rs2230806 e rs2279796		rs692383 e rs3827225	
Reagentes	Concentração	Reagentes	Concentração
Master Mix (Life)	1X	Master Mix (Roche)	0,8X
Sonda + Primers	0,5X	Sonda + Primers	0,5X
DNA	4 ng/μL	DNA	4 ng/μL
H2O	*	H2O	*

* Quantidade suficiente para obter volume final da reação.

O rs3764650 (*ABCA7*) foi genotipado através de PCR - RFLP, com os *primers* 5'ATCCGTGCTATGTGGACGAC3' (*Forward*) e 5'GTCACGGAGTAGATCCAGGC3' (*Reverse*) que foram desenhados a partir do NCBI/ Primer-BLAST, a PCR segue as

condições da TABELA 5. Após a confirmação, por gel de agarose 1% e corado com *GelRed*, da amplificação por PCR foi realizada clivagem por enzima de restrição, com a enzima *HpyCH4III*. Esta foi selecionada com base na sequência do fragmento de PCR e sabendo especificamente onde se localizava o SNP desejado, foram feitas análises no site NEBcutter V 2.0. Desse modo, a enzima *HpyCH4III* foi escolhida para que ocorresse a digestão, na qual foram usadas 0,5 unidades da enzima, mais o tampão indicado na concentração de 10X, 5 µL de produto de PCR; esta reação ficou a 37°C *over night*. O padrão de bandeamento para a genotipagem do rs3764650 foi (conforme FIGURA 9) por meio de eletroforese em gel de agarose 1% e corado com *GelRed*, com o genótipo T/T possuindo um fragmento de 483 pares de bases (pb), T/G três fragmentos de 483 pb, 347 pb e 136 pb, e o G/G um de 347 pb e outro de 136 pb.

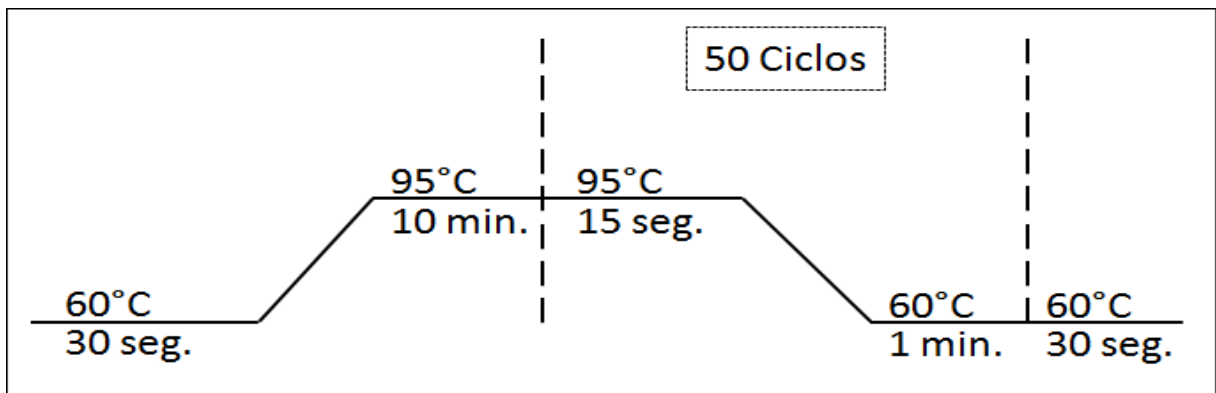


FIGURA 8 – CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA GENOTIPAGENS POR ENSAIOS VIA TAQMAN® NO EQUIPAMENTO ViiA7.

As amostras também foram genotipadas para verificação do gene *APOE*, através dos SNPs rs7412 e rs429358 por PCR *Real Time - TaqMan*. Grande parte da amostra já havia sido genotipada por estudos anteriores, então foram genotipadas, para este gene, as amostras necessárias para completar o nosso grupo amostral.

TABELA 5 - CONDIÇÕES DE PCR CONVENCIONAL PARA rs3764650.

Reação de PCR		Temperatura e tempos no termociclador	
Reagentes	Concentração	1º Passo	95°C - 30 segundos
			95°C - 30 segundos
Taq DNA Polimerase Super Mix Invitrogen	9,0 µL	2º Passo 35 Ciclos	57°C - 30 segundos
Primer Forward	0,2 µL		72°C - 45 segundos
Primer Reverse	0,2 µL	3º Passo	72°C - 10 minutos
DNA	1,0 µL	4º Passo	20°C - 10 minutos

Os SNPs relacionados aos genes dos transportadores ABC foram selecionados segundo sua relevância descrita na literatura (TABELA 1), também foram avaliados perante o desequilíbrio de ligação entre os SNPs de cada gene (através do HapMap), a posição do SNP no gene e a frequência do polimorfismo na população.

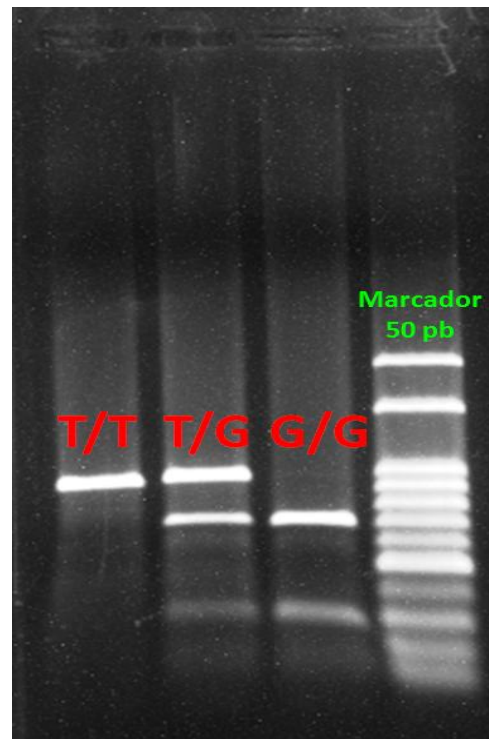


FIGURA 9 - GEL COM PADRÕES DE BANDAS DA GENOTIPAGEM DE rs3764650.

5.3 ANÁLISE DOS DADOS

Os grupos foram avaliados segundo a sua homogeneidade, comparando escolaridade ($p = 0,2473$) e sexo ($p = 0,03056$); revelando que os grupos são homogêneos perante a variável escolaridade. Quanto ao sexo foram necessárias análises estatísticas com distinção entre homens e mulheres, nas comparações das frequências alélicas e genotípicas e também através das análises de regressões, porém não foi verificada diferença significativa que envolva a variável sexo.

As variáveis usadas nas análises estatísticas foram: valores do MEEM dos pacientes; estágio da DA a partir do valor de CDR (*Clinical Dementia Rating*); idade de início de sintomas dos pacientes, que considerou o relato dos acompanhantes de

quando perceberam o início dos sintomas; tempo de doença, calculada a partir da idade de aparecimento dos sintomas até a idade de coleta; realização de tratamento para controle dos níveis de colesterol, onde esta informação que consiste se o indivíduo faz ou não tratamento para o controle dos níveis de colesterol. Para esta última variável, os resultados seriam mais completos se houvesse informações das análises laboratoriais com os níveis do colesterol total, porém este relato estava presente num número amostral muito pequeno, não podendo ser utilizado para análises estatísticas. As informações foram retiradas do prontuário.

As verificações de frequências e regressão não foram avaliadas somente perante os genótipos a alelos, foi adotado o modelo de dominância e também em alguns casos o efeito do heterozigoto comparado com os homozigotos.

As análises estatísticas foram todas realizadas por meio do Programa R (R Core Team, 2015). Para alguns testes foram necessários pacotes específicos, como para verificação das frequências alélicas, genotípicas, o equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação (GENETICS, 2013), predição de risco (PREDICTABEL, 2014) e teste de normalidade (NORTEST, 2015). A partir desses resultados foram considerados significativos os valores com o “ p ” menor que 0,05.

A predição de risco, utilizando o pacote PredictABEL, infere um risco para cada indivíduo. Os valores gerados são baseados em regressão logística (KUNDU *et al.*, 2011), assim sendo possível visualizar os riscos dentro dos grupos estipulados.

6 RESULTADOS

As amostras foram genotipadas e em seguida foram calculadas as frequências alélicas e genotípicas. Como as amostras foram coletadas em dois lugares diferentes, HC e INC, verificamos se poderia haver diferenças entre os grupos amostrais, porém as análises não levaram a nenhuma diferença significativa (TABELA 1 – Apêndice). A partir disso analisamos as amostras em conjunto, então as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs foram testadas e todas se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foram comparadas as frequências entre os dois grupos, DA e CI, e não foram encontradas diferenças significativas (TABELA 6). Uma comparação entre os dois grupos (DA e CI) perante a presença do alelo E4 do gene *APOE* mostrou uma frequência significativamente maior deste nos pacientes, com um valor de p igual a $3,476 \times 10^{-8}$.

TABELA 6 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DOS SNPs EM PACIENTES (DA) E GRUPO CONTROLE.(CI).

		rs1800977						
ABCA1	Grupos	Frequências alélicas %			Frequências genotípicas %			
		G	A	p*	GG	AG	AA	p*
	DA (n=196)	64,8	35,2	0,3847	40,3	50,0	10,7	0,5312
CI (n=127)	68,1	31,9	43,3		49,6	7,1		
		rs2230806						
ABCA1	Grupos	Frequências alélicas %			Frequências genotípicas %			
		C	T	p*	CC	CT	TT	p*
	DA (n=191)	69,6	30,4	0,9046	46,6	46,1	7,3	0,2547
CI (n=127)	70,1	29,9	51,2		37,8	11,0		
		rs3764650						
ABCA7	Grupos	Frequências alélicas %			Frequências genotípicas %			
		T	G	p*	TT	TG	GG	p*
	DA (n=174)	87,9	12,1	0,7691	77,6	20,7	1,7	0,5474
CI (n=98)	88,8	11,2	80,6		16,3	3,1		
		rs2279796						
ABCA7	Grupos	Frequências alélicas %			Frequências genotípicas %			
		A	G	p*	AA	AG	GG	p*
	DA (n=198)	50,8	49,2	0,4962	27,7	46	26,3	0,2390
CI (n=126)	48,0	52,0	20,6		54,8	24,6		
		rs692383						
ABCG1	Grupos	Frequências alélicas %			Frequências genotípicas %			
		A	G	p*	AA	AG	GG	p*
	DA (n=196)	64,0	36,0	0,9127	42,3	43,4	14,3	0,8489
CI (n=128)	64,5	35,5	41,4		46,1	12,5		
		rs3827225						
ABCG1	Grupos	Frequências alélicas %			Frequências genotípicas %			
		G	A	p*	GG	AG	AA	p*
	DA (n=195)	72,3	27,7	0,3261	52,8	39,0	8,2	0,5624
CI (n=130)	75,8	24,2	56,9		37,7	5,4		

* valores de p gerados a partir dos valores de χ^2 pelo Programa R.

Dentre os SNPs dos genes dos transportadores ABC genotipados foram analisados o desequilíbrio de ligação dos situados no mesmo gene. Os valores para *ABCA1* entre rs1800977 e rs2230806, e *ABCG1* entre rs692383 e rs382225 não foram significativos ($D' = 0,149 - p = 0,0773$ e $D' = 0,150 - p = 0,0888$, respectivamente). Enquanto os resultados entre os SNPs rs3764650 e rs2279796 do gene *ABCA7* ($D' = 0,609 - p = 2,01 \times 10^{-7}$), demonstraram que estes estão em desequilíbrio de ligação.

O tratamento para controle de níveis de colesterol foi verificado em todos os indivíduos, verificando a diferença entre a presença de algum alelo ou genótipo que fosse interferir para o indivíduo fazer ou não o tratamento para colesterol, contudo não foram encontrados resultados com diferenças significativas. Outra investigação com o colesterol foi verificar se dentro dos grupos, possuía uma diferença entre os indivíduos com diagnóstico de DA e se havia uma prevalência de algum genótipo ou alelo ligado a necessidade de fazer tratamento para o controle dos níveis de colesterol. Porém ambas as investigações não encontraram resultados com diferenças significativas, no apêndice está representado as frequências da junção de pacientes e controles (TABELA 2 – Apêndice).

6.1 *ABCA1*

As genotipagens e comparações de frequências dos SNPs do *ABCA1* entre os grupos não evidenciaram diferenças significativas. Então foram realizadas regressões múltiplas binomiais (TABELA 8). Os testes usaram como variável dependente os grupos DA e CI e a idade de início da DA sendo significativos, enquanto que para as variáveis de MEEM, tempo de doença e tratamento de colesterol não ocorreram diferenças significativas.

O rs2230806 está na posição 1051 e faz uma mudança de nucleotídeo de T para C, fazendo uma troca de aminoácidos de lisina para arginina. O resultado da regressão para este SNP, com variável dependente DA ou CI, mostrou significância para os genótipos T/T+ T/C ($p = 0,0349$ – TABELA 8), porém as diferenças nas frequências não foram significativas (TABELA 6 e 7). Quando gerada uma nova regressão considerando a presença do alelo E4 (*APOE*) como variável independente

foi verificado um aumento da significância com um valor de $p=0,0187$. Os dados de frequência mostram que esses genótipos estão aumentados em DA.

TABELA 7 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS GENÓTIPOS DO SNP rs2230806 (ABCA1) SEGUINDO O MODELO DE DOMINÂNCIA EM PACIENTES (DA) E GRUPO CONTROLE.(CI).

Genótipo	DA % n=191	CI % n= 127	DA x CI
C/C+C/T	92,7	89,0	p=0,2549
T/T	7,3	11,0	
C/C	46,6	51,2	p=0,4230
T/T+C/T	53,4	48,8	

TABELA 8 - RESULTADO DA REGRESSÃO LOGÍSTICA MÚLTIPLA COM ABCA1 e ABCA7.

Variável Dependente	Variáveis Independentes Consideradas	Variáveis Independentes Confirmadas	z	p
DA ou CI	T/T+T/C e C/C+T/C em rs2230806,	T/T+T/C em rs2230806	-2,109	0,0349
	Tratamento para Colesterol	Tratamento para Colesterol	2,387	0,0169
Idade de início da DA	SNPs rs1800977, rs2230806, rs3764650, rs2279796, rs692383, rs3827225	rs1800977	2,058	0,0396
		rs3764650*	-2,434	0,0149

*rs3764650 pertence ao gene ABCA7.

A regressão considerando variável dependente a idade de início da DA, precisou ser transformada em binomial através do valor da mediana (74 anos), isso porque é uma variável contínua e segundo o teste de normalidade ($p = 1,763 \times 10^{-6}$), esta não estava com uma distribuição normal. A partir destas alterações foram realizadas regressões múltiplas binomiais (TABELA 8) e corroborado o rs1800977 ($p = 0,0396$) como variável independente, junto com outro SNP do gene ABCA7 (rs3764650).

6.2 ABCA7

Os SNPs do gene ABCA7 genotipados neste estudo foram o rs3764650 e o rs2279796. Estes são encontrados em regiões intrônicas do gene, o rs3764650 correspondente a uma troca de T para G, enquanto o rs2279796 de A para G.

Na TABELA 9 são apresentados resultados em que foram verificadas diferenças significativas envolvendo o rs3764650. O primeiro resultado encontrado foi quando verificado se os genótipos dos pacientes influenciavam na variação dos resultados do MEEM, por esta variável ser contínua foi testada sua distribuição e verificada que não estava dentro da normalidade ($p = 0,0001$), então a variável contínua foi transformada em variável binária, utilizando o valor da mediana (15 pontos). A partir disto foram comparadas as frequências genóticas ($p = 0,0124$), alélicas ($p = 0,08609$) e para codominância de um dos alelos (T/G – $p=0,0070$). Esses resultados demonstram que há um acúmulo de valores dos alelos, sendo confirmados na regressão com um valor de $p=0,0086$ (TABELA 10).

TABELA 9 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICA DO SNP rs3764650 (ABCA7) COM OS VALORES DE MEEM DOS PACIENTES E A IDADE DE INÍCIO DA DA.

M0* (%) n=76	M1* (%) n= 73	M0 X M1	M0 (%) n=76	M1 (%) n= 73	M0 X M1
T/T (84,2)	T/T (68,5)				
T/G (13,2)	T/G (31,5)	p= 0,0124	T/T+G/G (86,8)	T/T+G/G (68,5)	p = 0,0070
G/G (2,6)	G/G (0)		T/G (13,2)	T/G (31,5)	
T (90,8)	T (84,2)	$p= 0,0869$			
G (9,2)	G (15,8)				
ID0** (%) n= 78	ID1** (%) n= 78	ID0 X ID1	ID0 (%) n= 78	ID1 (%) n= 78	ID0 X ID1
T/T (70,6)	T/T (82)		T/T+T/G (96,2)	T/T+T/G (100)	$p = 0,0803$
T/G (25,6)	T/G (18)	$p = 0,0935$	G/G (3,8)	G/G (0)	
G/G (3,8)	G/G (0)				
T (83,3)	T (91)	p = 0,0421	T/T (70,5)	T/T (82)	$p = 0,0902$
G (16,7)	G (9)		G/G+T/G (29,5)	G/G+T/G (18)	

* M0 representa os pacientes com o valor de MEEM menor que 15 pontos (mediana) e M1 valor maior que 15.

** ID0 representa a idade de início da DA foi antes dos 74 anos e ID1 quando começou acima dos 74 anos.

Outro resultado significativo por comparações de frequências encontradas foi considerando a idade de início da DA, que foi alterada em variável binária conforme citada anteriormente nos resultados ligados a ABCA1. Esta variável comparada com as frequências genóticas ($p = 0,0935$), alélicas ($p = 0,04214$) e utilizando o modelo de dominância de um dos alelos (T/T + T/G – $p = 0,0803$ e G/G + T/G – $p = 0,0902$) (TABELA 9) mostra uma significância ligada a frequência alélica, e sendo que essa informação foi confirmada na regressão múltipla ($p = 0,049$) conforme TABELA 10.

TABELA 10 - RESULTADO DA REGRESSÃO LOGÍSTICA MÚLTIPLA COM ABCA7.

Variável Dependente	Variáveis Independentes Consideradas	Variáveis Independentes Confirmadas	z	p
MEEM de pacientes DA*	Codominância de T/G do SNP rs3764650	Codominância de T/G do SNP rs3764650	-2,628	0,0086
Idade de início de DA**	SNP rs3764650	SNP rs3764650	-1,969	0,0490
Tratamento para Colesterol***	Dominância de cada alelo, para todos os SNPs.	A/A + A/G em rs2279796	2,887	0,0039

* Valores do teste MEEM em pacientes com DA, variável transformada em binomial.

** Idade de início de sintomas da DA.

*** Indivíduos que fazem ou não controle dos níveis de colesterol.

Na regressão múltipla com a variável dependente o indivíduo fazer ou não o tratamento para controle dos níveis de colesterol (TABELA 10) o rs2279796 foi significativo, confirmando a dominância do alelo A (A/A + A/G – p = 0,0039) como variável independente sobre a amostragem que faz tratamento para colesterol. Essa informação só foi verificada na regressão e não nas comparações de frequências (TABELA 11).

TABELA 11 - COMPARAÇÕES DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO SNP rs2279796 ENTRE INDIVÍDUOS QUE NÃO REALIZAM TRATAMENTO PARA CONTROLE DOS NÍVEIS DE COLESTEROL (COL 0) E OS QUE FAZEM TRATAMENTO PARA O COLESTEROL (COL 1).

Genótipo	Col 0 % n= 155	Col 1 % n= 117	Col 0 X Col 1	Genótipo	Col 0 % n= 155	Col 1 % n= 117	Col 0 X Col 1
G/G	30,3	20,5	p=0,1836	G/G+G/A	74,8	72,6	p=0,6840
A/G	44,5	52,1		A/A	25,2	27,4	
A/A	25,2	27,4					
Alelo				G/G	30,3	20,5	p=0,0682
G	52,6	46,6		A/A+G/A	69,7	79,5	
A	47,4	53,4	p=0,1659				

6.3 ABCG1

No presente estudo foram genotipados os rs3827225 e rs692383 que correspondem a trocas de nucleotídeos de A para G, ambos situados em regiões intrônicas.

Uma das variáveis que testamos foi o tempo de progressão de doença do nosso grupo de pacientes. Essa informação tem um valor contínuo, de modo que foi avaliada sua distribuição, que não foi normal ($p = 4,57 \times 10^{-15}$). Assim como nas outras situações que isto ocorreu, a variável foi transformada em binomial utilizando o valor da mediana (3 anos). Na TABELA 12 observam-se as comparações das frequências genóticas do rs3827225 ($p = 0,0161$) e assim demonstrando que o genótipo A/A está mais frequente em pacientes a pouco tempo diagnosticados (com tempo de doença menor que três anos), tendo uma diferença significativa ($p = 0,0066$) que pode ser observada na distribuição do GRÁFICO 1. Também pode ser verificada uma maior incidência ($p=0,0215$) do genótipo A/A nos pacientes em estágio moderado e grave, a partir da avaliação do CDR (TABELA 12).

Na regressão realizada posteriormente com esses dados foi confirmado o resultado encontrado nas comparações de frequências para o rs3827225. A regressão (TABELA 13) constituiu em ter o tempo de doença como a variável dependente e variável independente confirma que na presença do genótipo A/A há uma diferença significativa ($p = 0,0117$), nos indivíduos com o tempo de doença menor que 3 anos. Assim como para variável dependente CDR houve a confirmação, com um valor de $p=0,0297$.

TABELA 12 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO SNP rs3827225 (ABCG1), COM VALORES CALCULADOS A PARTIR DO TEMPO DE DOENÇA.

T0* (%) n=75	T1* (%) n= 111	T0 X T1	T0 (%) n=75	T1 (%) n= 111	T0 X T1
G/G (53,3)	G/G (53,6)	p=0,0161	G/G+G/A (85,3)	G/G+G/A (96,4)	p=0,0066
G/A (32)	G/A (43,2)		A/A (14,7)	A/A (3,6)	
A/A (14,7)	A/A (3,2)				
CDR A (%) n= 46	CDR B (%) n= 111	CDR A X CDR B	CDR A (%) n= 46	CDR B (%) n= 111	CDR A X CDR B
G/G (47,8)	G/G (54,1)	p=0,0711	G/G+G/A (84,8)	G/G+G/A (95,5)	p=0,0215
G/A (37,0)	G/A (41,4)		A/A (15,2)	A/A (4,5)	
A/A (15,2)	A/A (4,5)	p=0,1269	G/G (47,8)	G/G (54,1)	p=0,4771
G (66,3)	G (74,8)		A/A+G/A (52,2)	A/A+G/A (45,9)	
A (33,7)	A (25,2)				

* T0 representa indivíduos com tempo de progressão da doença menor que 3 anos (mediana), T1 maior que 3 anos.

** CDR A são pacientes com DA leve e CDR B representa os pacientes com DA moderada e grave.

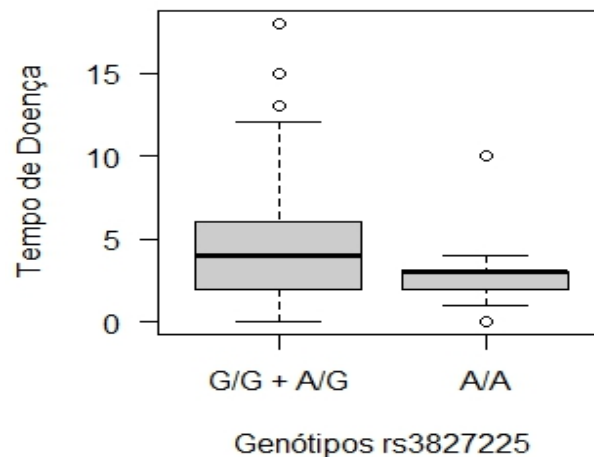


GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DA PROGRESSÃO DA DOENÇA ALZHEIMER NOS GENÓTIPOS G/G+A/G E A/A.

TABELA 13 - RESULTADO DA REGRESSÃO LOGÍSTICA MÚLTIPLA COM *ABCG1*.

Variável Dependente	Variável Independente	z	p
CDR*	A/A em rs3827225	-2,174	0,0297
Tempo de Doença**	A/A em rs3827225	-2,522	0,0117
MEEM de pacientes DA***	SNP rs692383	2,500	0,0124

* Progressão da DA, onde a moderada e a grave estão agrupadas e comparadas com a leve.

** Tempo de doença da DA, variável transformada em binomial.

*** Valores do teste MEEM em pacientes com DA, variável transformada em binomial.

Quanto a testes estatísticos relacionados com o rs692383 foi encontrada diferença significativa quando comparadas as frequências genotípicas ($p = 0,0372$) e alélicas ($p = 0,0120$) (TABELA 14). Estes resultados indicam que o alelo A pode estar associado com valores de MEEM maior que 15 pontos, também confirmado pela regressão ($p = 0,0124$) demonstrada na TABELA 13.

TABELA 14 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICA DO SNP rs692383 (*ABCG1*) COM OS VALORES DE MEEM DOS PACIENTES (DA).

MEEM 0 (%) n = 83	MEEM 1 (%) n = 83	MEEM 0 X MEEM 1
A/A (32,5)	A/A (48,2)	p = 0,0372
A/G (49,4)	A/G (44,6)	
G/G (18,1)	G/G (7,2)	
A (57,2)	A (70,5)	p = 0,0120
G (42,8)	G (29,5)	

* MEEM 0 representa os pacientes com o valor de MEEM menor que 15 pontos (mediana) e MEEM 1 valor maior que 15.

6.4 PREDIÇÕES DE RISCO

Os resultados que foram obtidos através das regressões descritos anteriormente foram confirmados com o PredictABEL.

Uma comparação de todos os SNPs dos genes transportadores ABC, deste estudo, com a presença do alelo E4 (*APOE*), tendo como variável dependente desenvolver ou não a DA, verificou-se um risco aumentado para indivíduos com a presença deste alelo (OR = 4,4092 e CI 2,4152 - 8,0496 – TABELA 15). A partir destes dados foi gerado o GRÁFICO 2 onde pode ser observado o aumento do risco nos pacientes quando comparado com o baixo risco dos controles idosos.

TABELA 15 - PRESENÇA DO ALELO E4 (*APOE*) AUMENTANDO RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA.

Variáveis	OR	CI	p
PRESENÇA E4	4,4092	2,4152 - 8,0496	0,0000
SNPs de transportadores ABC genotipados	Valores não significativos		

Outro resultado ainda tendo como variável dependente ter ou não a DA envolve o rs2230806 (*ABCA1*). Torna-se uma variável de risco quando possui genótipo T/T + T/C (OR = 2,0284 e CI 1,1249 - 3,6575), este resultado aparece quando são feitas as combinações de variáveis independentes da TABELA 16, e assim, estipulando a predição de risco nos grupos DA e CI no GRÁFICO 3. Por outro lado, se não envolvida a presença do alelo E4 os genótipos T/T + T/C se mantêm confirmados (OR = 1,7900 e CI 1,0421 – 3,0748), mas a predição de risco varia de forma diferenciada conforme o GRÁFICO 4.

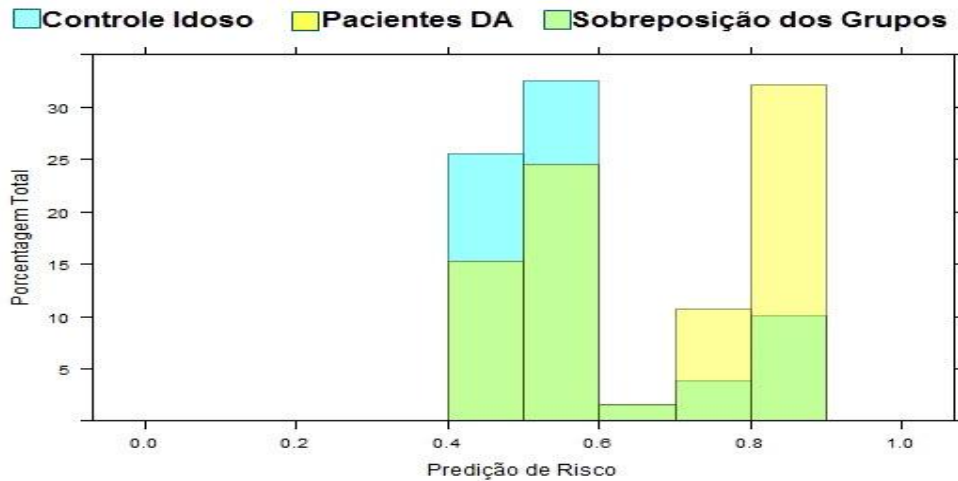


GRÁFICO 2 - PREDIÇÃO DE RISCO PARA DA E CI COM O ALELO E4 (APOE).

TABELA 16 - ALELO T DO rs2230806 (ABCA1) É PREDITOR DE RISCO PARA DA.

Variáveis	OR	CI	p
COLESTEROL*	0,5363	0,3069 - 0,9374	0,0287
rs2230806 C**	2,0043	0,7082 - 5,6723	0,1902
rs2230806 T***	2,0284	1,1249 - 3,6575	0,0187
PRESENÇA E4	6,7408	3,5051 12,9636	0,0000

* Realização de tratamento para colesterol ou não.

** Genótipos do rs2230806 agrupados como C/C + C/T e T/T.

*** Genótipos do rs2230806 agrupados como T/T +C/T e C/C.

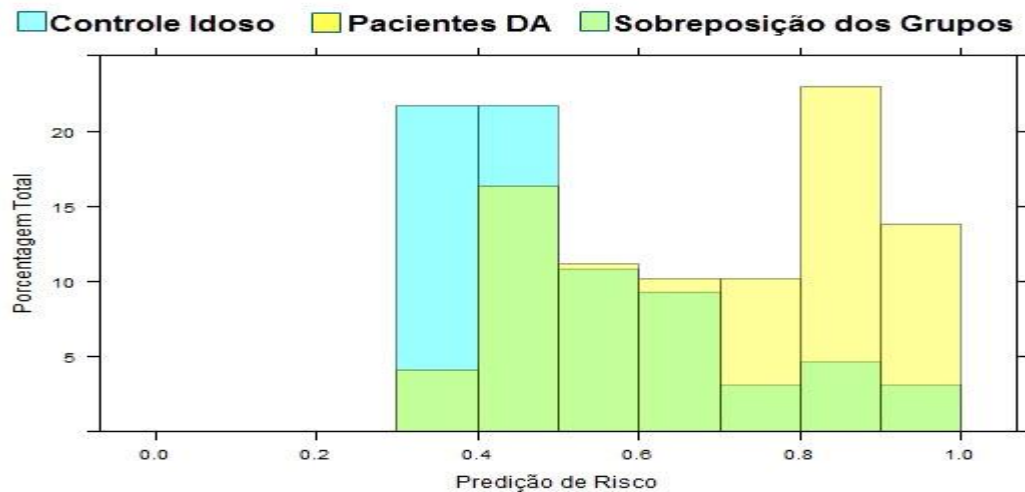


GRÁFICO 3 - PREDIÇÃO DE RISCO ENVOLVENDO COLESTEROL, PRESENÇA DE E4 E GENÓTIPOS DO rs2230806 (ABCA1) AGRUPADOS COMO T/T +C/T E C/C, EM DA E CI.

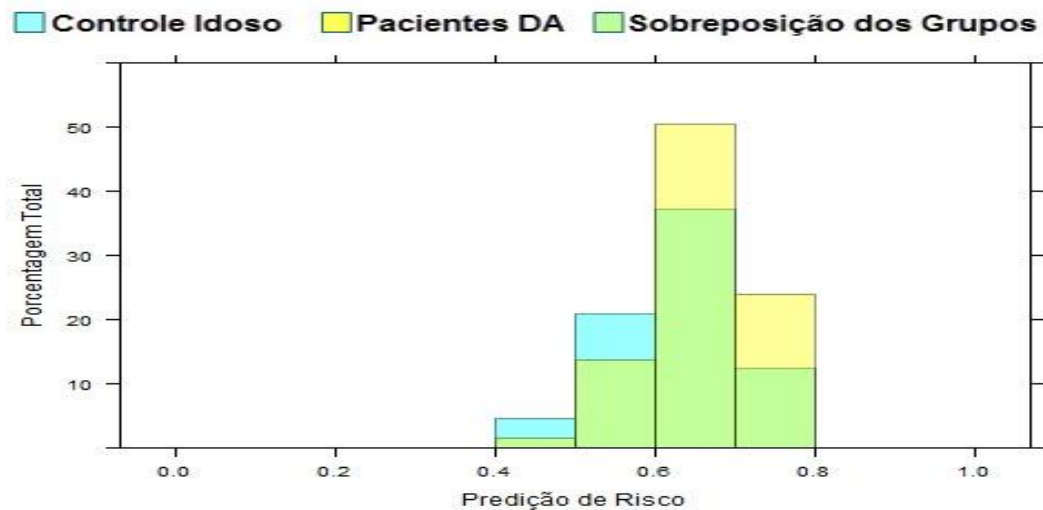


GRÁFICO 4 - PREDIÇÃO DE RISCO ENVOLVENDO COLESTEROL E GENÓTIPOS DO rs2230806 (ABCA1) AGRUPADOS COMO T/T +C/T E C/C, EM DA E CI.

Para variável dependente, idade de início da doença, foi corroborado que os rs1800977 (ABCA1) e rs3764650 (ABCA7) estão influenciando esta variável, conforme verificado na TABELA 17. Assim no GRÁFICO 5 observa-se a distribuição do risco onde os dois confirmados interferem.

TABELA 17 - IDADE DE ÍNICO DA DOENÇA INFLUENCIADA PELOS rs1800977 (ABCA1) E rs3764650 (ABCA7).

Variáveis	OR	CI	p
rs1800977	1,7707	1,0275 - 3,0515	0,0396
rs3764650	0,3765	0,1715 - 0,8268	0,0149
SNPs de transportadores ABC genotipados	Valores não significativos		

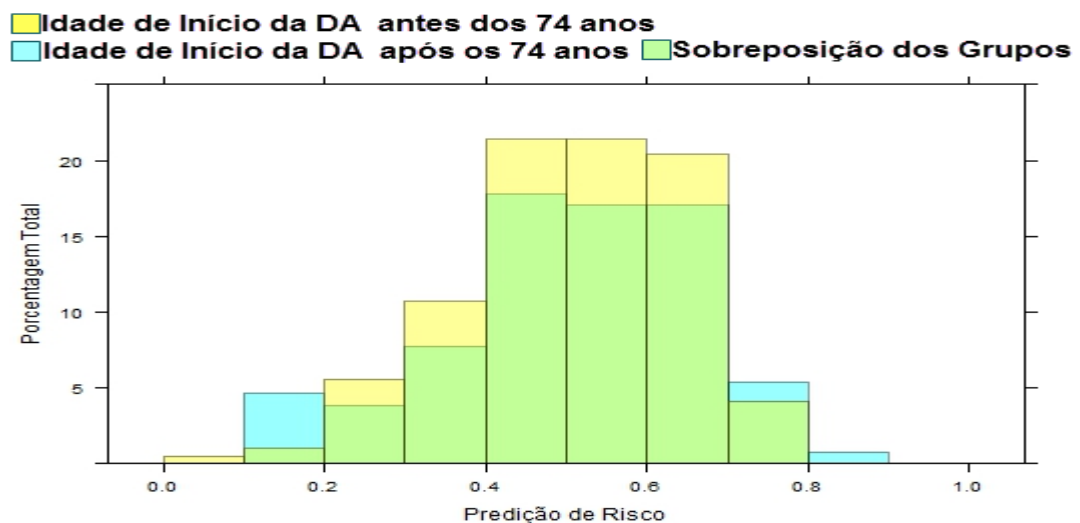


GRÁFICO 5 - PREDIÇÃO DE RISCO COM A INFLUÊNCIA DOS rs1800977 (ABCA1) E rs3764650 (ABCA7) NOS GRUPOS FORMADOS A PARTIR DA DIFERENÇA DE IDADE DO INÍCIO DA DOENÇA.

O rs2279796 (*ABCA7*) teve os genótipos A/A + A/G encontrados como significantes reafirmados a partir dos testes de predição de risco (TABELA 18) para indivíduos que fazem tratamento para controle dos níveis de colesterol. Onde o GRÁFICO 6 faz a disposição dos riscos nos grupos gerados a partir da variável dependente em questão.

TABELA 18 - rs2279796 (*ABCA7*) ASSOCIADO AO AUMENTO DO RISCO DE TRATAMENTO PARA CONTROLE DE NÍVEIS DE COLESTEROL.

Variáveis*	OR	CI	p
rs2279796 A	2,9412	1,4139 - 6,1185	0,0039
Dominância de cada alelo, para todos os SNPs			
Valores não significativos			

* Todos os SNPs representados com o alelo de dominância considerado.

Nos SNPs estudados para o *ABCG1* também foram corroborados como fatores de risco no tempo de progressão da doença o genótipo A/A do rs3827225 (TABELA 19) e para este mesmo quando verificado a predição de risco para CDR (TABELA 20), sendo representados pelos GRÁFICOS 7 e 8. No segundo SNP do *ABCG1*, o rs692383 interferindo nos valores de MEEM o rs692383 (TABELA 21), depois também foi gerado GRÁFICO 9 demonstrando a diferença de predição de risco.

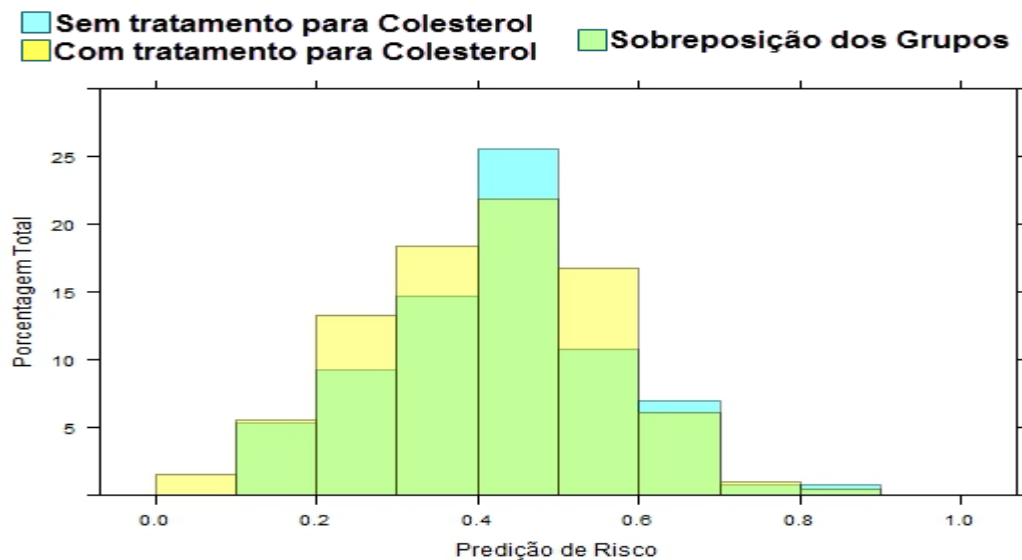


GRÁFICO 6 - DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS QUE FAZEM O TRATAMENTO PARA O COLESTEROL OU NÃO A PARTIR DA PREDIÇÃO DE RISCO E O ENVOLVIMENTO DOS GENÓTIPOS A/A + A/G DE rs2279796 (*ABCA7*).

TABELA 19 - O GENÓTIPO A/A DO rs3827225 (*ABCG1*) COMO FATOR DE RISCO NO TEMPO DE PROGRESSÃO DE DOENÇA.

Variáveis*	OR	CI	p
rs3827225 A/A	5,4917	1,5774 - 19,1191	0,0074
Dominância de cada alelo, para os SNPs estudados pra <i>ABCG1</i>	Valores não significativos		

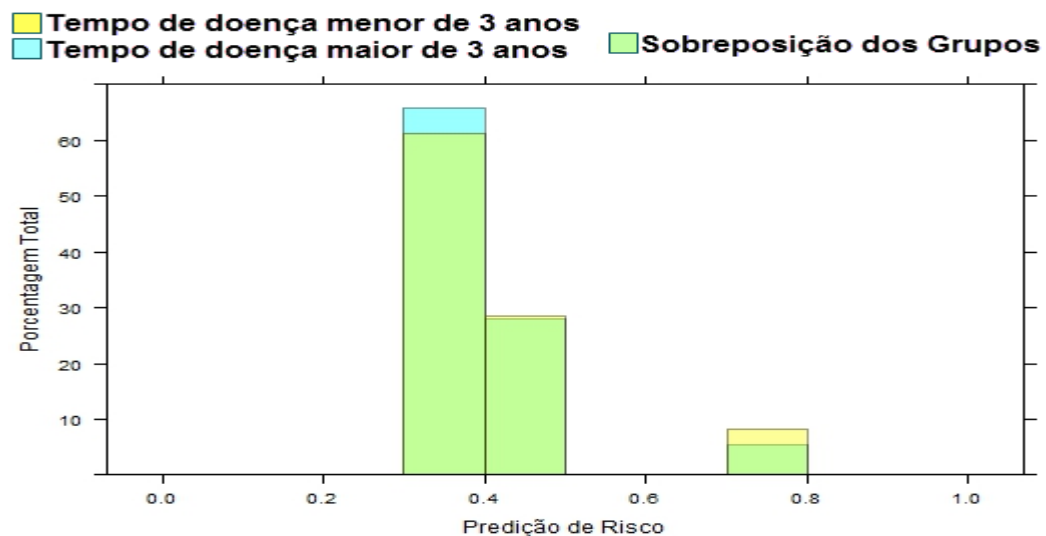
* Todos os SNPs representados com o alelo de dominância considerado.

TABELA 20 - O GENÓTIPO A/A DO rs3827225 (*ABCG1*) COMO FATOR DE RISCO NO VALOR DE CDR.

Variáveis	OR	CI	p
rs3827225 A/A	0,2473	0,0674 - 0,9073	0,0351
Dominância de cada alelo, para os SNPs estudados pra <i>ABCG1</i>	Valores não significativos		

TABELA 21 - INFLUÊNCIA DO rs692383 (*ABCG1*) NOS VALORES DE MEEM .

Variáveis*	OR	CI	p
SNPs de transportadores ABC genotipados	Valores não significativos		
rs692383	0,5528	0,3226 - 0,9472	0,031

GRÁFICO 7 - PREDIÇÃO DE RISCO NOS DOIS GRUPOS GERADOS A PARTIR DO TEMPO DE PROGRESSÃO DA DOENÇA, SENDO UM FATOR DE RISCO O GENÓTIPO A/A DE rs3827225 (*ABCG1*).

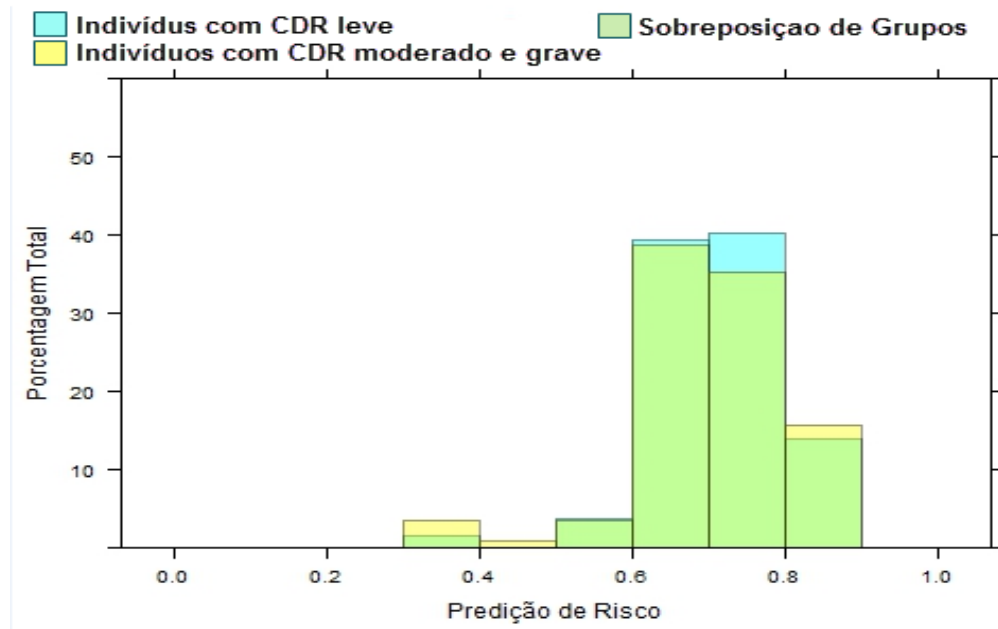


GRÁFICO 8 - PREDIÇÃO DE RISCO NOS DOIS GRUPOS GERADOS A PARTIR DO VALOR DE CDR, OBSERVANDO O GENÓTIPO A/A DE rs3827225 (ABCG1).

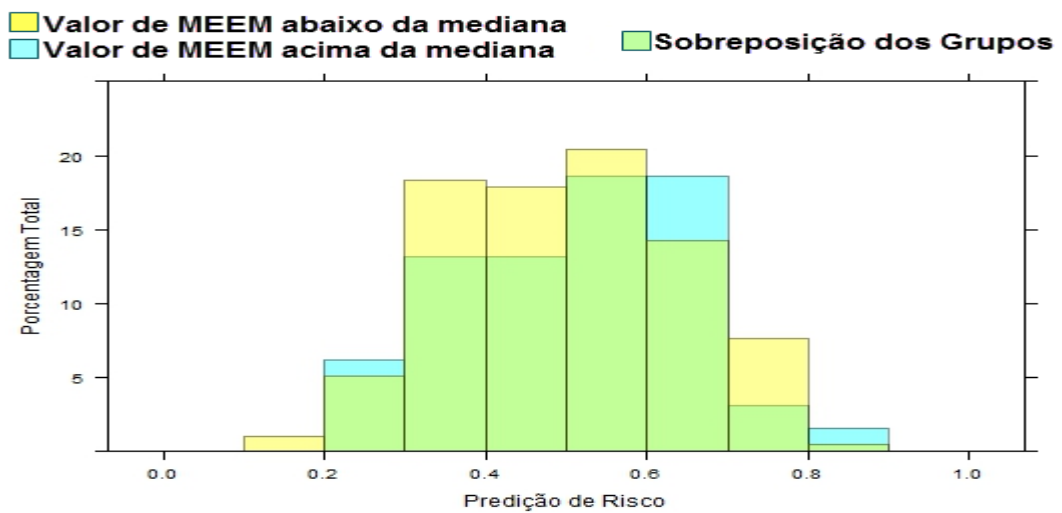


GRÁFICO 9 - VARIAÇÃO DOS VALORES DE MEEM SOBRE INFLUENCIA DE rs692383 (ABCG1).

7 DISCUSSÃO

Há uma estimativa de que no ano de 2050 em torno de 13 milhões de pessoas desenvolvam a Doença de Alzheimer, principalmente porque a população idosa de 85 anos ou mais terá aumentado para 7 milhões (HERBERT *et al.*, 2013). Como a doença é considerada multifatorial, então acúmulos de fatores ambientais, fisiológicos e genéticos são investigados para compreender o desenvolvimento e progressão da DA.

O nosso trabalho verificou um aumento significativo do alelo E4 (*APOE*) em pacientes com DA esporádica. Esse resultado corrobora com estudos em que o fator de risco genético mais aceito é a presença do alelo E4 da apolipoproteína E (STRITTMATTER *et al.*, 1993). Entretanto, sabidamente o alelo E4 não é necessário e nem suficiente para causar DA, mas este interfere na antecipação e no desenvolvimento da doença (OJOPI *et al.*, 2004). A partir destas informações, foi possível confirmar que as predições de risco realizadas em nosso trabalho, confirmando que a presença do alelo E4 aumenta o risco.

O desenvolvimento e a progressão da doença estão ligados de alguma forma com a regulação do metabolismo de colesterol (SATO; MORISHITA, 2015). Os resultados encontrados verificaram a influência das variações dos genes *ABCA1*, *ABCA7* e *ABCG1* na DA, considerando o início da doença, progressão, valores de teste cognitivo (MEEM) e com tratamento de colesterol.

Sobre a predição de risco foi possível verificar como variáveis distintas podem modificar as possibilidades de risco dentro de diferentes grupos. Isso pôde ser identificado quando verificados os fatores que poderiam influenciar na idade de início da DA. Foi verificado o rs1800977 (*ABCA1*) e o rs3764650 (*ABCA7*) associados com esta variável dependente, porém a combinação de alelos pode levar a diferentes riscos para a menor idade de início da DA.

O SNP rs2230806 (*ABCA1*) é também conhecido como R219K, pelas trocas de aminoácidos na posição 219 da proteína. Essa variação pode interferir nos níveis de colesterol do fluido cérebro-espinhal e assim interferindo no desenvolvimento da DA (WOLLMER *et al.*, 2003). Nosso estudo verificou que a presença do alelo T é um fator de risco, confirmado pela predição de risco para desenvolvimento da DA. Um

resultado similar a este foi encontrado por Sundar *et al.* (2007) onde esse alelo (219K) está associado com o risco da DA em mulheres.

As funções específicas da Abca1 ainda não estão bem definidas, sabe-se da sua importância e interferência no efluxo de colesterol, tanto cerebral quanto no fígado e intestino (LAWN *et al.*, 2001; QUAZI; MOLDAI, 2011). Dentro do que já foi verificado, esta proteína transportadora está ligada a expressão de *APOE* no cérebro (HIRSCH-REINSHAGEN *et al.*, 2004; WAHRLE *et al.*, 2004), e por consequência ao processo de formação de β A, assim influenciando no risco da DA (HIRSCH-REINSHAGEN *et al.*, 2009; SATO *et al.*, 2015).

Essas interferências que *ABCA1* tem sobre apoE podem explicar o resultado deste estudo onde a variação do rs1800977, pois está na região 5'UTR do gene podendo assim estar associada a regulação da expressão deste gene. A ligação com a idade de início da DA, demonstrando-se como um fator de risco. Portanto, as alterações na quantidade da proteína transportadora podem antecipar o acúmulo neurotóxico de β A.

Muitas das respostas sobre Abca1 vieram de estudos *in vitro*. Em 2004 Liang e colaboradores verificaram a partir de células de ratos que o receptor de retinóide X (RXR do inglês *retinoid X receptor*), um receptor nuclear que atua como fator de transcrição alterando a expressão de genes responsivos ao ácido retinóico (COELHO *et al.*, 2003); aumenta claramente a expressão de *APOE* e do transportador de colesterol Abca1 (LIANG *et al.*, 2004). A partir de estudos neste sentido, outros confirmaram estes resultados e ainda verificaram que a proteína Abcg1 também está envolvida na expressão de *APOE* (KARTEN *et al.*, 2006; BOEHM-CAGAN; MICHAELSON, 2014; JASMIN *et al.*, 2014; TAI *et al.*, 2014).

Perante as variações genótípicas dos SNPs do gene *ABCG1* foram verificados resultados significativos com a variação no teste cognitivo MEEM, o tempo da DA e o nível de progressão. O gene *ABCG1*, juntamente com os genes *TOMM40*, *APOE* e *MEF2C* foi associado, em uma meta-análise, com o declínio cognitivo DA e outras demências em idade avançada (DAVIES *et al.*, 2015). Uma hipótese de como as alterações de *ABCG1* podem interferir na cognição dos pacientes, esta correlacionada à homeostase do colesterol cerebral, sendo uma proteína responsável por transportar colesterol (TANSLEY *et al.*, 2007), o desequilíbrio desta pode ocasionar a produção de β A e hiperfosforilação da proteína Tau (REITZ., 2013; LIU; ZHANG, 2014; SATO; MORISHITA, 2015). Assim,

interferindo nas sinapses neuronais e morte neuronal, explicando como o alelo A do rs692383 possa desempenhar uma função protetiva atrás de alterações derivadas de *splicing* alternativo. Podendo ser confirmada segundo a predição de risco envolvendo este SNP e os valores de MEEM.

Quanto ao resultado de tempo de doença relacionado com a *Abcg1*, pode estar associada a função da proteína em transportar colesterol ligado ao HDL (*high-density lipoproteins*) (WANG *et al.*, 2004). A partir desta informação pode-se inferir que alterações na formação da proteína *Abcg1* podem levar ao descontrole dos níveis de HDL livres e/ou cerebrais. Como reportado por Chistaiakov e colaboradores que alterações desta proteína podem levar ao desenvolvimento de doenças coronarianas, como aterosclerose, ou por outro lado ser considerada como um fator protetivo (CHISTIAKOV *et al.*, 2016). Portanto, a interferência dos genótipos no tempo da DA, encontrada por nossos estudos associada com o genótipo A/A do rs3827225, pode estar ligada ao desencadeamento de doenças diferentes das neuronais, podendo levar o paciente a óbito por doenças secundárias a demência. Além disso, as frequências do genótipo A/A do rs3827225 quando avaliados pelo nível clínico da progressão da DA, a partir do CDR, foram observadas a distribuição no mesmo sentido que o tempo de diagnóstico da DA, conforme era esperado.

A progressão da DA também pode estar ligada com a *Abcg1* pelo descontrole do colesterol cerebral, fazendo com que a doença tenha um avanço mais agressivo dependendo da variante presente no gene. Essas informações podem ser confirmadas por estudos que verificaram que o desequilíbrio do colesterol altera o acúmulo de β A e emaranhados neurofibrilares, aumentando a neurotoxicidade e perda sináptica cerebral (SATO; MORISHITA, 2015).

Os resultados do nosso estudo para os SNPs do gene *ABCA7* foram a direções diferentes, mostrando que por mais que estejam em desequilíbrio de ligação os resultados do rs3764650 foram relacionados com a variação dos valores de MEEM e da idade de início da doença, enquanto que o rs2279796 foi associado ao controle dos níveis de colesterol. É possível justificar estes resultados a partir dos achados já descritos na literatura científica, os quais descrevem resultados relacionados ao metabolismo de colesterol, resposta imune e funções sinápticas. A expressão do *ABCA7* pode ser regulada por proteínas de ligação ao elemento regulatório de esterol (IWAMOTO *et al.*, 2006), justificando o envolvimento da proteína *Abca7* com o efluxo de colesterol.

As funções da *Abca7* ainda não estão muito claras, porém sabe-se que este gene participa da formação do HDL, gera pequenas partículas de HDL pobres em colesterol e fosfolípidios (ABE-DOHMAE *et al.*, 2006). Assim, podemos concluir que os resultados da regressão onde ‘tratamento para colesterol’ e a ‘presença do alelo A no SNP rs2279796’ foram verificadas, se justifica porque de acordo com algumas funções da proteína *Abca7* ela está envolvida no metabolismo lipídico, e se esta estiver alterada, por exemplo, através de *splicings* alternativos que este SNP pode ocasionar, poderá interferir nos níveis de colesterol de cada indivíduo. Verificando essa informação, Quazi e Molday publicaram em 2013 um estudo confirmando bioquimicamente o transporte de fosfolípidios e colesterol através das proteínas *Abca1*, *Abca7* e *Abca4* (selecionadas por ter certa homologia entre elas) influenciando no efluxo de colesterol (QUAZI; MOLDAY, 2013).

Na DA, o gene *ABCA7* tem sido citado por diversos estudos nos últimos anos (ALLEN *et al.*, 2012; KARCH *et al.*, 2012; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2013). Em estudo com ratos pôde-se verificar que a parte do cérebro onde há uma grande expressão de *ABCA7* é no hipocampo (KIM *et al.*, 2005), assim podemos entender o envolvimento desta proteína na DA, pois é a região cerebral primeiramente atingida. Também foi verificado que o aumento na expressão do *ABCA7* diminui o risco da DA, enquanto que o SNP rs3764650T interfere aumentando a expressão do gene (VASQUEZ *et al.*, 2013). Em 2015 Satoh e colaboradores publicaram um estudo onde observaram que a perda da função do *ABCA7* interfere na clivagem de APP e aumenta a produção de β A (SATOH *et al.*, 2015). Outro trabalho com objetivo similar, sugeriu que a haploinsuficiência no *ABCA7* influencia na fisiopatologia da DA (CUYVERS *et al.*, 2015). Considerando estas informações podemos justificar os nossos resultados em que ocorreram diferenças nos valores dos testes cognitivos (MEEM) aplicados nos pacientes e a idade de início dos mesmos, baseados na cascata amilóide.

Sobre a influência do gene *ABCA7* no declínio cognitivo há estudo que corroboram os nossos achados. KARCH *et al.* (2012) verificaram a expressão de genes associados a DA por estudos GWAS e encontraram três deles (*ABCA7*, *CD33* e *CR1*) correlacionados com o déficit cognitivo, sendo que o nível de expressão de *ABCA7* estando elevado, aumenta o declínio cognitivo do paciente (KARCH *et al.*, 2012). Uma interação do rs3764650 e a presença do alelo E4 do gene *APOE* foram

relacionadas entre fatores cognitivos, sendo explicados pelas suas influências na via de colesterol que leva ao desenvolvimento da DA (ENGELMAN *et al.*, 2013).

Outra via de desenvolvimento da DA na qual *ABCA7* está envolvido é a do sistema imune. Esta proteína pode ser citada como uma potenciadora fagocitária, facilitando a sinalização celular (ZHAO *et al.*, 2015), por tanto se os fagócitos não conseguem exercer a função de limpar as células apoptóticas, pode induzir a inflamação que é um forte agente patogênico na DA (FERREIRA *et al.*, 2014; VILLEGAS-LLERENA *et al.*, 2016). Desta maneira, podemos elucidar os resultados encontrados no nosso estudo em que o *ABCA7* pode estar envolvido no desenvolvimento da Doença de Alzheimer, através da via de inflamações e não somente com o metabolismo de colesterol.

Além das formas citadas até o momento, há também outra forma que o desequilíbrio do colesterol do cérebro vem sendo citado por estudos com lipidomas, tendo como definição a caracterização completa das moléculas lipídicas e das suas funções biológicas no que diz respeito à expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de lipídios, incluindo a regulação dos genes. Estes estudos dão grande atenção à integridade das membranas lipídicas, onde o colesterol está presente nas estruturas dinâmicas dos neurônios e células da glia (NAUDÍ *et al.*, 2015). Podendo interferir na liberação de íons necessários para as sinapses, apoptoses e neurogênese (PIOMELLI *et al.*, 2007). Também são encontradas reduções das conversões do colesterol para produtos de oxidação do colesterol e seu subsequente transporte para fora do cérebro para a circulação através do Líquido Cefalorraquidiano na AD e, portanto, causando uma falha na homeostase do colesterol do cérebro em indivíduos afetados (XIANG *et al.*, 2015).

A partir destas informações pode-se sugerir que as alterações nas proteínas *Abca1*, *Abca7* e *Abcg1*, por consequência das suas ligações com o colesterol, podem levar ao desequilíbrio dos lipidomas. Assim levando a uma hipótese de que a não homeostase do colesterol cerebral pode interferir em vias diferentes do que a deposição de β A.

Portanto, no estudo que realizamos pode-se verificar que há influência das variações dos genes *ABCA1*, *ABCA7* e *ABCG1* na DA. Porém, apesar das hipóteses mostrarem uma direção de como estas diferenças podem agir no metabolismo do colesterol, e por consequência no desenvolvimento e progressão da DA, ainda são necessários estudos que consigam identificar melhor as interferências patológicas

destas proteínas, e se as proteínas transportadoras também não podem interferir em outras vias diferentes do metabolismo de colesterol ou ainda qual o nível de interação destas vias.

8 CONCLUSÕES

1. A presença do alelo E4 (*APOE*) é significativamente maior em pacientes com a Doença de Alzheimer comparado com o grupo de controle idoso.
2. Os genótipos T/T+T/C do rs2230806 (*ABCA1*) estão associados a DA quando analisados em conjunto com o tratamento para colesterol.
3. A idade de início da DA obteve relação com dois SNPs, o rs1800977 do gene *ABCA1* e o rs3764650 do *ABCA7*, e dependendo da combinação alélica podem ser inferidos como fatores protetivos ou não.
4. Avaliando os indivíduos que fazem ou não o tratamento para controle dos níveis de colesterol o rs2279796 (*ABCA7*) com os genótipos A/A + A/G estão em frequência maior em quem faz tratamento para colesterol.
5. Os valores elevados de MEEM em pacientes foram associados com o rs692383 (*ABCG1*) tanto nas frequências alélicas quanto nas genotípicas na presença do alelo A, e confirmadas na regressão. Outra associação com o SNP rs3764650 (*ABCA7*) que obteve frequência maior do genótipo T/T nos pacientes com valor de MEEM menor que 15 pontos.
6. O tempo da DA foi relacionada com o rs3827225 (*ABCG1*) mostrando que o genótipo A/A está mais frequente em pacientes com tempo de diagnóstico menor que 3 anos e também em indivíduos com DA classificada como leve. Assim mostrando que a presença deste genótipo está ligado ao grupo primário de pacientes.
7. As predições de risco possibilitaram verificar quais as variáveis podem ser importantes para o prognóstico do desenvolvimento e nas diferentes agressividades das progressões da DA.

REFERÊNCIAS

ABE-DOHMAE, S.; UEDA, K.; YOKOYAMA, S. ABCA7, a molecule with unknown function. **FEBS Lett**, v. 580, n. 4, p. 1178-82, 2006.

ABUZNAIT, A.H.; KADDOUMI, A. Role of ABC transporters in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **ACS Chem Neurosci**, v. 21, n.3, p. 820-31, 2012.

ALLEN, M.; ZOU, F.; CHAI, H.S.; YOUNKIN, C.S.; CROOK, J., *et al.* Novel late-onset Alzheimer disease loci variants associate with brain gene expression. **Neurology**, v. 17, n. 79(3), p. 221-8, 2012.

ALLINQUANT, B.; CLAMAGIRAND, C.; POTIER, M.C. Role of cholesterol metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 17, n. 4, p. 319-23, 2014.

ALUISE, C.D.; SOWELL, R.A.; BUTTERFIELD, D.A. Peptides and proteins in plasma and cerebrospinal fluid as biomarkers for the prediction, diagnosis, and monitoring of therapeutic efficacy of Alzheimer's disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1782, n. 10, p. 549-58, 2008.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION (2016). Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.*; v. 10. Available at <http://www.alz.org/> (Acesso em 07/01/2016)

APA - American Psychiatric Association (2014). Diagnostic and statistical manual of mental disorders - 5th edition (DMS-5). <http://www.dsm5.org/about/Pages/DSMVOverview.aspx>

BOEHM-CAGAN, A.; MICHAELSON, D.M. Reversal of apoE4-driven brain pathology and behavioral deficits by bexarotene. **J Neurosci**, v. 34, n. 21, p. 7293-301, 2014.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. **Acta Neuropathol**, v. 82, n. 4, p. 239-59, 1991.

BRUCKI, S.M.; NITRINI, R.; CARAMELLI, P.; BERTOLUCCI, P.H.; OKAMOTO, I.H. Suggestions for utilization of the mini-mental state examination in Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 61, n. 3B, p. 777-81, 2003.

BROCCARDO, C.; OSORIO, J.; LUCIANI, M.F.; SCHRIML, L.M.; PRADES, C., *et al.* Comparative analysis of the promoter structure and genomic organization of the human and mouse ABCA7 gene encoding a novel ABCA transporter. **Cytogenet Cell Genet**, v. 92, n. 3-4, p. 264-70, 2001.

CAIXETA, L., *et al.* Doença de Alzheimer. Porto Alegre: Artemed, 2012. 504 p.

CAMPION, D.; DUMANCHIN, C.; HANNEQUIN, D.; DUBOIS, B.; BELLIARD, S., *et al.* Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. **Am J Hum Genet**, v. 65, n. 3, p. 664-70, 1999.

CARAMELLI, P.; BARBOSA, M.T. Como diagnosticar as quatro causas mais frequentes de demência? **Rev Bras Psiquiatr**, v. 24, n. Supl I, p. 7-10, 2002.

CHEN, H.; ROSSIER, C.; LALIOTI, M.D.; LYNN, A.; CHAKRAVARTI, A., *et al.* Cloning of the cDNA for a human homologue of the Drosophila white gene and mapping to chromosome 21q22.3. **Am J Hum Genet**, v. 59, n. 1, p. 66-75, 1996.

CHISTIYAKOV DA, BOBRYSHV YV, OREKHOV AN. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. **J Cell Mol Med**, v. 20, n. 1, p. 17-28, 2016.

COELHO, S. M.; CORBO, R.; BUESCU, A.; CARVALHO, D.P.; VAISMAN, M. Ácido Retinóico: Uma terapia promissora para carcinoma tireoideano desdiferenciado? **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 47, n. 2, p. 190-97, 2003.

CREWS, L.; MASLIAH, E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Hum Mol Genet**, v. 15, n. 19(R1), p. R12-20, 2010.

CUYVERS, E.; DE ROECK, A.; VAN DEN BOSSCHE, T.; VAN CAUWENBERGHE, C.; BETTENS, K.; *et al.* Mutations in ABCA7 in a Belgian cohort of Alzheimer's disease patients: a targeted resequencing study. **Lancet Neurol**, v. 14, n. 8, p. 814-22, 2015.

DAVIES, G.; ARMSTRONG, N.; BIS, J.C.; BRESSLER, J.; CHOURAKI, V.; *et al.* Genetic contributions to variation in general cognitive function: a meta-analysis of genome-wide association studies in the CHARGE consortium (N=53949). **Mol Psychiatry**, v. 20, n. 2, p. 183-92, 2015.

DEAN, M.; HAMON, Y.; CHIMINI, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **J Lipid Res**, v. 42, n. 7, p. 1007-17, 2001.

DEAN, M. The genetics of ATP-binding cassette transporters. **Methods Enzymol**, v. 400, p. 409-29, 2005.

DIETSCHY, J.M.; TURLEY, S.D. Cholesterol metabolism in the brain. **Curr Opin Lipidol**, v. 12, n. 2, p. 105-12, 2001.

ENGELHARDT, E.; BRUCKI, S.M.; CAVALCANTI, J.L.; FORLENZA, O.V.; LAKS, J.; VALE, F.A. Departamento de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. Recomendações e sugestões do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 63, n. 4, p. 1104-12, 2005.

ENGELMAN, C.D.; KOSCIK, R.L.; JONAITIS, E.M.; OKONKWO, O.C.; HERMANN, B.P.; *et al.* Interaction between two cholesterol metabolism genes influences memory: findings from the Wisconsin Registry for Alzheimer's Prevention. **J Alzheimers Dis**, v. 36, n. 4, p. 749-57, 2013.

ENSEMBL: <http://www.ensembl.org/index.html>. Acessado em 06/10/2015.

FERREIRA, S.T.; CLARKE, J.R.; BOMFIM, T.R.; DE FELICE, F.G. Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement**, v. 10, n. 1S, p. S76-83, 2014.

FROTA, N.A.F.; NITRINI, R.; DAMASCENO, B.P.; FORLENZA, O.V.; DIAS-TOSTA E., *et al.* Criteria for the diagnosis of Alzheimer s disease. Recommendations of the Scientific Department of Cognitive Neurology and Aging of the Brazilian Academy of Neurology. **Dementia & neuropsychologia**, v. 5, p. 146-152, 2011.

GALIMBERTI, D.; SCARPINI, E. Progress in Alzheimer's disease. **J Neurol**, v. 259, n. 2, p. 201-11, 2012.

GENETICS: Gregory Warnes, with contributions from Gregor Gorjanc, Friedrich Leish and Michael Man. Genetics: Population Genetics, **R package version 1.3.8.1**, 2013. <https://CRAN.R-project.org/package=genetics>

GROSSBERG, G.T. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. **Curr Ther Res Clin Exp**, v. 64, n. 4, p. 216-35, 2003.

HEBERT, L.E.; WEUVE, J.; SCHERR, P.A.; EVANS, D.A. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. **Neurology**, v. 80, n. 19, p. 1778-83, 2013.

HIGGINS, C.F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annu Rev Cell Biol**, v. 8, p. 67-113, 1992.

HIRSCH-REINSHAGEN, V.; ZHOU, S.; BURGESS, B.L.; BERNIER, L.; MCISAAC, S.A., *et al.* Deficiency of ABCA1 impairs apolipoprotein E metabolism in brain. **J Biol Chem**, v. 24, n. 279(39), p. 41197-207, 2004.

HIRSCH-REINSHAGEN, V.; WELLINGTON, C.L. Cholesterol metabolism, apolipoprotein E, adenosine triphosphate-binding cassette transporters, and Alzheimer's disease. **Curr Opin Lipidol**, v. 18, n. 3, p. 325-32, 2007.

HIRSCH-REINSHAGEN, V.; BURGESS, B.L.; WELLINGTON, C.L. Why lipids are important for Alzheimer disease? **Mol Cell Biochem**, v. 326, n. 1-2, p. 121-9, 2009.

HOLLINGWORTH, P.; HAROLD, D.; SIMS, R.; GERRISH, A.; LAMBERT, J.C., *et al.* Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. **Nat Genet**, v. 43, n. 5, p. 429-35, 2011.

IWAMOTO, N.; ABE-DOHMAE, S.; SATO, R.; YOKOYAMA, S. ABCA7 expression is regulated by cellular cholesterol through the SREBP2 pathway and associated with phagocytosis. **J Lipid Res**, v. 47, n. 9, p. 1915-27, 2006.

JASMIN, S.B.; PEARSON, V.; LALONDE, D.; DOMENGER, D.; THÉROUX, L.; POIRIER, J. Differential regulation of ABCA1 and ABCG1 gene expressions in the remodeling mouse hippocampus after entorhinal cortex lesion and liver-X receptor agonist treatment. **Brain Res**, v. 8, n. 15621, p. 39-51, 2014.

JEHLE, A.W.; GARDAI, S.J.; LI, S.; LINSEL-NITSCHKE, P.; MORIMOTO, K., *et al.* ATP-binding cassette transporter A7 enhances phagocytosis of apoptotic cells and associated ERK signaling in macrophages. **J Cell Biol**, v. 14, n. 174(4), p. 547-56, 2006.

KAMINSKI, W.E.; ORSÓ, E.; DIEDERICH, W.; KLUCKEN, J.; DROBNIK, W.; SCHMITZ, G. Identification of a novel human sterol-sensitive ATP-binding cassette transporter (ABCA7). **Biochem Biophys Res Commun**, v. 5, n. 273(2), p. 532-8, 2000.

KAMINSKI, W.E.; PIEHLER, A.; WENZEL, J.J. ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1762, n. 5, p. 510-24, 2006.

KARCH, C.M.; JENG, A.T.; NOWOTNY, P.; CADY, J.; CRUCHAGA, C.; GOATE, A.M. Expression of novel Alzheimer's disease risk genes in control and Alzheimer's disease brains. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e50976, 2012.

KARTEN, B.; CAMPENOT, R.B.; VANCE, D.E.; VANCE, J.E. Expression of ABCG1, but not ABCA1, correlates with cholesterol release by cerebellar astroglia. **J Biol Chem**, v. 17, n. 281(7), p. 4049-57, 2006.

KIM, W.S.; FITZGERALD, M.L.; KANG, K.; OKUHIRA, K.; BELL, S.A.; *et al.* Abca7 null mice retain normal macrophage phosphatidylcholine and cholesterol efflux activity despite alterations in adipose mass and serum cholesterol levels. **J Biol Chem**, v. 280, n. 5, p. 3989-95, 2005.

KIM, W.S.; GUILLEMIN, G.J.; GLAROS, E.N.; LIM, C.K.; GARNER, B. Quantitation of ATP-binding cassette subfamily-A transporter gene expression in primary human brain cells. **Neuroreport**, v. 26, n. 17(9), p. 891-6, 2006.

KUNDU S, AULCHENKO YS, VAN DUIJN CM, JANSSENS AC. PredictABEL: an R package for the assessment of risk prediction models. **Eur J Epidemiol**, v. 26, n. 4, p. 261-4, 2011.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, J.I.JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res**, v. 11, n. 19(19), p. 5444, 1991.

LAMBERT, J.C.; IBRAHIM-VERBAAS, C.A.; HAROLD, D.; NAJ, A.C.; SIMS, R., *et al.* Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. **Nat Genet**, v. 45, n. 12, p. 1452-8, 2013.

LANGMANN, T.; KLUCKEN, J.; REIL, M.; LIEBISCH, G.; LUCIANI, M.F., *et al.* Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1):

evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 2, n. 257(1), p. 29-33, 1999.

LAWN, R.M.; WADE, D.P.; COUSE, T.L.; WILCOX, J.N. Localization of human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1) in normal and atherosclerotic tissues. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, n. 3, p. 378-85, 2001.

LI, G.; GU, H.M.; ZHANG, D.W. ATP-binding cassette transporters and cholesterol translocation. **IUBMB Life**, v. 27, 2013.

LIANG, Y.; LIN, S.; BEYER, T.P.; ZHANG, Y.; WU, X.; BALES, K.R.; *et al.* A liver X receptor and retinoid X receptor heterodimer mediates apolipoprotein E expression, secretion and cholesterol homeostasis in astrocytes. **J Neurochem**, v. 88, n. 3, p. 623-34, 2004.

LIDDELL, M.; WILLIAMS, J.; BAYER, A.; KAISER, F.; OWEN, M. Confirmation of association between the e4 allele of apolipoprotein E and Alzheimer's disease. **J Med Genet**, v. 31, n. 3, p. 197-200, 1994.

LIU, Q.; ZHANG, J. Lipid metabolism in Alzheimer's disease. **Neurosci Bull**, v. 30, n. 2, p. 331-45, 2014.

LOGGE, W.; CHENG, D.; CHESWORTH, R.; BHATIA, S.; GARNER, B.; *et al.* Role of Abca7 in mouse behaviours relevant to neurodegenerative diseases. **PLoS One**, v.7, n. 9, p. 1-9, 2012.

LOGIUDICE, D. Dementia: an update to refresh your memory. **Intern Med J**, v. 32, n. 11, p. 535-40, 2002.

LUCIANI, M.F.; DENIZO, T.F.; SAVARY, S.; MATTEI, M.G.; CHIMINI, G. Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. **Genomics**, v. 1, n. 21(1), p. 150-9, 1994.

MCKHANN, G.; DRACHMAN, D.; FOLSTEIN, M.; KATZMAN, R.; PRICE, D.; STADLAN, E.M. 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**, v. 34, n. 7, p. 939-44, 1984.

MEDWAY, C.; MORGAN, K. The genetics of Alzheimer's disease; putting flesh on the bones. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 40, n. 2, p. 97-105, 2014.

MOITRA, K.; DEAN, M. Evolution of ABC transporters by gene duplication and their role in human disease. **Biol Chem**, v. 392, n. 1-2, p. 29-37, 2011.

MORGAN, K. The three new pathways leading to Alzheimer's disease. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 37, n. 4, p. 353-7, 2011.

MORRIS, J.K.; HONEA, R.A.; VIDONI, E.D.; SWERDLOW, R.H.; BURNS, J.M. Is Alzheimer's disease a systemic disease? **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 9, p. 1340-1349, 2014.

MOSER, V.A.; PIKE, C.J. Obesity and sex interact in the regulation of Alzheimer's disease. **Neurosci Biobehav Rev**. 2015.

NAUDÍ, A.; CABRÉ, R.; JOVÉ, M.; AYALA, V.; GONZALO, H.; *et al.* Lipidomics of human brain aging and Alzheimer's disease pathology. **Int Rev Neurobiol**, v. 122, p. 133-89, 2015.

NORDESTGAARD, L.T.; TYBJÆRG-HANSEN, A.; NORDESTGAARD, B.G.; FRIKKE-SCHMIDT, R. Loss-of-function mutation in ABCA1 and risk of Alzheimer's disease and cerebrovascular disease. **Alzheimers Dement**, v. 11, n. 12, p. 1430-8, 2015.

NORTEST: Juergen Gross and Uwe Ligges. Nostest: Tests for Normality, **R package version 1.0-4**, 2015. <https://CRAN.R-project.org/package=nortest>

OLAISEN, B.; TEISBEG, P.; GEDDE-DAHL, JR.T. The locus for apolipoprotein E (apoe) is linked to the complement C3 (C3) locus on chromosome 19 in man. **Hum Genet**, v 62, p. 233-236, 1982.

OJOPI, E.B.; BERTONCINI, A.B.; DIAS, NETO. E. Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer. **Rev Psiquiatr Clín**, v. 31, n. 1, p. 26-33, 2004.

PAHNKE, J.; LANGER, O.; KROHN, M. Alzheimer's and ABC transporters – new opportunities for diagnostics and treatment. **Neurobiol Dis**, v. 16, n. 14, p. 83-7, 2014.

PIEHLER, A.P.; OZCÜRÜMEZ, M.; KAMINSKI, W.E. A-Subclass ATP-Binding Cassette Proteins in Brain Lipid Homeostasis and Neurodegeneration. **Front Psychiatry**, v. 5, n. 3, p. 17, 2012.

PIOMELLI, D.; ASTARITA, G.; RAPAKA, R. A neuroscientist's guide to lipidomics. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 10, p. 743-54, 2007.

PredictABEL: Suman Kundu, Yurii S. Aulchenko and A. Cecile J. W. Janssens. PredictABEL: Assesment of Risk Prediction Models, **R package version 1.2-2**, 2014. <https://CRAN.R-project.org/package=PredictABEL>

QASEEM, A.; SNOW, V.; CROSS, J.T.JR.; FORCIEA, M.A.; HOPKINS, R.JR., *et al.* Current pharmacologic treatment of dementia: a clinical practice guideline from the American College of Physicians and the American Academy of Family Physicians. **Ann Intern Med**, v. 4, n. 148(5), p. 370-8, 2008.

QUAZI, F.; MOLDAY, R.S. Lipid transport by mammalian ABC proteins. **Essays Biochem**, v. 50, n. 1, p. 265-90, 2011.

QUAZI, F.; MOLDAY, R.S. Differential phospholipid substrates and directional transport by ATP-binding cassette proteins ABCA1, ABCA7, and ABCA4 and disease-causing mutants. **J Biol Chem**, v.288, n. 48, p. 34414-26, 2013.

R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>, 2015.

REITZ C. Dyslipidemia and the risk of Alzheimer's disease. **Curr Atheroscler Rep**, V. 3, p.307, 2013.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, E.; MATEO, I.; INFANTE, J.; LLORCA, J.; GARCÍA-GOROSTIAGA, I.; *et al.* Interaction between HMGCR and ABCA1 cholesterol-related genes modulates Alzheimer's disease risk. **Brain Res**, v.1280, n. 14, p. 166-71, 2009.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, E.; SÁNCHEZ-JUAN, P.; VÁZQUEZ-HIGUERA, J.L.; MATEO, I.; POZUETA, A., *et al.* Genetic risk score predicting accelerated progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. **J Neural Transm**, v. 120, n. 5, p. 807-12, 2013.

ROGAEVA E, MENG Y, LEE JH, GU Y, *et al.* The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. **Nat Genet**, v. 39, n. 2, p. 168-77, 2007.

ROGERS, J.; MORRISON, J.H. Quantitative morphology and regional and laminar distributions of senile plaques in Alzheimer's disease. **J Neurosci**, v. 5, n. 10, p. 2801-8, 1985.

ROSENTHAL, S.L.; KAMBOH, M.I. Late-Onset Alzheimer's Disease Genes and the Potentially Implicated Pathways. **Curr Genet Med Rep**, v. 22, n. 2, p. 85-101, 2014.

SATO, N., MORISHITA, R. The roles of lipid and glucose metabolism in modulation of β -amyloid, tau, and neurodegeneration in the pathogenesis of Alzheimer disease. **Front Aging Neurosci**, v.7, n. 199, 2015.

SATOH, K.; ABE-DOHMAE, S.; YOKOYAMA, S.; ST, GEORGE-HYSLOP, P.; FRASER, P.E. ATP-binding cassette transporter A7 (ABCA7) loss of function alters Alzheimer amyloid processing. **J Biol Chem**, v. 290, n. 40, p. 24152-65, 2015.

SELKOE, D.J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiol Rev**, v. 81, n. 2, p. 741-66, 2001.

STEINBERG, S.; STEFANSSON, H.; JONSSON, T.; JOHANNSDOTTIR, H.; INGASON, A.; *et al.* Loss-of-function variants in ABCA7 confer risk of Alzheimer's disease. **Nat Genet**, v. 47, n. 5, p. 445-7, 2015.

STRITTMATTER, W.J.; SAUNDERS, A.M.; SCHMECHEL, D.; PERICAK-VANCE, M.; ENGHILD, J., *et al.* Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 1, n. 90(5), p. 1977-81, 1993.

STRITTMATTER, W.J.; SAUNDERS, A.M.; GOEDERT, M.; WEISGRABER, K.H.; DONG, L.M., *et al.* Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 8, n. 91(23), p. 11183-6, 1994.

SUNDAR, P.D.; FEINGOLD, E.; MINSTER, R.L.; DEKOSKY, S.T.; KAMBOH, M.I. Gender-specific association of ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) polymorphisms with the risk of late-onset Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 28, n. 6, p. 856-62, 2007.

TACHIBANA, M.; SHINOHARA, M.; YAMAZAKI, Y.; LIU, C.C.; ROGERS, J.; *et al.* Rescuing effects of RXR agonist bexarotene on aging-related synapse loss depend on neuronal LRP1. **Exp Neurol**, v. 277, p. 1-9, 2015.

TAI, L.M.; KOSTER, K.P.; LUO, J.; LEE, S.H.; WANG, Y.T.; *et al.* Amyloid- β pathology and *APOE* genotype modulate retinoid X receptor agonist activity in vivo. **J Biol Chem**, v. 289, n. 44, p. 30538-55, 2014.

TANSLEY, G.H.; BURGESS, B.L.; BRYAN, M.T.; SU, Y.; HIRSCH-REINSHAGEN, V., *et al.* The cholesterol transporter ABCG1 modulates the subcellular distribution and proteolytic processing of beta-amyloid precursor protein. **J Lipid Res**, v. 48, n. 5, p. 1022-34, 2007.

TILLEY, L.; MORGAN, K.; KALSHEKER, N. Genetic risk factors in Alzheimer's disease. **Mol Pathol**, v. 51, n. 6, p. 293-304, 1998.

TURECK, L. V. Síndrome Metabólica: Investigação da Associação entre seus Fatores de Risco Isolados e Polimorfismos Genéticos. Curitiba, 2015.

VANCE, J.E.; HAYASHI, H. Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system. **Biochim Biophys Acta**, v. 1801, n. 8, p. 806-18, 2010.

VASQUEZ, J.B.; FARDO, D.W.; ESTUS, S. ABCA7 expression is associated with Alzheimer's disease polymorphism and disease status. **Neurosci Lett**, v. 556, p. 58-62, 2013.

VILLEGAS-LLERENA, C.; PHILLIPS, A.; GARCIA-REITBOECK, P.; HARDY, J.; POCOCK, J.M. Microglial genes regulating neuroinflammation in the progression of Alzheimer's disease. **Curr Opin Neurobiol**, v. 36, p. 74-81, 2016.

WAHRLE, S.E.; JIANG, H.; PARSADANIAN, M.; LEGLEITER, J.; HAN, X.; FRYER, J.D.; *et al.* ABCA1 is required for normal central nervous system ApoE levels and for lipidation of astrocyte-secreted apoE. **J Biol Chem**, v.279, n. 39, p. 40987-93, 2004.

WANG, N.; LAN, D.; CHEN, W.; MATSUURA, F.; TALL, AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 26, p. 9774-9, 2004.

WOLLMER, M.A.; STREFFER, J.R.; LÜTJOHANN, D.; TSOLAKI, M.; IAKOVIDOU, V., *et al.* ABCA1 modulates CSF cholesterol levels and influences the age at onset of Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 24, n. 3, p. 421-6, 2003.

WOLLMER, M.A.; SLEEGERS, K.; INGELSSON, M.; ZEKANOWSKI, C.; BROUWERS, N., *et al.* Association study of cholesterol-related genes in Alzheimer's disease. **Neurogenetics**, v. 8, n. 3, p. 179-88, 2007.

XIANG, Y.; LAM, S.M.; SHUI, G. What can lipidomics tell us about the pathogenesis of Alzheimer disease? **Biol Chem**, v. 396, n. 12, p. 1281-91, 2015.

ZHAO, Q.F.; YU, J.T.; TAN, M.S.; TAN, L. ABCA7 in Alzheimer's Disease. **Mol Neurobiol**, v. 51, n. 3, p. 1008-16, 2015.

ANEXOS

Anexo 1 – Termo de Consentimento



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Eu ou responsável por.....
, autorizo a participação na
 pesquisa: **“ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIANTES DE GENES COMO BCHE, APOE, SLITRK3,
 NEP E GENES DA FAMÍLIA MLR HUMANA E A DOENÇA DE ALZHEIMER”**. Concordo com o
 armazenamento e guarda do material genético e utilização deste material para pesquisas científicas
 futuras nos termos citados na Carta de Informação. Tenho pleno conhecimento dos procedimentos
 que serão submetidos conforme descritos anteriormente. Assino o presente termo, após ter lido a
 Carta de Informação, entendido e não ter mais nenhuma dúvida.

Curitiba, de de 2015

Ass.:

RG:

Data: Telefone:

Controle idoso

D. A.

Nome:

Local de Nascimento:

Data de nascimento: Idade:

Cor: Descendência

Medicamentos em uso:

Fuma?

Consome álcool:

Doenças anteriores:

Doenças na família (genéticas ou senis):



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



Parentes com demência (qual):.....

Profissão:.....

Quando apareceram os primeiros sinais de demência:.....

Quais foram os sintomas:.....

.....

Mudanças de comportamentos/personalidade (quais).....

.....

Down na família?:.....

Exame clínico neurológico:.....

.....

Alimentação:.....

Sono:.....

Escolaridade.....

Responsável:.....

Resposta ao inibidor:

Horário tomou inibidor:

Efeito colateral ao inibidor:.....

Data da coleta de sangue:.....

OBS:.....

Peso:..... Altura:..... C.A.:.....

Dados laboratoriais:

Responsáveis:

Prontuário N. _____

Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza

Msc. Daiane Priscila Simão-Silva

Dr. Mauro Piovezan

Centro Politécnico - Jardim das Américas - Caixa Postal 19071 - CEP 81531-980 - Curitiba, Brasil
 tel/(+41) 33611587 / 33611684 – fax(+41) 33611793 – e-mail/ppg-gen@ufpr.br



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE E IDOSO CONTROLE NO ESTUDO DOS COMPONENTES GENÉTICOS DAS DEMÊNCIAS

Pesquisa:

ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIANTES DE GENES COMO *BCHE*, *APOE*, *SLITRK3*, *NEP* E GENES DA FAMÍLIA *MLR* HUMANA E DEMÊNCIAS.

O presente trabalho tem por objetivo investigar os componentes genéticos das demências na tentativa de estabelecer ligações que possam ser utilizadas no diagnóstico, prognóstico e tratamento dos indivíduos acometidos pelas Demências.

Pouco se conhece da genética das Demências para aplicação na prática médica, mas os trabalhos científicos sugerem que os componentes genéticos são fundamentais para o aparecimento e desenvolvimento da doença.

O material utilizado nesse estudo será obtido através da simples e rápida coleta de 7ml de sangue, dos pacientes com Demências e idosos saudáveis. A coleta de sangue será realizada por profissionais especializados, ficando o voluntário isento de qualquer risco grave, sendo submetido apenas à coleta de sangue e uma rápida entrevista. O sangue coletado será levado ao laboratório onde os materiais genéticos (DNA/RNA) e proteínas serão retirados, estudados e comparados aos de outros pacientes e idosos saudáveis.

Por fim a pesquisa em questão apresenta riscos mínimos aos voluntários, sendo o benefício dos voluntários unicamente a contribuição científica que possa surgir com os resultados da pesquisa, no qual seu material foi fundamental para concretização, não havendo nenhum benefício de ordem financeira. O material poderá, no entanto, contribuir futuramente para a elaboração de novas formas de tratamento das demências.

O voluntário goza de total liberdade para se retirar do estudo a qualquer momento. Informamos também que haverá o armazenamento e guarda do material genético e utilização deste material para pesquisas científicas futuras.

É de responsabilidade do pesquisador sempre resguardar e manter dados e informações dos pacientes em sigilo absoluto. Os gastos relativos aos procedimentos laboratoriais serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa sem qualquer gasto por parte do paciente ou familiar. Colocamo-nos à disposição dos pacientes ou responsáveis para elucidar qualquer dúvida relacionada à pesquisa.

Informações: Daiane P. Simão-Silva, email: dpscientist@gmail.com; fone: (042) 99594996.

Centro Politécnico - Jardim das Américas - Caixa Postal 19071 - CEP 81531-980 - Curitiba, Brasil
tel/(+41) 33611587 / 33611684 – fax (+41) 33611793 – e-mail ppg-gen@ufpr.br

Anexo 2 – Mini-Exame do Estado Mental (MEEM)

MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL

(Folstein, Folstein & McHugh, 1.975)

Paciente: _____

Data da Avaliação: ____/____/____ Avaliador: _____

ORIENTAÇÃO

- Dia da semana (1 ponto)()
- Dia do mês (1 ponto)()
- Mês (1 ponto)()
- Ano (1 ponto)()
- Hora aproximada (1 ponto)()
- Local específico (apartamento ou setor) (1 ponto)()
- Instituição (residência, hospital, clínica) (1 ponto)()
- Bairro ou rua próxima (1 ponto)()
- Cidade (1 ponto)()
- Estado (1 ponto)()

MEMÓRIA IMEDIATA

- Fale 3 palavras não relacionadas. Posteriormente pergunte ao paciente pelas 3 palavras. Dê 1 ponto para cada resposta correta()
Depois repita as palavras e certifique-se de que o paciente as aprendeu, pois mais adiante você irá perguntá-las novamente.

ATENÇÃO E CÁLCULO

- (100 - 7) sucessivos, 5 vezes sucessivamente (1 ponto para cada cálculo correto)()
(alternativamente, soletrar MUNDO de trás para frente)

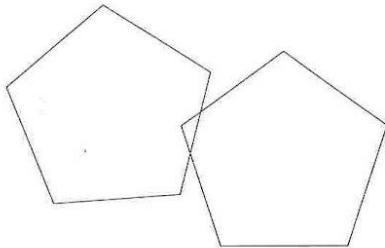
EVOCAÇÃO

- Pergunte pelas 3 palavras ditas anteriormente (1 ponto por palavra)()

LINGUAGEM

- Nomear um relógio e uma caneta (2 pontos)()
- Repetir "nem aqui, nem ali, nem lá" (1 ponto)()
- Comando: "pegue este papel com a mão direita dobre ao meio e coloque no chão" (3 pts)()
- Ler e obedecer: "feche os olhos" (1 ponto)()
- Escrever uma frase (1 ponto)()
- Copiar um desenho (1 ponto)()

ESCORE: (____/30)



APÊNDICE

TABELA 1: COMPARAÇÕES DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS SNPs ENTRE PACIENTES DO INC (INSTITUTO DE NEUROLOGIA DE CURITIBA) E HC (HOSPITAL DE CLÍNICAS).

		rs1800977			rs2230806		
		INC % n= 73	HC % n= 123	INC X HC	INC % n= 72	HC % n= 119	INC X HC
ABCA1	Genótipo				Genótipo		
	G/G	41,1	39,8	p= 0.9754	C/C	44,4	47,9
	G/A	47,9	49,6		C/T	48,6	44,5
	A/A	11	10,6		T/T	7	7,6
	Alelo				Alelo		
	G	65,1	64,6	p= 0.9306	C	68,7	70,2
A	34,9	35,4	T		31,3	29,8	
		rs2279796			rs3764650		
		INC % n= 73	HC % n= 125	INC X HC	INC % n= 65	HC % n= 109	INC X HC
ABCA7	Genótipo				Genótipo		
	G/G	20,6	29,6	p= 0.3472	T/T	78,5	77,1
	A/G	47,9	44,8		T/G	20	21,1
	A/A	31,5	25,6		G/G	1,5	1,8
	Alelo				Alelo		
	G	44,5	52	p= 0.1509	T	88,5	87,6
A	55,5	48	G		11,5	12,4	
		rs692383			rs3827225		
		INC % n= 72	HC % n= 124	INC X HC	INC % n= 73	HC % n= 122	INC X HC
ABCG1	Genótipo				Genótipo		
	A/A	41,7	42,7	p= 0.9544	G/G	58,9	49,2
	A/G	43	43,6		G/A	31,5	43,4
	G/G	15,3	13,7		A/A	9,6	7,4
	Alelo				Alelo		
	A	63,2	64,5	p= 0.7927	G	74,7	70,9
G	36,8	35,5	A		25,3	29,1	

TABELA 2: COMPARAÇÕES DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS SNPS ENTRE INDIVÍDUOS QUE NÃO REALIZAM TRATAMENTO PARA CONTROLE DOS NÍVEIS DE COLESTEROL (COL 0) E OS QUE FAZEM TRATAMENTO PARA O COLESTEROL (COL 1).

		rs1800977			rs2230806		
		Col 0 % n= 155	Col 1 % n= 115	Col 0 X Col 1	Col 0 % n= 154	Col 1 % n= 113	Col 0 X Col 1
ABCA1		Genótipo			Genótipo		
	G/G	40,7	43,5	p = 0,3343	C/C	46,9	p = 0,6967
	G/A	51,6	44,3		C/T	45,1	
	A/A	7,7	12,2		T/T	8,0	
		Alelo			Alelo		
	G	66,5	65,7	p = 0,8461	C	69,5	p = 0,8694
A	33,5	34,3	T		30,5		
		rs2279796			rs3764650		
		Col 0 % n= 155	Col 1 % n= 117	Col 0 X Col 1	Col 0 % n= 134	Col 1 % n= 97	Col 0 X Col 1
ABCA7		Genótipo			Genótipo		
	G/G	30,3	20,5	p = 0,1836	T/T	75,3	p = 0,3758
	A/G	44,5	52,1		T/G	21,6	
	A/A	25,2	27,4		G/G	3,1	
		Alelo			Alelo		
	G	52,6	46,6	p = 0,1659	T	86,1	p = 0,3142
A	47,4	53,4	G		13,9		
		rs692383			rs3827225		
		Col 0 % n= 154	Col 1 % n= 118	Col 0 X Col 1	Col 0 % n= 154	Col 1 % n= 118	Col 0 X Col 1
ABCG1		Genótipo			Genótipo		
	A/A	39,6	43,2	p = 0,7689	G/G	58,5	p = 0,3738
	A/G	46,8	42,4		G/A	35,6	
	G/G	13,6	14,4		A/A	5,9	
		Alelo			Alelo		
	A	63,0	64,4	p = 0,733	G	76,3	p = 0,1767
G	37,0	35,6	A		23,7		