

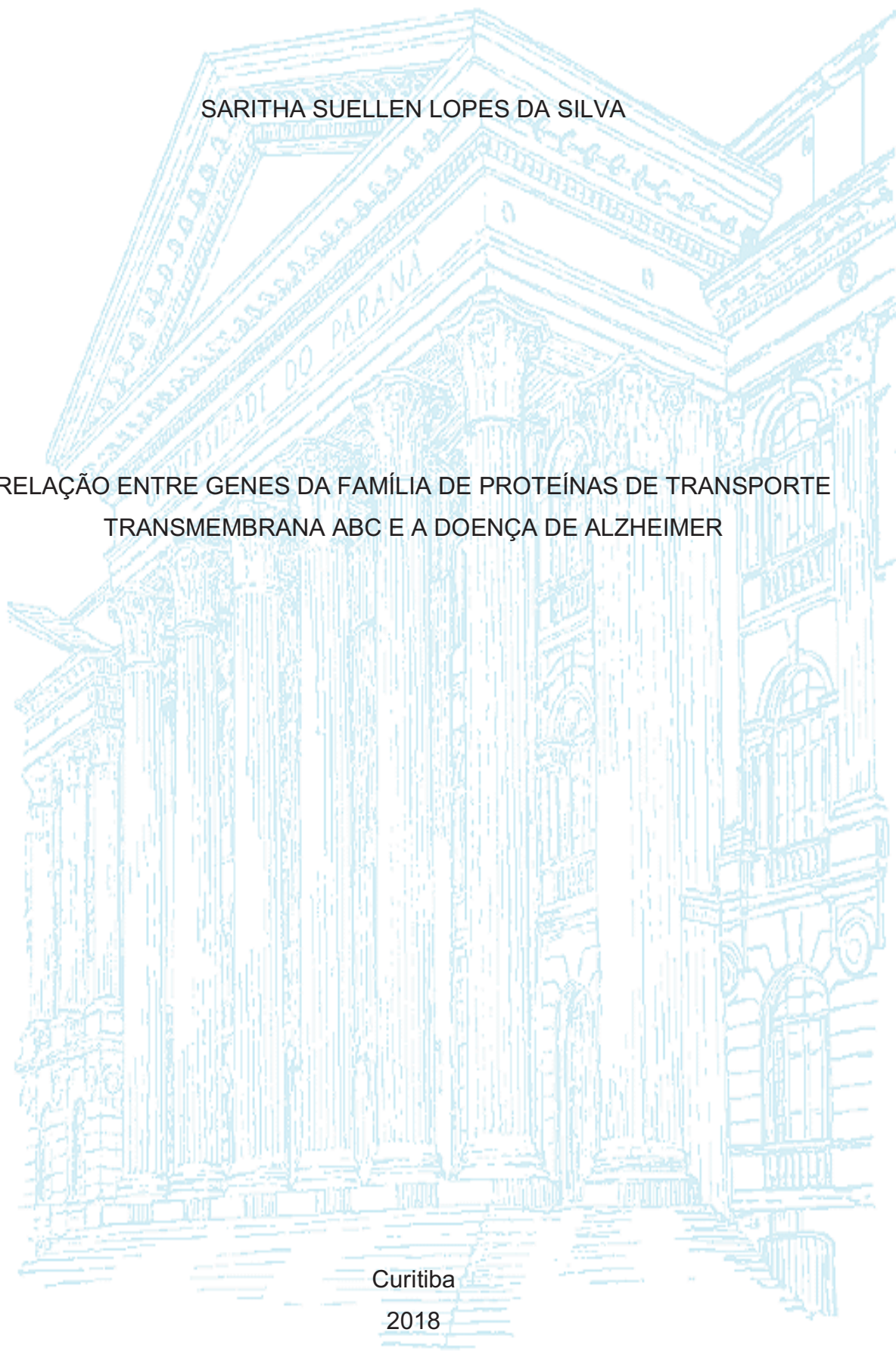
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SARITHA SUELLEN LOPES DA SILVA

RELAÇÃO ENTRE GENES DA FAMÍLIA DE PROTEÍNAS DE TRANSPORTE  
TRANSMEMBRANA ABC E A DOENÇA DE ALZHEIMER

Curitiba

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SARITHA SUELLEN LOPES DA SILVA

RELAÇÃO ENTRE GENES DA FAMÍLIA DE PROTEÍNAS DE TRANSPORTE  
TRANSMEMBRANA ABC E A DOENÇA DE ALZHEIMER

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

Orientador: Profº Dr. Ricardo Lehtonen  
Rodrigues de Souza

Curitiba  
2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Silva, Saritha Suellen Lopes da  
Relação entre genes da família de proteínas de transporte transmembrana  
ABC e a Doenças de Alzheimer./ Saritha Suellen Lopes da Silva. – Curitiba,  
2018.  
72 p.: il. ; 30cm.

Orientador: Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Alzheimer, Doença de. 2. Doenças neurodegenerativas. 3. Colesterol. I.  
Título. II. Souza, Ricardo Lehtonen Rodrigues. III. Universidade Federal do  
Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em  
Genética.

CDD (20. ed.) 575.1



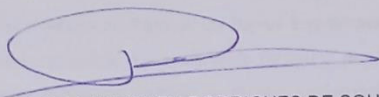
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA

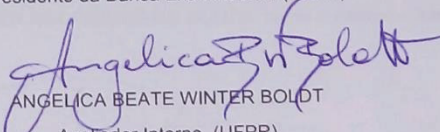
## TERMO DE APROVAÇÃO

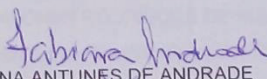
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **SARITHA SUELLEN LOPES DA SILVA** intitulada: **Relação entre genes da família de proteínas de transporte transmembrana ABC e a doença de Alzheimer.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 26 de Março de 2018.

  
RICARDO LEHTONEN RODRIGUES DE SOUZA  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
ANGELICA BEATE WINTER BOLDT  
Avaliador Interno (UFPR)

  
FABIANA ANTUNES DE ANDRADE  
Avaliador Externo (UFPR)

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer à Deus primeiramente, por me permitir trilhar o caminho que estou hoje e por ter me dado o melhor motivo para continuar lutando pelos meus sonhos e minha carreira, minha filha Julia.

Agradeço aos meus guias, por me darem proteção, força, perseverança e paciência no meu dia a dia e me ajudarem a conquistar tudo o que tenho hoje.

Ao meu marido, por todo amor, paciência e conforto. Por não me deixar desistir de seguir com meus sonhos profissionais no meio acadêmico, mesmo que a situação atual esteja cada vez mais sucateada, com líderes que se preocupam cada vez menos com a educação e a ciência em nosso país.

Aos meus pais e irmãos, que caminharam comigo e me auxiliaram em toda essa jornada. Foram meu porto seguro, sem eles não conseguiria nada.

À todos meus amigos de longa data, e à UFNOIA, que mesmo distantes, me ajudaram em tantos momentos de cansaço.

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup> Ricardo, por continuar confiando na minha capacidade e por sempre me acalmar nas horas de desespero (mesmo sem saber). Muito obrigada pela sua disposição em me ensinar cada vez mais.

E aos meus colegas de laboratório de Polimorfismo e Ligação, que se tornaram amigos mais que especiais e tornaram todos os dias de trabalho mais leves e divertidos, mesmo em meio a grandes confusões. Me ajudaram a crescer profissionalmente e como pessoa.

*There are places I remember  
All my life, though some have changed  
Some forever, not for better  
Some have gone and some remain*

*All these places had their moments  
With lovers and friends, I still can recall  
Some are dead, and some are living  
In my life, I've loved them all*

*In My Life – The Beatles*



## RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA), caracterizada por perda de memória e disfunção cognitiva e é a demência neurodegenerativa com maior incidência na população mundial. As funções cognitivas e neuropsiquiátricas diminuem de forma progressiva, com a formação de neuritos distróficos associados a emaranhados neurofibrilares e placas neuríticas. A principal teoria para explicar a fisiopatologia da doença é a Hipótese da Cascata Amiloide, devido ao acúmulo de  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A). Como é uma demência complexa, sua etiologia e progressão não são bem elucidadas, exigindo mais estudos para uma melhor compreensão. No momento, existem hipóteses que envolvem vias metabólicas que possam estar associadas com o desenvolvimento da doença, dentre elas a do metabolismo do colesterol, devido à alta quantidade de colesterol presente no cérebro. Os transportadores ABC (cassete de ligação a ATP), codificados por 48 genes, são classificados em sete subfamílias (A à G). As proteínas transportadoras têm múltiplas funções, como o transporte de metabólitos através da membrana celular e das membranas de organelas celulares, facilitando o transporte de lipídios ou substratos relacionados, dependente de ATP. Alguns desses genes têm sido associados a doenças humanas que estão relacionadas ao transporte anormal e/ou à homeostase lipídica. O objetivo do presente estudo foi investigar a associação entre polimorfismos de genes da família ABC e sua relação com DA através de um estudo de associação caso-controle e analisar a relação entre estes polimorfismos e variáveis clínicas e cognitivas. Foram analisadas amostras de 152 pacientes com DA do Hospital das Clínicas da UFPR e do Instituto de Neurologia de Curitiba e 122 idosos cognitivamente saudáveis como grupo controle. Foram selecionados 12 SNPs em 5 genes: *ABCA2* (rs10870162, rs879854), *ABCA3* (rs140818285, rs668033 e rs150929), *ABCB1* (rs7787082, rs4728700, rs2235035), *ABCD1* (rs1055847, rs6571291) e *ABCG4* (rs323036, rs323072) que foram genotipados por meio de Sequenom MassARRAY iPLEX. O equilíbrio de Hardy-Weinberg e as frequências alélicas e genotípicas foram verificadas e regressão logística foi utilizada para analisar a relação das variáveis e dos SNPs. Apenas 8 dos 12 SNPs foram analisados, devido à problemas com a genotipagem. Foram encontradas associações com os polimorfismos de todos os genes. No gene *ABCA2*, rs10870162 apresentou associação em relação a suscetibilidade à doença ( $p=0.028$ ), sugerindo que o genótipo G/G esteja atuando de forma protetiva ao desenvolvimento de DA. No gene *ABCA3* o genótipo G/G do rs150929, pode estar contribuindo com o maior comprometimento cognitivo ( $p=0.017$ ) e maior gravidade da doença ( $p=0.035$ ). No gene *ABCB1*, o genótipo C/C do rs4728700 leva a uma maior gravidade da doença ( $p=0.0005$ ) e o genótipo G/G do rs2235035 mantém um menor nível de gravidade da doença por mais tempo ( $p=0.008$ ). O rs1055847 do gene *ABCD1* apresentou associação com gravidade da doença em pacientes homens ( $p=0.0387$ ), sendo que o alelo G contribui com uma maior gravidade da doença. Não foram encontradas associações com o gene *ABCG4* e com a variável de tratamento para controle de colesterol. Nossos estudos corroboram estudos anteriores, indicando que os transportadores ABC estão envolvidos na etiologia e progressão da DA, e que o metabolismo de colesterol e outros lipídios em conjunto com depósito de  $\beta$ A modificam o desenvolvimento da doença.

Palavras-Chave: Doença de Alzheimer, Doenças Neurodegenerativas, *ABCA2*, *ABCA3*, *ABCB1*, *ABCD1*, *ABCG4*, Metabolismo de Colesterol.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is characterized by loss of memory and cognitive dysfunction and it is a neurodegenerative dementia, with the highest incidence in the world. Cognitive and neuropsychiatric functions decline occurs in a progressive manner, with the formation of dystrophic neurites associated with neurofibrillary tangles and neuritic plaques. The main theory to explain the pathophysiology of the disease is the Amyloid Cascade Hypothesis, due to the accumulation of amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ). As a complex dementia, etiology and progression of the disease are not well understood, requiring further studies for a better understanding. However, for the evolution and development of these features, there are hypotheses in which the cholesterol metabolism is included. Human ABC transporters (ATP-binding cassette), encoded by 48 genes, are categorized in seven subfamilies. The transporter proteins provide multiple functions, such as the transport of most drugs and their metabolites across cell surface and cellular organelle membranes, and facilitating the ATP-dependent translocation of lipids or lipid-related compounds. Some of these genes have been linked to human diseases associated with abnormal lipid transport and/or homeostasis. Our aim in the present study was to investigate the association between polymorphisms of some ABC genes and its relationship with AD through a case-control association study and analyze if there is a correlation between these polymorphisms and clinical and cognitive variation. We used samples from patients with AD from Hospital das Clínicas UFPR and the Instituto de Neurologia de Curitiba and healthy elderly individuals as the control group. We selected 12 SNPs in 5 genes: *ABCA2* (rs10870162, rs879854), *ABCA3* (rs140818285, rs668033, rs150929), *ABCB1* (rs7787082, rs4728700, rs2235035), *ABCD1* (rs1055847, rs6571291) and *ABCG4* (rs323036, rs323072), that were genotyped using Sequenom MassARRAY iPLEX. The Hardy-Weinberg equilibrium, allelic and genotypic frequencies were verified and logistic regression was used to analyze the relationship of clinical variables and the SNPs. Rs10870162 of *ABCA2* gene, showed association with susceptibility to the disease ( $p = 0.028$ ), suggesting that the G/G genotype is acting in a protective way to the development of AD. In the *ABCA3* gene, the G/G genotype of rs150929 may be contributing to the higher cognitive impairment ( $p = 0.17$ ) and higher disease severity ( $p = 0.035$ ). In the *ABCB1* gene, the C/C genotype of rs4728700 leads to a higher disease severity ( $p = 0.0005$ ) and the G/G genotype of rs2235035 maintains a range of disease severity for a longer time (0.008). The *ABCD1* gene rs1055847 showed association with disease severity in male patients ( $p=0.0387$ ), whereas G allele contributes to a higher severity of the disease. No associations were found with the *ABCG4* gene and the variable treatment for cholesterol control. Our studies support previous studies, indicating that ABC transporters are involved in the etiology and progression of AD, and that the metabolism of cholesterol and other lipids together with  $\beta$ A deposition modify the development of the disease.

Keywords: Alzheimer's Disease, Neurodegenerative Disease, *ABCA2*, *ABCA3*, *ABCB1*, *ABCD1*, *ABCG4*, Cholesterol Metabolism



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESQUEMA REPRESENTATIVO E RESUMIDO DA HIPÓTESE DA CASCATA AMILÓIDE..	18
FIGURA 2 – CLIVAGEM DA PROTEÍNA PRECURSORA AMILÓIDE (APP).	19
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE PROTEÍNAS	24
FIGURA 4 – LOCALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORA DE LIPÍDIOS ABC.	25
FIGURA 5 – ANÁLISE DE NORTHERN BLOT, VERIFICANDO A EXPRESSÃO DOS GENES EM CADA TECIDO.	26
FIGURA 6 - ESQUEMATIZAÇÃO DO PROCESSO BÁSICO DE GENOTIPAGEM PELO SEQUENOM.	34

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER EM PACIENTES COM SINTOMAS DE DEMÊNCIA.	21
QUADRO 2 - INFORMAÇÕES RELATIVAS A CADA UM DOS GENES QUE FORAM ESTUDADOS NO PRESENTE TRABALHO.	29

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ABUNDÂNCIA DE PROTEÍNAS ABC DE ACORDO COM OS ORGANISMOS..	23
TABELA 2 - PONTUAÇÃO DO MEEM DE CONTROLE DE CORTE PARA OS CI.	31
TABELA 3 - DESCRIÇÃO GERAL DAS AMOSTRAS ESTUDADAS.	32
TABELA 4 - DADOS SOBRE OS SNPS DE CADA GENE SELECIONADO PARA NOSSO ESTUDO..	33
TABELA 5 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO RS10870162 DO GENE <i>ABCA2</i> COM DADOS DA LITERATURA.	36
TABELA 6 - RESULTADO DA ANÁLISE DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS DO GENE <i>ABCB1</i> E ENTRE OS SNPS DO GENE <i>ABCG4</i> .	37
TABELA 7 - MODELOS DE COMBINAÇÕES ENTRE SNPS DO GENE <i>ABCG4</i> E DO GENE <i>ABCB1</i> , PARA AS ANÁLISES DE REGRESSÃO MULTIVARIADAS.	37
TABELA 8 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS ENTRE DA E CI.	38
TABELA 9 - RESULTADOS SIGNIFICATIVOS PARA AS ANÁLISES DE REGRESSÃO DO RS10870162 DO GENE <i>ABCA2</i> ENTRE DA E CI.	39
TABELA 10 - RESULTADO ANÁLISES DE REGRESSÃO DO RS10870162 DO GENE <i>ABCA2</i> NO MODELO GENÉTICO RECESSIVO PARA SUSCEPTIBILIDADE À DA, COMPARANDO PACIENTES E CONTROLES.	40

TABELA 11 - RESULTADOS SIGNIFICATIVOS DAS ANÁLISES DE REGRESSÃO DO RS150929 DO GENE <i>ABCA3</i> PARA A VARIÁVEL MEEM NOS PACIENTES.....	42
TABELA 12 - RESULTADOS SIGNIFICATIVOS DAS ANÁLISES DE REGRESSÃO DO RS1055847 DO GENE <i>ABCD1</i> DE CDR - A EM PACIENTES.....	43
TABELA 13 - RESULTADOS DAS ANÁLISES DE REGRESSÃO APÓS ESTRATIFICAÇÃO DE HOMENS E MULHERES, DO RS1055847 DO GENE <i>ABCD1</i> DE CDR - A EM PACIENTES..	44
TABELA 14 - RESULTADOS SIGNIFICATIVOS DAS ANÁLISES DE REGRESSÃO DO RS150929 DO GENE <i>ABCG4</i> DA ANÁLISE DA VARIÁVEL CDR - B EM PACIENTES...	45
TABELA 15 - RESULTADOS SIGNIFICATIVOS DAS ANÁLISES DE REGRESSÃO DO RS4728700 DO GENE <i>ABCB1</i> DA ANÁLISE DA VARIÁVEL CDR - C EM PACIENTES.....	46
TABELA 16 - RESULTADOS SIGNIFICATIVOS DAS ANÁLISES DE REGRESSÃO DO RS2235035 DO GENE <i>ABCB1</i> DA ANÁLISE DA VARIÁVEL CDR - C EM PACIENTES.....	47

## GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DO RS10870162 DO GENE *ABCA2* EM PORCENTAGEM EM RELAÇÃO À SUSCEPTIBILIDADE DA DOENÇA, COMPARANDO DA X CI.....  
.....41
- GRÁFICO 2 - DISTRIBUIÇÃO GENÓTIPOS NO RS150929 DO GENE *ABCA3* EM PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AO TESTE COGNITIVO NA ANÁLISE DE MEEM.....42
- GRÁFICO 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DO RS1055847 DO GENE *ABCD1* EM PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AO NÍVEL DE GRAVIDADE DA DOENÇA NA ANÁLISE DE CDR – A, ESTRATIFICADOS POR MULHERES E HOMENS.....44
- GRÁFICO 4 - DISTRIBUIÇÃO GENÓTIPOS NO RS150929 DO GENE *ABCG4* EM PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AO NÍVEL DE GRAVIDADE DA DOENÇA NA ANÁLISE DA VARIÁVEL CDR - B.....45
- GRÁFICO 5 - DISTRIBUIÇÃO GENÓTIPOS NO RS4728700 DO GENE *ABCB1* EM PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AO NÍVEL DE GRAVIDADE DA DOENÇA NA ANÁLISE DA VARIÁVEL CDR - C. ....47
- GRÁFICO 6 - DISTRIBUIÇÃO GENÓTIPOS NO RS2235035 DO GENE *ABCB1* EM PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AO NÍVEL DE GRAVIDADE DA DOENÇA NA ANÁLISE DA VARIÁVEL CDR3.....48

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\beta$ A – Beta- Amiloide.

ABC – ATP *binding-casset*.

APP – Proteína precursora amiloide (*Amyloid precursor protein*).

APOE – Apolipoproteína E.

BBB – Barreira Hematoencefálica (*blood-brain barrier*).

CDR – *Clinical Dementia Rating*.

CI – Controle Idoso.

DA – Doença de Alzheimer.

DL – Desequilíbrio de Ligação.

FDA – *Food and Drug Administration*.

GWAS – Estudo de associação genômica (*Genome-wide association study*).

HC – Hospital das Clínicas.

HDL – Lipoproteína de alta densidade (*High Density Lipoprotein*).

HW – Hardy-Weinberg

INC – Instituto de Neurologia de Curitiba

LDL – Lipoproteína de baixa densidade (*Low-density lipoprotein*)

MEEM – Mini-Exame de Estado Mental.

NBD – Domínios de ligação de nucleotídeo (*Nucleotide binding domains*).

NINCDS-ADRDA - *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*.

PCR – Reação em cadeia da polymerase (*Polymerase chain reaction*)

P-gp – *P-glycoprotein*

SNC – Sistema nervoso central.

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único (*Single nucleotide polymorphism*).

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TMD – Domínios transmembrane (*Transmembrane domains*).

UFPR – Universidade Federal do Paraná.

VLCFA – Ácidos graxos de cadeia muito longa (*very long chain fatty acids*)

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 DEMÊNCIA .....	16
2.2 DOENÇA DE ALZHEIMER .....	16
2.2.1 Fatores de Risco, Diagnóstico e Tratamento.....	17
2.3 DOENÇA DE ALZHEIMER E O METABOLISMO DE COLESTEROL.....	22
2.4 FAMÍLIA DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA <i>ATP – BINDING CASSETTE</i> .....	23
2.4.1 Gene <i>ABCA2</i> .....	26
2.4.2 Gene <i>ABCA3</i> .....	26
2.4.3 Gene <i>ABCB1</i> .....	27
2.4.4 Gene <i>ABCD1</i> .....	27
2.4.5 Gene <i>ABCG4</i> .....	28
3 OBJETIVOS .....	30
3.1 OBJETIVO GERAL .....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
4 JUSTIFICATIVA .....	30
5 MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	31
5.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	32
5.3 ESCOLHA DOS SNP .....	33
5.4 GENOTIPAGEM – MASSARRAY-IPLEX - SEQUENOM .....	33
5.5 ANÁLISE DE DADOS.....	35
6 RESULTADOS .....	36
6.1 SUSCEPTIBILIDADE.....	37
6.2 MEEM .....	41
6.3 CDR – GRAVIDADE DA DOENÇA .....	43
6 DISCUSSÃO .....	49



<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>68</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Cada vez mais ao redor do mundo, há um aumento da expectativa de vida, principalmente em países desenvolvidos. Entre 2000 a 2015, houve um acréscimo de 5 anos, o maior acréscimo desde 1960 (WHO, 2016), resultando em um aumento da população idosa mundial e evidenciando as doenças relacionadas à idade como as demências, principalmente as demências neurodegenerativas. Mesmo que as demências possam atingir idades diversas, a maior prevalência ocorre na população idosa, justificando sua crescente evidência mundial.

Segundo CARAMELLI; BARBOSA, 2002, demências são caracterizadas pelo declínio da memória associado ao déficit de outra função cognitiva como linguagem, capacidade viso-espacial ou funções executivas, com intensidade suficiente para interferir no desempenho social ou profissional do próprio indivíduo. Estas ocorrem de forma progressiva, acarretando a perda de autonomia. Em 2015 foi estimado que 46,8 milhões de pessoas ao redor do mundo apresentavam alguma forma de demência (PRINCE et al., 2015), com uma projeção para 2030 que estima que cerca de 66 milhões de pessoas ao redor do mundo irão apresentar alguma forma de demência, aumentando para 115 milhões de pessoas em 2050 (BETTENS; SLEEGERS; VAN BROECKHOVEN, 2013; WHO, 2012).

A Doença de Alzheimer (DA) é a demência mais frequente na população idosa, seguida pela Demência Vascular. Se tratando de uma demência multifatorial, sendo complexa, a causa da demência ainda não é bem definida, atingindo indivíduos de diferentes idades, prevalecendo em idosos acima de 65 anos. Além disso, fatores genéticos e fatores ambientais atuam como fatores de risco ou protetivos da DA. A principal teoria para explicar sua fisiopatologia é a Hipótese da Cascata Amiloide, de acordo com a qual ocorre o acúmulo de proteína  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) produzida pela clivagem de proteína precursora de amiloide por  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretases (SELKOE, 2001), que colaboram para que se eleve a toxicidade neuronal, que leva a quebra da homeostase do cálcio, indução de estresse oxidativo e conseqüentemente, a uma disfunção mitocondrial (GEMELLI, 2013; SWERDLOW; BURNS; KHAN, 2014).

O diagnóstico de DA é dado principalmente por avaliação clínico, porém, atualmente há biomarcadores disponíveis que podem auxiliar o diagnóstico da doença, como a detecção do peptídeo  $\beta$ A ( $\beta$ A-42) e da proteína tau, sendo que ambos apresentam relação com a fisiopatologia DA (BLENNOW et al., 2015; FROTA et al., 2011). Porém, a confirmação da doença só pode ser dada pela análise do tecido cerebral

do paciente, após o falecimento. Isto mostra a importância de uma busca por novos biomarcadores como estratégia de identificação prévia da doença, para o possível desenvolvimento de fármacos que possam melhorar a qualidade de vida do paciente.

Para uma melhor compreensão da etiologia da doença, uma série de outros estudos vem sendo realizados, como estudos sobre vias metabólicas que podem estar envolvidas no processo da DA. Uma das principais vias que vem sendo estudada, é a via do metabolismo de colesterol, uma vez que o cérebro é um órgão rico em colesterol. Mesmo representando 2% de todo o peso corporal, o cérebro apresenta 25% da quantidade de colesterol total do corpo (BENARROCH, 2008). Além disso, há estudos com culturas celulares e modelos animais, que relatam que altos níveis de colesterol aumentam os níveis de  $\beta$ A, fortalecendo a hipótese da relação com a doença (WOOD et al., 2014).

Para todo o transporte deste colesterol, é necessário o intermédio de determinadas proteínas, como as proteínas de transporte transmembrana que auxiliam no efluxo metabólico. A família de proteínas transmembrana *ATP-binding cassette* (ABC) utilizam a energia da hidrólise de ATP para mover substratos através de membranas (VASILIOU; VASILIOU; NEBERT, 2009). Já há estudos que falam sobre a importância da família ABC no transporte de lipídios através de membranas, porém pouco se sabe da sua importância no sistema nervoso central (SNC) (KIM; WEICKERT; GARNER, 2008). Também, recentes estudos, indicaram que os transportadores ABC desempenham um papel fundamental no controle de níveis de  $\beta$ A, podendo ser um fator chave para entendimento da patogênese da demência (ABUZNAIT; KADDOUMI, 2012). Alguns genes desta família, como *ABCA1*, *ABCG1* e *ABCA7* foram associados com o desenvolvimento da DA (HIRSCHREINSHAGEN; BURGESS; WELLINGTON, 2009; LAMBERT et al., 2013).

A partir da problemática apresentada, o presente estudo busca a investigação de polimorfismos de genes da família de proteínas transmembrana ABC e sua relação com a DA, por meio de um estudo de caso-controle.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DEMÊNCIA

A partir de dados de 2015, estima-se que na América 9,4 milhões de pessoas vivem com demência, 10,5 milhões na Europa, 4 milhões na África e 22,9 milhões na Ásia (PRINCE et al., 2015). A cada ano, há 7,7 milhões de novos casos, ocorrendo 1 novo caso de demência a cada 4 segundos (WHO, 2012). Apresentam uma forma de demência uma em cada 20 pessoas acima de 65 anos e uma a cada 6 pessoas com mais de 80 anos (ADIC, 2015). WHO 1992, caracteriza demência como:

“[...] síndrome devido à uma doença no cérebro, geralmente de natureza crônica ou progressiva, em que há perturbação de múltiplas funções corticais superiores, incluindo a memória, o pensamento, orientação, compreensão, cálculo, capacidade de aprendizagem, linguagem e julgamento. A consciência não é obscurecida. Os prejuízos da função cognitiva são comumente acompanhados, e, ocasionalmente, precedidos, pela deterioração do controle emocional, do comportamento social ou motivação.” (Texto traduzido pelo autor).

As principais demências atualmente, por ordem de prevalência mundial são: Doença de Alzheimer, Demência Vascular, Demência com Corpos de Lewy e Demência Fronto-Temporal, sendo que só Demência de Alzheimer e Demência Vascular correspondem a 90% dos casos de demência (Alzheimer's Disease International, 2016).

### 2.2 DOENÇA DE ALZHEIMER

A Doença de Alzheimer (DA) descrita em 1906 pelo neurologista alemão Alois Alzheimer (1864-1915), é a demência neurodegenerativa mais frequente em pessoas idosas. Segundo REITZ et al., 2011, a DA representa, em média, 70% dos casos de demência no mundo. O declínio das funções cognitivas e neuropsicológicas ocorre de maneira progressiva, com a formação de neuritos distróficos associados ao tecido neurofibrilar, devido a filamentos anormais da proteína tau, e às placas neuríticas devido ao acúmulo de peptídeos  $\beta A$  (WILTFANG et al., 2001; BOCHE; NICOLL, 2010). Os

sintomas apresentados pela DA são decorrentes de certas disfunções celulares no cérebro, além de alterações moleculares. A Doença é caracterizada anatomicamente principalmente, pelo acúmulo de proteínas  $\beta$ A depositadas extracelularmente na forma de placas neuríticas, chamadas então de placas senis, e pela formação de emaranhados neurofibrilares decorrentes da hiperfosforilação da proteína tau (BRAAK; BRAAK, 1997; CHAUHAN; CHAUHAN, 2006), sendo que as principais áreas do cérebro que estão envolvidas neste processo degenerativo são o córtex entorrinal e o hipocampo. Todos estes processos moleculares alterados interferem na neurogênese, reduzem e levam à morte neuronal de maneira progressiva, o que leva a uma atrofia cortical e a um aumento no tamanho dos ventrículos, sendo bem evidentes em estágios de DA mais avançados (HOLANDA et al., 2009).

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

### **2.2.1 Fatores de Risco, Diagnóstico e Tratamento**

#### *Genéticos*

A principal teoria para desenvolvimento da doença é a da Cascata Amiloide (Figura 1), de acordo com a qual a doença é causada pelo desequilíbrio entre a produção e a eliminação de  $\beta$ A. Esta teoria possui um maior suporte, devido a estudos genéticos com casos da forma familiar da doença de Alzheimer, nos quais mutações tanto no gene *APP*, da proteína precursora amilóide, quanto nos genes das presenilinas (*PSEN1* e *PSEN2*) aumentam a produção da substância  $\beta$ A (BETTENS; SLEEGERS; VAN BROECKHOVEN, 2013; HARDY; SELKOE, 2002; REITZ; MAYEUX, 2014). Além disso, estes três genes apresentam uma forma de herança autossômica dominante.

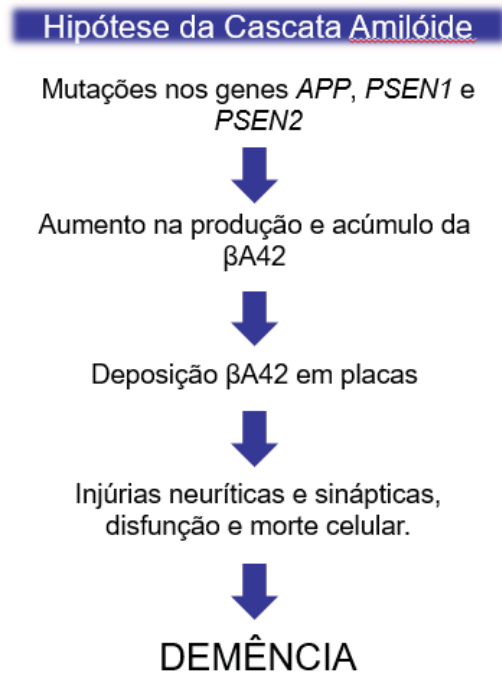


Figura 1. Esquema representativo e resumido da Hipótese da Cascata Amiloide.

Fonte: Adaptado de HARDY & SELKOE, 2002.

A partir de mutações nestes genes, ocorre o processo anormal de clivagem da APP, onde inicialmente essa proteína é clivada por BACE, ou  $\beta$ -secretase e em seguida é clivada por  $\gamma$ -secretase, gerando os peptídeos de  $\beta$ A40/42, que se agregam, levando a toxicidade neuronal. Quando a APP é clivada apenas por  $\alpha$ -secretases é gerado um peptídeo que não tem a capacidade de formar oligômeros, então não se acumula em placas e é eliminado com mais facilidade (ABUZNAIT; KADDOUMI, 2012; NASSIF; HOPPE; SALBEGO, 2005).



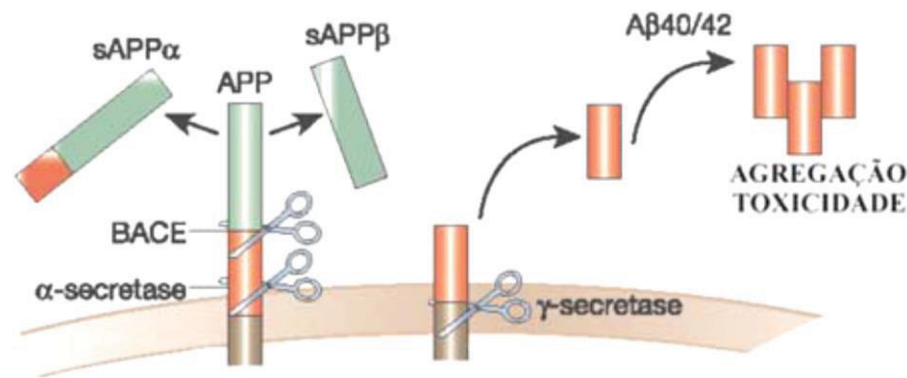


Figura 2 – Clivagem da proteína precursora amiloide (APP). Quando clivado pela BACE e  $\gamma$ -secretase, ocorre a formação de peptídeos  $\beta$ A40/42, e quando clivada apenas por  $\alpha$ -secretases, há a formação do peptídeo amiloide normal.

Fonte: NASSIF; HOPPE; SALBEGO, 2005.

Apesar desta hipótese da Cascata Amiloide ser a mais aceita devido às formas de DA herdadas de maneira autossômica dominante, a mesma, explica apenas os casos de DA familiar, porém não explica a maior parte dos casos que são de DA esporádica, que possui origem multifatorial e com diferentes níveis de intensidade.

O gene *APOE* é apresentado como um dos principais fatores de risco para a DA esporádica (KUUSISTO et al., 1994). Ele está relacionado com a doença a partir de diversos mecanismos, principalmente por ser receptor lipoproteico, participar da manutenção sináptica e interagir com peptídeos  $\beta$ A, porém, ainda há controvérsias em sua atuação na produção ou remoção destes peptídeos (HUYNH et al., 2017). O gene possui três principais alelos, *E2*, *E3* e *E4*, sendo que o alelo *E2* possui uma baixa frequência na população e é apresentado como um fator protetivo da doença; o alelo *E3* é o de maior frequência, sem nenhuma associação; o alelo *E4* se apresenta como o fator de risco para DA, onde indivíduos que apresentem o alelo em heterozigose, têm até três vezes mais chance de risco da doença. Já os indivíduos que possuem o alelo em homozigose, possuem esse risco aumentado em até 15 vezes (BETTENS; SLEEGERS; VAN BROECKHOVEN, 2013). Mesmo assim, a presença do alelo *APOE4* não é necessária e nem suficiente para causar ou explicar o desenvolvimento da doença, necessitando de mais estudos para se esclarecer essas diversas origens possíveis da DA.

A partir de estudos de associação genômica (GWAS) recentes, foram identificados alguns genes (entre eles *ABCA7*, pertencente à família de proteínas de transporte transmembrana ABC), como associados com a DA (LAMBERT et al., 2013). Em estudo

anterior no nosso grupo laboratorial, também encontrou associação com o gene ABCA7 com variáveis relacionadas à DA, como o MEEM; além disso, também encontraram associação com os genes ABCA1 e ABCG1(SULZBACH, 2016).

### *Ambientais*

O envelhecimento, já definido como um dos fatores de risco para demências neurodegenerativas, pode colaborar com uma perda progressiva de função ótima do nosso organismo e essa perda continua até eventual falha, causando então a morte. Este se encontra como um dos principais fatores de risco para a DA. O processo ocorre devido a danos e falhas que ocorrem nas células, que acontecem de forma progressiva, devido ao acúmulo de mudanças metabólicas e ao estresse oxidativo (MATTSON; CHAN; DUAN, 2002).

Outros fatores ambientais que também estão associados como fatores de risco na DA, são: doença cerebrovascular, hipertensão, diabetes do tipo dois, obesidade, altos níveis de lipídios no plasma, síndrome metabólica, tabagismo e injúrias traumáticas no cérebro. Também são conhecidos alguns fatores que atuam de forma protetiva contra DA, como uma boa dieta, atividade física diária e uma boa atividade intelectual (REITZ; BRAYNE; MAYEUX, 2011; REITZ; MAYEUX, 2014).

### Diagnóstico

Para o diagnóstico da DA são necessários exames do histórico médico do paciente, além de testes cognitivos e avaliação do comprometimento funcional para ser distinguida de problemas cognitivos relacionados ao avanço da idade e de outras demências neurodegenerativas. Porém este diagnóstico é dado como provável quadro clínico da doença, uma vez que, a confirmação do diagnóstico de DA só é possível após análises histológicas do cérebro do paciente pós-morte. Com isso, foram desenvolvidos critérios para identificação da doença pelo NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*) do Instituto Nacional Neurológico do EUA (MCKHANN et al., 1984).

Quadro 1. Critérios para o diagnóstico da doença de Alzheimer, em pacientes com sintomas variados.

DEMÊNCIA DA DE ALZHEIMER: CRITÉRIOS CLÍNICOS CENTRAIS	
1. Critérios para diagnóstico clínico de PROVÁVEL doença de Alzheimer:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Demência estabelecida por exame clínico como o Mini-Exame de Estado Mental (MEEM).</li> <li>- Deficiência em duas ou mais áreas cognitivas com piora progressiva.</li> <li>- Ausência de perturbação de consciência</li> <li>- Início entre 40 e 90 anos.</li> <li>- Ausência de distúrbios sistêmicos ou outras doenças cerebrais que poderiam explicar os déficits progressivos na memória e na cognição.</li> </ul>
Auxílio para esse diagnóstico:	Exames laboratoriais compatíveis com o diagnóstico: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Punção lombar: normal, pelas técnicas usuais;</li> <li>- Tomografia do crânio: atrofia cerebral, com progressão documentada por exames seriados.</li> </ul>
2. Critérios para diagnóstico de PROVÁVEL doença de Alzheimer incerto ou improvável:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Início abrupto;</li> <li>- Sinais neurológicos focais (tais como hemiparesia, déficits sensitivos, déficits em campos visuais, distúrbio da coordenação motora) no início do curso da doença;</li> <li>- Convulsões ou distúrbios da marcha nos estágios iniciais da doença.</li> </ul>
3. Critérios para diagnóstico de POSSÍVEL doença de Alzheimer	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ausência de outros distúrbios neurológicos, psiquiátricos ou sistêmicos suficientes para causar demência e na presença de variações no início, na apresentação ou no curso clínico</li> </ul>
4. Critérios para diagnóstico definitivo de doença de Alzheimer	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Preencher critérios de provável Alzheimer</li> <li>- Evidências histopatológicas obtidas a partir de biópsia ou autópsia</li> </ul>

Fonte: Adaptado de (MCKHANN et al., 1984)

### *Tratamento*

Algumas drogas já são aprovadas pela FDA para o tratamento da DA, como inibidores de colinesterase (donepezil, galantamina e rivastigmina) e a Memantina, um antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (CASEY; ANTIMISIARIS; O'BRIEN, 2010) Uma das características da DA é a perda generalizada dos neurônios colinérgicos e redução do neurotransmissor acetilcolina levando a uma disfunção colinérgica; por isso, os principais tratamentos para a doença são os inibidores colinérgicos, fármacos que não interrompem ou reverterem a progressão da DA, apenas melhoram alguns sintomas (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2017a, 2017b).

De acordo com HARDY; SELKOE, 2002, uma das estratégias de tratamento da doença é baseada na modulação da homeostase de colesterol, uma vez que o uso de fármacos que reduzem o colesterol estão associados com a menor incidência de DA.

Porém, nenhum dos tratamentos disponíveis atualmente são capazes de retardar ou impedir a morte e o mau funcionamento dos neurônios no cérebro, que causam os sintomas e tornam a doença fatal (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2017a). Sendo assim, não há tratamentos capazes de curar a doença.

## 2.3 DOENÇA DE ALZHEIMER E O METABOLISMO DE COLESTEROL

O colesterol é um tipo de lipídeo que é sintetizado predominantemente no fígado e está presente em todas as células do organismo por estar localizado principalmente na membrana plasmática. Seu papel tem sido muito estudado devido à uma forte relação com doenças cardiovasculares (NELSON; COX, 2011).

No cérebro, ele está presente principalmente nas membranas plasmáticas dos neurônios, células da glia e na bainha de mielina, tendo grande importância no desenvolvimento e manutenção da plasticidade e função neuronal (REITZ, 2013). Este colesterol circulante no organismo não é capaz de fluir livremente através da barreira hematoencefálica, então, a maior parte de colesterol das células do cérebro é sintetizado *in situ*, por astrócitos e oligodendrócitos, utilizando como precursor a Acetilcoenzima A, necessitando de proteínas que participem da sua homeostase e auxiliem no seu transporte, como a ApoE, e de proteínas transportadoras transmembrana como AbcA1 e AbcG1 (BENARROCH, 2008; HIRSCH-REINSHAGEN; WELLINGTON, 2007).

Há um crescente número de evidências sugerindo uma relação entre a incidência e progressão de algumas doenças neurodegenerativas e disfunção metabólica. Têm-se observado que terapias direcionadas a restabelecer a homeostase metabólica podem melhorar as funções cognitivas e motoras, além de aumentar a qualidade de vida dos pacientes com doenças neurodegenerativas (CAI et al., 2012).

Uma vez que o colesterol desempenha papel crucial para a integridade sináptica e função neuronal, distúrbios no metabolismo de colesterol podem ser um dos grandes fatores de desenvolvimento de DA, pois o metabolismo anormal de lipídeos influencia diretamente na clivagem de APP e, conseqüentemente, na deposição de  $\beta$ A (ANDERSEN; WILLNOW, 2006; BENARROCH, 2008; CARTER, 2007; REITZ, 2013). A alta concentração de colesterol livre leva à formação de áreas de membrana ricas em

colesterol, podendo levar a um processamento preferencial de APP para a secreção e clivagem de A $\beta$  (NASSIF; HOPPE; SALBEGO, 2005).

Diante do exposto, mostra-se que uma correta regulação da homeostase do colesterol é muito importante para o bom funcionamento do cérebro, de modo que sua desregulação altera o balanço de esteróis no Sistema Nervoso Central (SNC), podendo contribuir com o desenvolvimento de neurodegeneração (DIETSCHY; TURLEY, 2001).

## 2.4 FAMÍLIA DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA ATP-BINDING CASSETTE.

Considerando os dados anteriormente apresentados, são necessários mais estudos com proteínas que possam influenciar na homeostase do colesterol cerebral. Logo, este estudo com as proteínas ABC (*ATP-binding cassette*) é muito relevante.

As proteínas ABC são altamente conservadas, presentes em procariotos e eucariotos (Tabela 1). Basicamente utilizam a energia da hidrólise de ATP para bombear elementos através da membrana celular ou de organelas contra um gradiente de concentração (HIGGINS, 1992), como os lipídeos.

No geral, elas estão envolvidas com o transporte de uma série de substratos como metais; íons inorgânicos; carboidratos; vitaminas; lipídeos; incluindo a excreção de toxinas de órgãos vitais, como o cérebro, placenta e testículos. Portanto, mutações nos genes que codificam estas proteínas, podem induzir a uma série de defeitos que se apresentam como doenças genéticas como a fibrose cística, doença de Stargardt, adrenoleucodistrofia e doença de Tangier (LEONARD, 2003; ŠTEFKOVÁ; POLEDNE; HUBÁČEK, 2004). De acordo com BROCCARDO et al., 2006, disfunções nas proteínas ABC estão relacionadas com vários fatores patológicos que abrangem tanto doenças metabólicas e neurológicas quanto a resistência a fármacos.

Tabela 1. Abundância de proteínas ABC em diferentes organismos.

ORGANISMO	Proteínas ABC
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	33
<i>Escherichia coli</i>	79
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
<i>Caenorhabditis elegans</i>	58
<i>Drosophila melanogaster</i>	51
<i>Arabidopsis thaliana</i>	129

Fonte: Adaptado de LINTON et al., 2011.

No genoma humano há 48 genes da família de transportadores, dividido em 7 subfamílias de A a G, de acordo com a homologia de sequência e a organização dos seus domínios de ligação de nucleotídeos (NBD – *nucleotide binding domains*) (KIM et al., 2008). As proteínas ABC possuem 4 domínios, 2 NBD (NBD1 e NBD2) e 2 domínios transmembrana (TMD – *transmembrane domains*) quando completos (figura 3A), enquanto meio transportadores (ou semi-completos) possuem 1 domínio NBD e 1 domínio TMD (figura 3B e 3C). Estes, devem formar homodímeros ou heterodímeros para formar um transportador funcional. (WILKENS, 2015).

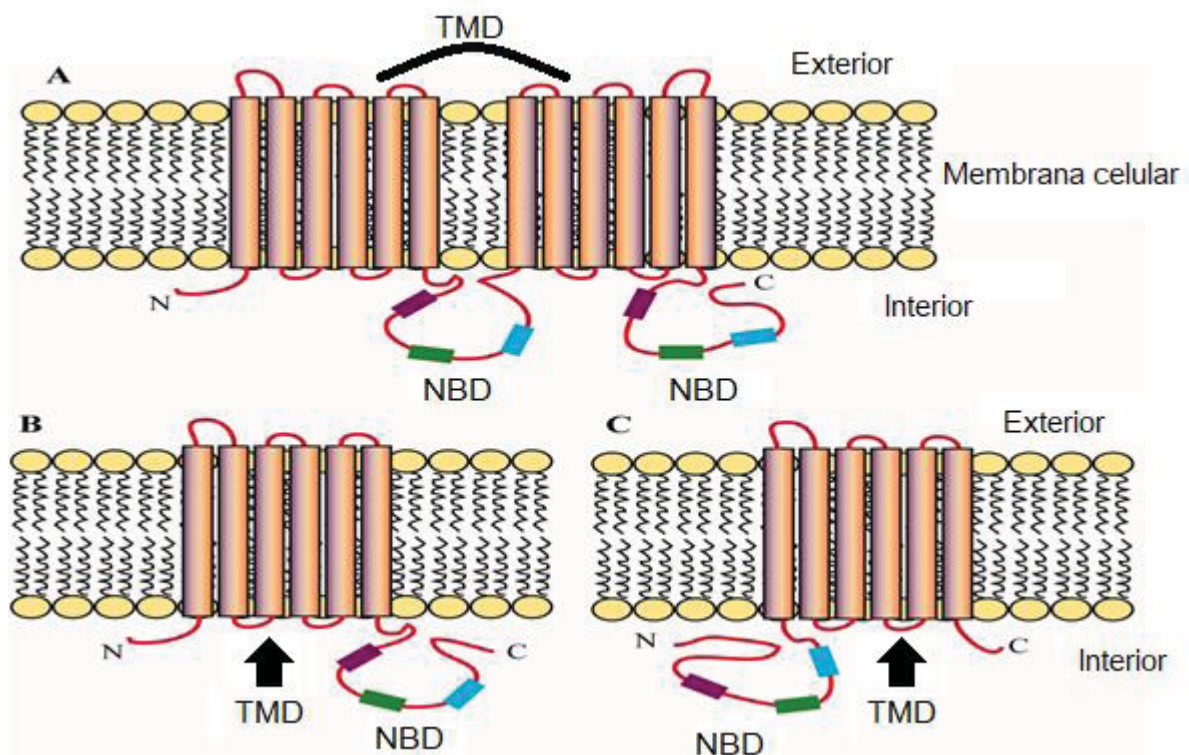


Figura 3. Representação esquemática de proteínas ABC. A) completa com dois domínios TMD possuindo 6  $\alpha$ -hélices e dois domínios NBD B) Proteína com 1 TMD de terminação N e 1 NBD com terminação C. (C) Proteína com 1 TMD de terminação C e 1 NBD com terminação N.

Fonte: Adaptado de LI; GU; ZHANG, 2013.

De acordo com LI; GU; ZHANG, 2013, estes TMDs podem variar entre as proteínas ABC, podendo ser encontradas de 6-11  $\alpha$ -hélices transmembranares, responsáveis por





possibilidade destas mesmas proteínas estarem localizadas em regiões diferentes das células, em diferentes condições.

Fonte: Adaptado de TARLING et al., 2013.

#### 2.4.1 Gene *ABCA2*

O gene *ABCA2* (*ATP binding cassette subfamily A member 2*) (NM001606), faz parte da subfamília A que é composta por 12 genes que possuem os 2 domínios NBD e 2 TMD. Este é o maior membro da família ABC, contendo 48 éxons codificando uma proteína de 2436 aminoácidos de 270kDa, inicialmente descrito, junto com o membro *ABCA1*, em tecido cerebral embrionário de rato (MACK et al., 2006). Está localizado no cromossomo 9q34, é altamente expresso no tecido cerebral (ver figura 5), mas também no fígado, rim, útero, timo e coração, atuando no metabolismo de lipídios e no desenvolvimento neural (NCBI,2016; SCHMITZ; KAMINSKI, 2002,).

Há estudos que sugerem a relevância clínica do SNP rs908832 (C/T – mutação sinônima D679D) do gene *ABCA2*, tanto para DA de início precoce quanto para esporádica. Verificou-se que alterações na expressão do gene estão associadas à DA: a super-expressão de *ABCA2* elevando a expressão de *APP* e aumento da proteína  $\beta$ A (CHEN et al., 2004; DAVIS JR, 2010). No entanto os mecanismos relativos à função do gene para a etiologia da doença ainda não estejam bem definidos.

#### 2.4.2 Gene *ABCA3*

O gene *ABCA3* (*ATP binding cassette subfamily A member 3*) (NM\_001089.2) localizado no cromossomo 16p13.3 (NCBI, 2016), também é membro da subfamília A, ou seja, também possui os 4 domínios. É altamente expresso no pulmão, fígado, estômago, rins e pâncreas e tem uma moderada expressão no cérebro (figura 5) (PAOLINI et al., 2015).

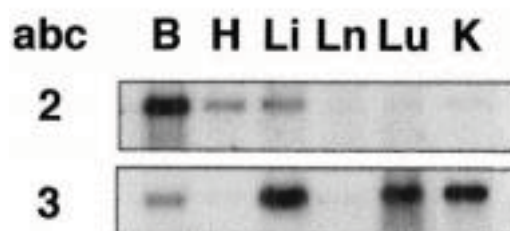


Figura 5. Análise de Northern blot, verificando a expressão dos genes em cada tecido. 2. *ABCA2*, 3. *ABCA3*. B: Cérebro, H: Coração, Li: Fígado, Ln: Linfonodos, Lu: Pulmão, K: Rim.

Fonte: Adaptado de BROCCARDO et al., 1999.

Sua função é conhecida apenas em corpos lamelares, no pulmão, como transportador e excretor de surfactantes (composto principalmente por variados lipídios) (YAMANO et al., 2001). Em estudos realizados durante o desenvolvimento cerebral de camundongos, verificou-se um padrão de expressão muito similar à expressão de *Abca2*. Em células cerebrais de fetos humanos, encontrou-se alta expressão em oligodendrócitos, e também níveis detectáveis em neurônios, micróglia e astrócitos, porém o exato papel de *ABCA3* no transporte de lipídios no cérebro ainda é desconhecido (KIM et al., 2008).

### 2.4.3 Gene *ABCB1*

Este gene (*ATP binding cassette subfamily B member 1*) (NM000927), também conhecido como *MDR1*, sintetizando *P-glycoprotein* (P-gp), localiza-se no cromossomo 7q21 e é pertencente à subfamília B (ou MDR/TAP) (NCBI, 2016).

Sua proteína é expressa na superfície apical da membrana plasmática de vários tipos de células epiteliais e endoteliais, sendo estudada por ser uma eficaz bomba de efluxo de fármacos e responsável pela diminuição da acumulação destes, em células resistentes a múltiplas drogas, mediando o desenvolvimento de resistência a alguns fármacos anticancerígenos (DEAN et al, 2001; KIM et al., 2008). Participa também no transporte de outros fármacos, como: inibidores de protease; agentes imunossupressores; esteroides; estatinas; bloqueadores dos canais de cálcio; beta-bloqueadores; anti-histamínicos; antidepressivos e anticonvulsivantes (LESCHZINER et al., 2006).

A proteína P-gp atua prevenindo que alguns tóxicos permeiem células cerebrais e removendo resíduos metabólicos do cérebro, desempenhando um papel fundamental no controle homeostático cerebral global e neuroproteção. Além disso, a P-gp tem um importante papel no transporte de  $\beta$ A, apresentando uma relação significativa com a DA na qual se observou associação com o SNP *rs1045642* (C3435T), como fator de risco para a doença (FEHÉR et al., 2014).

### 2.4.4 Gene *ABCD1*

O gene *ABCD1* (*ATP binding cassette subfamily D member 1*) está localizado no cromossomo Xq28 e é o primeiro membro da família de proteínas transportadoras D. É amplamente expresso em todos os tecidos e está envolvido na importação peroxissomal de lipídios, codificando uma proteína semi-completa que requer outra proteína semi-completa para formar um transportador homodímero ou heterodímero para que seja funcional como Abcd2, Abcd3 ou Abcd4 (NCBI, KIM et al, 2008).

Há uma série de estudos que associam defeitos a proteína Abcd1 com a doença adrenoleucodistrofia ligada ao X (X-ALD), que é uma desordem neurodegenerativa associada ao acúmulo de ácidos graxos de cadeia muito longa. Essa doença se caracteriza por desmielinização do SNC, insuficiência supra-renal, deterioração mental, disfunção do trato corticospinal e cegueira cortical (FINSTERER et al., 2013; GÄRTNER et al., 2002; MATSUMOTO et al., 2003; MCGUINNESS et al., 2003). Mesmo que algumas das características da X-ALD sejam semelhantes, ainda não há estudos relacionando o gene com a DA.

#### 2.4.5 Gene *ABCG4*

O *ATP binding cassette subfamily G member 4*, se localiza no cromossomo 11q.23.3, faz parte da família de transportadores G e atua no transporte de colesterol (NCBI). A família G, também conhecida como *White*, é composta de transportadores semi-completos, com NBD-N terminal e TMD-C terminal, ou seja, também necessita de outra proteína semi-completa para tornar-se uma proteína funcional (DEAN et al., 2002).

Ainda segundo DEAN et al. 2002, os muitos membros dessa família não apresentam muitas regiões conservadas, com exceção dos genes *ABCG1* e *ABCG4*, que possuem alta similaridade na sequência de aminoácidos.

Sua proteína é altamente expressa no cérebro e na retina neural, possuindo um importante papel no transporte de lipoproteínas de alta densidade (HDL, *High Density Lipoprotein*) e na homeostase lipídica cerebral (ABUZNAIT; KADDOUMI, 2012; KIM et al., 2008). De acordo com UEHARA et al., (2008), há uma maior expressão do gene em cérebros de pacientes com DA. Sua proteína é encontrada em placas senis, havendo interação com ApoE e peptídeos de  $\beta$ A, indicativos da patologia da doença.

Quadro 2. Informações relativas a cada um dos genes que foram estudados no presente trabalho

Gene	ABCA2	ABCA3	ABCB1	ABCD1	ABCG4
<b>Localização</b>	9q34	16p13.3	7q21	Xq28	11q23.3
<b>Local de expressão</b>	Principalmente no tecido cerebral	Pulmão, fígado, estômago, rins, pâncreas e cérebro	Superfície apical da membrana plasmática de células epiteliais e endoteliais	Todos os tecidos	Cérebro e retina neural
<b>Função</b>	Atua no metabolismo de lipídios e desenvolvimento neural.	Transporte e excreção de surfactante pulmonar.	Efluxo de substratos tóxicos que permeiam células cerebrais e remoção de resíduos metabólicos do cérebro.	Importação peroxissomal de lipídios.	Transporte de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e na homeostase lipídica cerebral
<b>Estudos Anteriores</b>	Relevância clínica para DA. Super expressão de ABCA2 eleva a expressão de APP e aumento da proteína $\beta$ A. (CHEN et al., 2004; DAVIS JR, 2010).	Alta expressão em oligodendrócitos, e também níveis detectáveis em neurônios, microglia e astrócitos (KIM et al., 2006).	Importante papel no transporte de $\beta$ A, apresentando associação do rs1045642 com a DA (FEHÉR et al., 2014).	Ainda não há estudos relacionando o gene com a DA.	Maior expressão do gene em cérebros de pacientes com DA e sua proteína é encontrada em placas senis interagindo com ApoE e peptídeos de $\beta$ A (UEHARA et al., 2008).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar associação entre SNPs dos genes *ABCA2*, *ABCA3*, *ABCB1*, *ABCD1* e *ABCG4* com a Doença de Alzheimer.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se há associação entre as frequências alélicas e genotípicas para cada polimorfismo de pacientes e controles e a DA.
- Avaliar se há associação entre esses polimorfismos e variáveis clínicas, cognitivas (resultado do teste de Mini-Exame de Estado Mental, idade de início dos sintomas, tempo de doença, se faz ou não tratamento para controle de colesterol e gravidade da doença) e o gene *APOE* no grupo de pacientes com DA.

### 4. JUSTIFICATIVA

O crescente índice populacional de idosos ao redor do mundo, devido ao aumento de expectativa de vida, evidencia uma série de demências ligadas a idade como a Doença de Alzheimer, aumentando os gastos para o auxílio a esses doentes.

Torna-se cada vez mais necessária a investigação da doença, buscando entender como ocorre seu desenvolvimento e sua progressão nos pacientes afetados. Deste modo, estes estudos servem como base para futuros investimentos em agentes terapêuticos que atuem no tratamento e até na prevenção da DA, além do possível desenvolvimento de novos biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico inicial da doença, possibilitando cuidados adequados para o indivíduo para uma melhor qualidade de vida. Neste caso, evidencia-se a importância de estudos com genes ligados ao metabolismo de colesterol e deposição de peptídeos  $\beta$ A, para investigar sua influência no desenvolvimento da DA.



## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

A amostra se constitui de idosos diagnosticados com DA (152) e de idosos controles (122). Os grupos são provenientes do Ambulatório de Disfunção Cognitiva do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC – UFPR) e do Ambulatório de Desordens de Memória e do Comportamento do Instituto de Neurologia de Curitiba (INC). Para o grupo controle também foram coletadas amostras de idosos acompanhantes que não tivessem relação consanguínea com pacientes, no Centro Desportivo da UFPR (Curitiba), e na Igreja Adventista do 7° dia (Curitiba).

Os pacientes com DA esporádica (acima de 65 anos) foram diagnosticados segundo os critérios de diagnóstico (quadro 1), pelos médicos participantes do HC – UFPR e INC, foram excluídos pacientes que apresentassem demência diferente de DA, alcoolistas e com diagnóstico inconclusivo. Para o grupo controle, foram selecionados idosos acima de 60 anos que não apresentassem sequela de Acidente Vascular Cerebral, nem depressão profunda e que fossem alcoolistas. Além disto, os controles incluídos no estudo, obtiveram pontuação maior que a mínima exigida do teste de rastreio Mini-Exame do Estado Mental (MEEM – Anexo 1), que avalia a função cognitiva global do indivíduo, cujos valores de corte estão citados na tabela 2. A presença de doenças infectocontagiosas foi utilizada como critério de exclusão para ambos os grupos.

Tabela 1 – Pontuação do MEEM de controle de corte para o controle idoso (CI).

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.

Todos os indivíduos consentiram na participação neste estudo assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo 2). Esta pesquisa foi aprovada pelo



Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/SD), do setor de Ciências da Saúde da UFPR (protocolo de aprovação: 1192.117.11.08).

Tabela 3. Descrição geral das amostras estudadas.

Tabela descritiva dos dados			
	Casos	Controles	p
N	152	122	
Mulheres N (%)	98 (64,5)	88 (72,1)	0,176
Homens N (%)	54 (35,5)	34 (27,9)	
Idade			
Média N (DP)	79,17 (7,06)	70,18 (7,23)	2.2e-16
Média mulheres (DP)	79,71 (7,44)	70,29 (7,11)	
Média homens (DP)	78,18 (6,25)	69,86 (7,70)	
Idade de início da doença			
Média N (DP)	74,97 (6,39)	n/a	n/a
Média mulheres (DP)	75,35 (6,94)	n/a	
Média homens (DP)	74,33 (5,34)	n/a	
Score MEEM			
Média N (DP)	14,06 (7,59)	27,47 (2,12)	2.2e-16
Média mulheres (DP)	13,46 (7,72)	27,39 (2,06)	
Média homens (DP)	15,19 (7,30)	27,70 (2,30)	
CDR N(%):			
1	39 (30,5)	n/a	n/a
2	47(36,7)	n/a	
3	42(32,8)	n/a	
Presença ε4 (%)	48,05%	14,93%	2.3e-07

N = Número amostral.

DP = Desvio padrão.

n/a = Não aplicável.

## 5.2 EXTRAÇÃO DE DNA

O procedimento de coleta foi realizado em tubos a vácuo com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), por punção intravenosa. A extração de DNA foi realizada por procedimento de *salting out*, no Laboratório de Polimorfismos e Ligação do Departamento de Genética da UFPR. Neste processo há a separação de uma camada de leucócitos, que é a utilizada para a extração. Esta camada de leucócitos foi submetida a diversos reagentes e soluções químicas com o objetivo de lisar as células, precipitar e desnaturar

as proteínas para obtenção do DNA genômico e então armazenados em microtubos (adaptado da técnica do NONIDET P-40, modificado por LAHIRI; NURNBERGER, 1991).

### 5.3 ESCOLHA DOS SNPS

Foram selecionados ao total 12 SNPs de 5 genes, sendo todos eles considerados tag SNPs (tabela 4):

Tabela 4. Dados sobre os SNPs de cada gene selecionado para nosso estudo.

SNP	Gene	Localização	Mudança de base	MAF
rs10870162	<i>ABCA2</i>	Íntron	A/G	0.30 (A)
rs879854	<i>ABCA2</i>	Íntron	A/G	0.33 (G)
rs140818285	<i>ABCA3</i>	Íntron	A/G	0.48 (G)
rs668033	<i>ABCA3</i>	Íntron	A/C	0.41 (A)
rs150929	<i>ABCA3</i>	Íntron	G/T	0.48 (T)
rs7787082	<i>ABCB1</i>	Íntron	G/A	0.38 (A)
rs4728700	<i>ABCB1</i>	Íntron	T/C	0.46 (T)
rs2235035	<i>ABCB1</i>	Íntron	G/A	0.27 (A)
rs1055847	<i>ABCD1</i>	3' UTR	G/A	0.46 (A)
rs6571291	<i>ABCD1</i>	Íntron	C/T	0.27 (T)
rs323036	<i>ABCG4</i>	Íntron	G/A	0.11 (A)
rs323072	<i>ABCG4</i>	Íntron	C/T	0.31 (T)

Fonte: Projeto 1000 genomas, população CEU.

Todos foram selecionados de acordo com sua frequência na população, escolhendo SNPs com frequência maior que 10%, para evitar que sejam selecionadas variantes raras. Foram utilizados os dados do Projeto 1000 Genomas, população CEU, que foram carregados no programa Haploview (BARRETT et al., 2005) e utilizando a ferramenta Tagger, com valor limite de  $r^2$  de 0,8. Dos tag SNPs gerados por essa abordagem, foram selecionados SNPs de diferentes blocos de ligação.

### 5.4 GENOTIPAGEM MASSARRAY IPLEX – SEQUENOM

Os SNPs escolhidos foram genotipados na plataforma Sequenom, na Universidade de Auckland (Nova Zelândia). É uma técnica que pode ser utilizada para detecção de

Polimorfismos de nucleotídeo único, que permite analisar diversos SNPs simultaneamente em um mesmo ensaio, onde cada *primer* deve ter massa molecular diferente e não se sobrepor.

Basicamente, a técnica de genotipagem por MassARRAY iPLEX, consiste em realizar uma PCR convencional, onde são amplificados os fragmentos de interesse, logo ocorre a neutralização de dNTPs (trifosfato desoxirribonucleótidos) que não foram incorporados nas cadeias de DNA sintetizadas, os convertendo em dNDPs (difosfato de desoxirribonucleótidos), para que não sejam mais funcionais. Se segue para uma etapa de extensão, diferente de uma PCR convencional, onde apenas um nucleotídeo é incorporado, na posição do polimorfismo alvo, marcando o final do fragmento e permitindo sua detecção. A detecção é, então, realizada por espectrometria de massa (MALDI-TOF), onde é gerado um espectro que contém picos produzidos pelos produtos de extensão e os genótipos são inferidos pela comparação dos picos de massas do espectro das massas já calculadas comparados a dos produtos de extensão esperados (GABRIEL; ZIAUGRA; TABBAA, 2009).

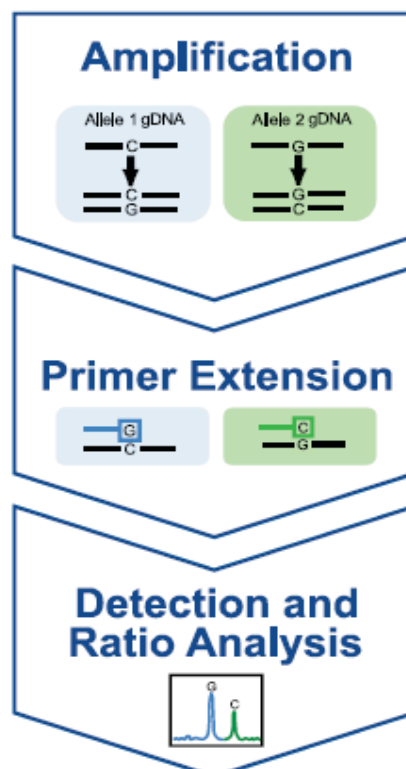


Figura 6. Esquemática do processo básico de genotipagem pelo Sequenom (SEQUENOM, 2010).

## 5.5 ANÁLISE DE DADOS

Os testes de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), as frequências alélicas, genotípicas, teste de equilíbrio de Hardy–Weinberg (HW), teste de desequilíbrio de ligação (GENETICS, 2013), comparação de médias e regressão logística multivariada, foram efetuados com uso do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008), adotando-se um nível de significância de 5%. Todas as variáveis foram transformadas em variáveis binárias, a partir de valores encontrados abaixo e acima da mediana de cada variável para a regressão logística multivariada.

As variáveis dependentes estudadas foram as seguintes: resultados dos exames do estado mental; estágio da doença obtidos através de valores *Clinical Dementia Rating* (CDR); idade de início da doença e se o indivíduo faz ou não tratamento para o controle dos níveis de colesterol. Todas as informações foram obtidas a partir dos prontuários médicos disponíveis no ato da coleta de sangue e testes de MEEM. O CDR é uma escala usada para caracterizar seis domínios de desempenho cognitivo e funcional. O nível de demência em DA é dado por três pontuações diferentes: 1 = Demência leve, 2 = Demência moderada e 3 = Demência grave. Em nosso estudo, os resultados de CDR foram testados de três formas diferentes: testamos 3 contra 2 (CDR - A), 3 contra 2 + 1 (CDR - B) e 3 + 2 contra 1 (CDR - C).

Para a análise de susceptibilidade, comparamos os genótipos de todos os SNPs do grupo controle com o grupo de pacientes, incluindo como variável independente junto aos genótipos para ajuste, sexo e a presença do alelo  $\epsilon 4$  do gene *APOE*. Avaliamos a relação entre genótipos e as demais variáveis dependentes do estudo por análise de regressão logística, onde analisamos por diferentes modelos: modelo genético de codominância (três genótipos separados. Exemplo: GG x GA x AA), modelo genético dominante (genótipo mais frequente + heterozigoto. Exemplo: GG+GA x AA) e modelo genético recessivo (genótipo menos frequente + heterozigoto. Exemplo: GG x GA+AA). Junto a isso, as análises foram feitas incluindo como variáveis independentes: os genótipos dos SNPs analisados, e para o ajuste genótipo de *APOE*, sexo e tempo de doença e escolaridade, quando necessários, também adotando um nível de significância de 5%.

## 6. RESULTADOS

Devido a problemas na genotipagem, apenas 8 dos 12 SNPs puderam ser analisados dos 5 genes escolhidos.

A distribuição dos genótipos do rs323036 não se encontra em equilíbrio de HW. O grupo controle do rs10870162 também não se encontra em equilíbrio de HW. A distribuição dos demais SNPs se encontram em equilíbrio de HW.

Mesmo que o grupo controle do rs10870162 não esteja em equilíbrio de HW, a frequência alélica se encontra de acordo com a descrita na literatura e o grupo de pacientes além de estar em equilíbrio também apresenta frequência genotípica e alélica próxima à descrita na literatura, comparando com o grupo CEU, população característica mis próxima à população de Curitiba, descartando a possibilidade de erro técnico na genotipagem. Como nossa amostra controle é direcionada à idosos que não apresentem nenhum transtorno cognitivo, espera-se que o alelo G neste caso, possa estar atuando como fator protetivo para a DA, uma vez que ele é mais frequente no grupo controle (tabela 5).

Tabela 5. Comparação das frequências alélicas e genotípicas do rs10870162 do gene *ABCA2*

rs10870162	Frequência alélica		Frequência genotípica		
	A	G	AA	AG	GG
Mundial	0.302	0.698	0.105	0.394	0.501
CEU	<b>0.283</b>	<b>0.717</b>	<b>0.061</b>	<b>0.444</b>	<b>0.495</b>
DA	0.307	0.693	<b>0.098</b>	<b>0.418</b>	<b>0.483</b>
CI	<b>0.269</b>	<b>0.739</b>	0.115	0.290	0.595

Foram calculados o desequilíbrio entre os três SNPs do gene *ABCB1* e os dois SNPs do gene *ABCG4*. No gene *ABCB1*, as análises entre o rs7787082 e rs4728700, e entre o rs7787082 e rs235035, apresentaram baixo desequilíbrio de ligação (DL) ( $D'=0,48$  e  $r^2=0,05$ ;  $D'=0,53$  e  $r^2=0,04$ ). Já os rs4728700 e rs2235035 apresentaram forte DL, mas baixo  $r^2$  ( $D'=0,96$  e  $r^2=0,37$ ) No gene *ABCG4*, a análise entre o rs323036 e 323072, apresentou baixo DL ( $D'=0,60$  e  $r^2=0,25$ ) (tabela 6).

Tabela 6. Resultado da análise de desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene *ABCB1* e entre os SNPs do gene *ABCG4*.

Gene	SNPs	D'	r <sup>2</sup>	
a	<i>ABCB1</i>	rs7787082 x rs4728700	0,48	0,0565
		rs7787082 x rs2235035	0,53	0,0497
		rs4728700 x rs2235035	<b>0,96</b>	0,3753
b	<i>ABCG4</i>	rs323036 x rs323072	0,60	0,2558

- a. Análise entre os SNPs do gene *ABCB1*.  
 b. Análise entre os SNPs do gene *ABCG4*.

Foram montados diferentes modelos de combinações entre SNPs nas análises de regressão, para que nenhum SNP que esteja em desequilíbrio com o outro esteja na mesma análise, mesmo que apresentem um DL considerado fraco. Ou seja, as análises foram realizadas com todos os SNPs dos outros genes mais 1 SNP do gene *ABCB1* e mais um SNP do gene *ABCG4*, de forma que cada SNP do gene *ABCB1* seja analisado com cada SNP do gene *ABCG4*.

Tabela 7. Modelos de combinações entre SNPs do gene *ABCG4* e do gene *ABCB1*, para as análises de regressão multivariadas.

Combinação	Gene <i>ABCG4</i>	Gene <i>ABCB1</i>	
	SNP		SNP
1	rs323036	+	rs2235035
2	rs323036	+	rs4728700
3	rs323036	+	rs778702
4	rs323072	+	rs2235035
5	rs323072	+	rs4728700
6	rs323072	+	rs778702

## 6.1 SUSCEPTIBILIDADE

Quando comparadas as frequências genóticas e alélicas de todos os SNPs estudados através do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), não encontramos nenhuma diferença significativa entre genótipos e alelos de DA e CI (Tabela 8). As frequências para o

rs1055847 foram realizadas separadamente, uma vez que ele está localizado no gene *ABCD1*, localizado no cromossomo X.

Tabela 8. Comparação das frequências alélicas e genotípicas entre DA e CI

		rs10870162							
		Grupos	Frequências alélicas %			Frequências genotípicas %			
			G	A	p	GG	GA	AA	p
ABCA2	DA (n=150)	69	31	0,2226	47	43	10	0,0725	
	CI (n=117)	74	26		59	29	12		
		rs150929							
		Grupos	Frequências alélicas %			Frequências genotípicas %			
			G	T	p	GG	GT	TT	p
ABCA3	DA (n=151)	55	45	0,4975	28	54	19	0,7563	
	CI (n=118)	52	48		25	53	22		
		rs7787082							
		Grupos	Frequências alélicas %			Frequências genotípicas %			
			G	A	p	GG	GA	AA	p
ABCB1	DA (n=151)	77	23	0,5094	60	34	6	0,8043	
	CI (n=119)	74	26		56	36	8		
		rs4728700							
		Grupos	Frequências alélicas %			Frequências genotípicas %			
			C	T	p	CC	CT	TT	p
ABCB1	DA (n=151)	59	41	0,3808	34	50	16	0,6688	
	CI (n=118)	56	44		31	50	19		
		rs2235035							
		Grupos	Frequências alélicas %			Frequências genotípicas %			
			G	A	p	GG	GA	AA	p
ABCD1	DA (n=151)	64	36	0,5274	40	48	12	0,6701	
	CI (n=118)	67	33		45	43	12		
		rs1055847 - Mulheres							
		Grupos	Frequências alélicas %			Frequências genotípicas %			
			G	A	p	GG	GA	AA	p
ABCD1	DA (n=98)	42	58	0,649	17	50	33	0,4177	
	CI (n=88)	40	60		11	58	31		
		rs1055847 - Homens							
		Grupos	Frequências genotípicas e alélicas %						
			G	A	p				
ABCD1	DA (n=52)	42	58	0,4223					
	CI (n=30)	33	67						
		rs323036							
		Grupos	Frequências alélicas %			Frequências genotípicas %			
			G	A	p	GG	GA	AA	p
ABCG4	DA (n=137)	76	24	0,7856	66	20	14	0,9672	
	CI (n=111)	75	25		65	21	14		
		rs323072							
		Grupos	Frequências alélicas %			Frequências genotípicas %			
			C	T	p	CC	CT	TT	p
ABCG4	DA (n=151)	71	29	0,699	50	41	9	0,6941	
	CI (n=119)	69	31		46	46	8		



Quando analisamos por regressão logística incluindo todos os SNPs, o rs10870162, do gene *ABCA2*, apresentou diferença significativa com o modelo genético recessivo em todos os modelos de combinações de SNPs (valores de p na tabela 9). Entre os idosos saudáveis, cerca de 60% apresenta genótipo G/G, 10% a mais que em pacientes com DA (distribuição genotípica para o rs10870162 no gráfico 1).

Tabela 9. Resultado significativo para as análises de regressão do rs10870162 do gene *ABCA2* entre DA e CI.

Combinação	Modelo	p
1	GG x GA+AA	<b>0.0418</b>
2	"	<b>0.0448</b>
3	"	<b>0.0434</b>
4	"	<b>0.0412</b>
5	"	<b>0.0404</b>
6	"	<b>0.0387</b>

1. Combinação 1 - rs323036 (*ABCG4*) e rs2235035 (*ABCB1*)
2. Combinação 2 - rs323036 (*ABCG4*) e rs4728700 (*ABCB1*)
3. Combinação 3 - rs323036 (*ABCG4*) e rs7787082 (*ABCB1*)
4. Combinação 4 - rs323072 (*ABCG4*) e rs2235035 (*ABCB1*)
5. Combinação 5 - rs323072 (*ABCG4*) e rs4728700 (*ABCB1*)
6. Combinação 6 - rs323072 (*ABCG4*) e rs7787082 (*ABCB1*)

Também realizamos análise de regressão com ajuste por sexo e ajuste por sexo e presença de E4. Nas análises de ajuste por sexo, o SNP rs10870162 continua significativo em todas os modelos de combinações de SNPs, também no modelo genético recessivo (valores de p na tabela 10), porém quando incluída, além do sexo, presença do alelo E4 como variável independente, o rs10870162 não continua sendo significativo, mas apresenta valores de p com uma tendência, estando muito próximos a 0,05 (valores de p na tabela 10).

Tabela 10. Resultado análises de regressão do rs10870162 do gene *ABCA2* no modelo genético recessivo para susceptibilidade à DA, comparando pacientes e controles. C=combinação.

C	Modelo	p	C	Modelo	p
1	GG x GA+AA	<b>0.0366</b>	4	GG x GA+AA	<b>0.0350</b>
	sexo	0.0575		sexo	0.0551
1	GG x GA+AA	0.0964	4	GG x GA+AA	0.0821
	sexo	0.0660		sexo	0.0559
	E4	<b>1.26e-05</b>		E4	<b>2.3e-06</b>
2	GG x GA+AA	<b>0.0395</b>	5	GG x GA+AA	<b>0.0342</b>
	sexo	0.0682		sexo	0.0674
2	GG x GA+AA	0.1028	5	GG x GA+AA	0.0770
	sexo	0.0755		sexo	0.0673
	E4	<b>2.09e-05</b>		E4	<b>4.2e-06</b>
3	GG x GA+AA	<b>0.0383</b>	6	GG x GA+AA	<b>0.0329</b>
	sexo	0.0594		sexo	0.0605
3	GG x GA+AA	0.0999	6	GG x GA+AA	0.0739
	sexo	0.0654		sexo	0.0600
	E4	<b>2.19e-05</b>		E4	<b>4.54e-06</b>

C=combinação.

- Análise com o modelo de combinação 1 - rs323036 (*ABCG4*) e rs2235035 (*ABCB1*)
- Análise com o modelo de combinação 2 - rs323036 (*ABCG4*) e rs4728700 (*ABCB1*)
- Análise com o modelo de combinação 3 - rs323036 (*ABCG4*) e rs7787082 (*ABCB1*)
- Análise com o modelo de combinação 4 - rs323072 (*ABCG4*) e rs2235035 (*ABCB1*)
- Análise com o modelo de combinação 5 - rs323072 (*ABCG4*) e rs4728700 (*ABCB1*)
- Análise com o modelo de combinação 6 - rs323072 (*ABCG4*) e rs7787081 (*ABCB1*)

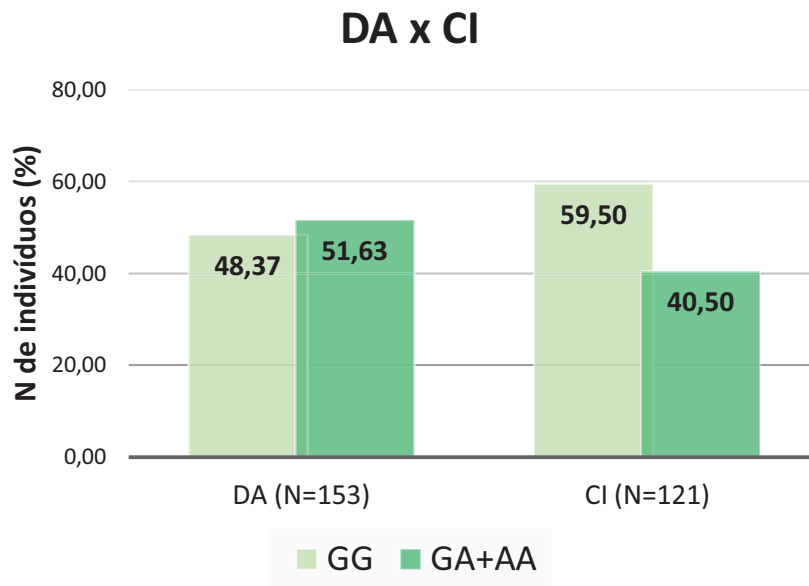


Gráfico 1. Distribuição dos genótipos do rs10870162 do gene *ABCA2* em porcentagem em relação à susceptibilidade da doença, comparando DA x CI.

Nas análises de regressão para susceptibilidade à doença, quando incluída a variável presença do alelo  $\epsilon 4$  e sexo, a presença do alelo  $\epsilon 4$  se mostra significativa em todos os modelos do conjunto de SNPs. O grupo de pacientes apresenta um valor de 33% a mais de indivíduos que possuam pelo menos a presença de 1 alelo  $\epsilon 4$  (ver frequência de indivíduos que têm a presença de  $\epsilon 4$  na tabela 3).

## 6.2 MEEM

Analisando a variável MEEM dentro do grupo de pacientes, apenas o rs150929 do gene *ABCA3* apresentou resultado significativo, indicando uma possível associação com a DA. O rs150929, apresentou resultados significativos no modelo genético codominante ( $p=0.0241$ , tabela 11a;  $p=0.0256$ , tabela 11c;  $p=0.0372$ , tabela 11e) e recessivo ( $p=0.0303$ , tabela 11b;  $p=0.0313$ , tabela 11d;  $p=0.331$  tabela 11f).

Tabela 11. Resultados significativos das análises de regressão do rs150929 do gene *ABCA3* para a variável MEEM nos pacientes.

MEEM – rs150929					
C	Modelo	p	C	Modelo	p
a	GG x GT x TT	<b>0.0241</b>	b	GG x GT+TT	<b>0.0303</b>
	Sexo	0.2168		Sexo	0.2561
	Genótipo <i>APOE</i>	0.1104		Genótipo <i>APOE</i>	0.1361
	Tempo de doença	0.2910		Tempo de doença	0.2585
	Escolaridade	<b>0.0216</b>		Escolaridade	<b>0.0245</b>

C=combinção.

Esta associação aparece tanto no modelo codominante, como recessivo, porém com uma maior significância no modelo codominante, portanto, estes resultados indicam que indivíduos que apresentam o genótipo *G/G* possuem um maior déficit cognitivo quando comparados com indivíduos com apenas um alelo *G* ou homocigotos *T/T*, uma vez que o genótipo *G/G* é 20% mais frequente em pacientes com valores de teste de MEEM abaixo da mediana (pontuação 15).

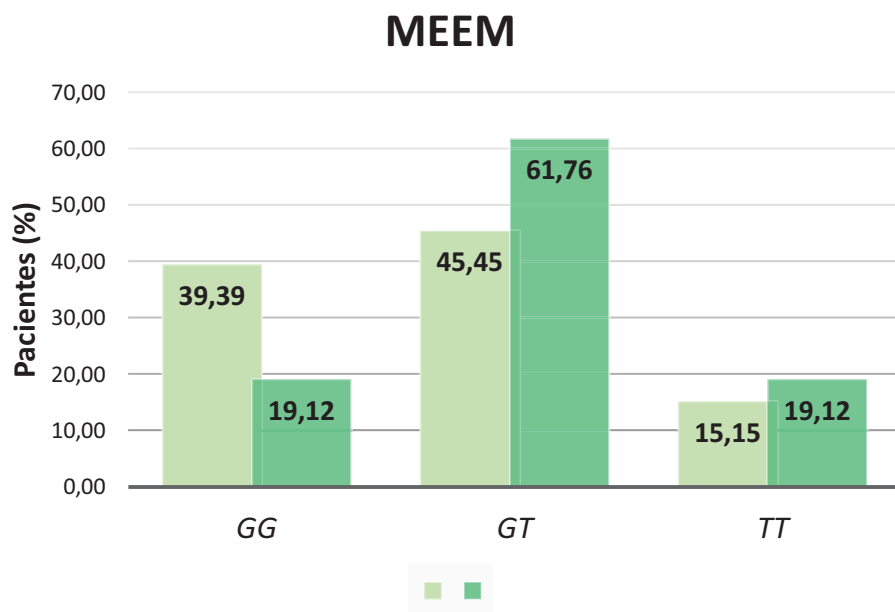


Gráfico 2. Distribuição de genótipos do rs150929 do gene *ABCA3* em porcentagem em relação ao teste cognitivo na análise de MEEM. Para a comparação, os pacientes que obtiveram pontuação abaixo da mediana foram classificados como 0 e os pacientes com pontuação acima da mediana foram classificados como 1.

### 6.3 CDR – GRAVIDADE DA DOENÇA

As análises de regressão para CDR foram divididas em três modelos: foram comparados níveis de gravidade grave versus moderada (CDR – A: 3x2), grave versus leve + moderada (CDR – B: 3x 1+2) e moderada + grave versus leve (CDR – C: 2+3 x1), de acordo com as pontuações de cada paciente.

Para o CDR - A, apenas o rs1055847 do gene *ABCD1*, apresentou resultado significativo em seu modelo dominante ( $p=0.0423$ , tabela 12a;  $p=0.0396$ , tabela12b), em apenas duas análises das 6 combinações.

O gene *ABCD1* está localizado no cromossomo X, portanto a frequência dos genótipos devem ser observadas separadamente, pois homens serão hemizigotos (G ou A) e mulheres apresentam os genótipos em homozigose e heterozigose (G/G, A/A e G/A). Quando analisamos a frequência dos genótipos separadamente, nota-se que apenas os homens apresentam diferença na frequência, sendo a que frequência do alelo G em pacientes que possuem maior gravidade (nível 3) é 10% superior ao de pacientes com nível 2 de gravidade (distribuição dos genótipos no gráfico 3).

Tabela 12. Resultados significativos das análises de regressão do rs1055847 do gene *ABCD1* de CDR - A em pacientes.

CDR - A - rs1055847		
C	Modelo	p
a		
2	GG+GA x AA	<b>0.0423</b>
	Sexo	0.9824
	Genótipo <i>APOE</i>	0.1943
	Tempo de doença	0.9807
b		
3	GG+GA x AA	<b>0.0396</b>
	Sexo	0.9852
	Genótipo <i>APOE</i>	0.1695
	Tempo de doença	0.9898

C=combinação.

- a. Combinação 2 - rs323036 (*ABCG4*) e rs4728700 (*ABCB1*) – modelo dominante
- b. Combinação 3 - rs323036 (*ABCG4*) e rs7787082 (*ABCB1*) – modelo dominante

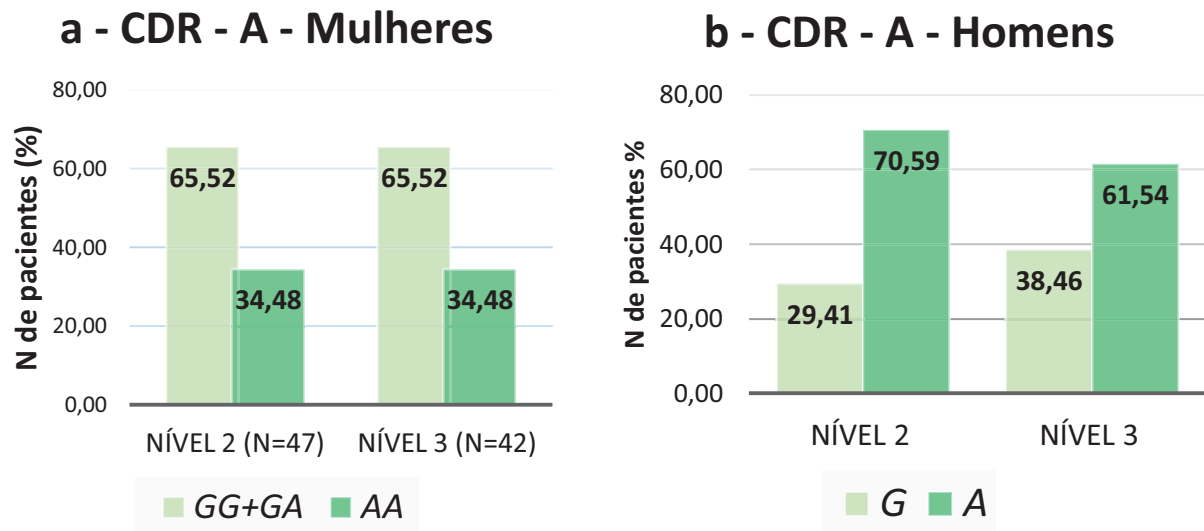


Gráfico 3. Distribuição dos genótipos do rs1055847 do gene *ABCD1* em porcentagem em relação ao nível de gravidade da doença na análise de CDR – A, estratificados por sexo.

a. Mulheres.

b. Homens.

Portanto, devido a essa diferença na frequência dos genótipos ser apenas nos homens, outra análise de regressão foi realizada, estratificando homens e mulheres, confirmando que apenas em homens este SNP continua apresentando associação ( $p=0.0387$ ,  $p=0.0448$ ,  $p=0.0422$ , tabela 13a).

Tabela 13. Resultados das análises de regressão após estratificação de homens e mulheres, do rs1055847 do gene *ABCD1* de CDR - A em pacientes.

CDR - A - rs1055847		
C	Modelo	p
a		
4	G x A	<b>0.0387</b>
5	G x A	<b>0.0448</b>
6	G x A	<b>0.0422</b>
b		
4	GG+GA x AA	0.5940
5	GG+GA x AA	0.5700
6	GG+GA x AA	0.4728

C=combinação.

Combinação 1 - rs3323036 (*ABCG4*) e rs2235035 (*ABCB1*).

Combinação 2 - rs3323036 (*ABCG4*) e rs4728700 (*ABCB1*).

Combinação 3 - rs3323036 (*ABCG4*) e rs7787082 (*ABCB1*).

- a. Análise de pacientes homens.  
b. Análise de pacientes mulheres.

Nas análises de CDR - B apenas o rs150929 do gene *ABCA3* apresentou resultados significativos em seu no modelo codominante ( $p=0.0356$ , tabela14)

Tabela 14. Resultados significativos das análises de regressão do rs150929 do gene *ABCA3* da análise da variável CDR - B em pacientes.

CDR - B - 150929		
C	Modelo	p
a	GG x GT x TT	<b>0.0356</b>
	Sexo	0.2898
	Genótipo <i>APOE</i>	0.0713
	Tempo de doença	0.5424

C=combinação.

Estes resultados para o rs150929 mostram que indivíduos que apresentam o alelo G em homozigose (G/G) apresentam uma maior gravidade da doença, quando comparados com indivíduos homozigotos T/T, enquanto indivíduos heterozigotos G/T apresentam o mesmo risco para gravidade. No grupo de menor gravidade de nível 2+1 apenas 26,7% dos pacientes têm o genótipo G/G, enquanto no grupo de maior gravidade, nível 3, 40,5% dos pacientes têm o genótipo G/G, quase 15% a mais de indivíduos (distribuição de genótipos no gráfico 4).

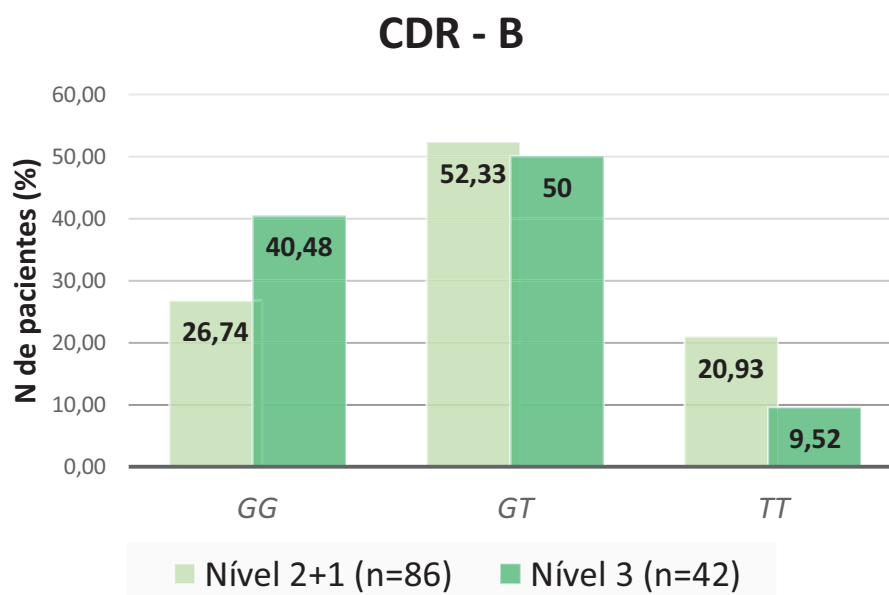


Gráfico 4. Distribuição de genótipos do rs150929 do gene *ABCA3* em relação ao nível de gravidade da doença na análise da variável CDR - B.



Nas análises de CDR - C, o rs4728700 e rs2235035 do gene *ABCB1* apresentaram resultados significativos, indicando associação com DA.

O rs4728700 apresentou resultados significativos nos 3 modelos genéticos e todas as análises de modelos de combinações em que foi incluído (2 e 5). Dos três modelos genéticos, o codominante apresenta resultados mais significativos ( $p=0.0034$ , tabela 15a;  $p=0.0005$ , tabela 15d) nas três análises de diferentes combinações.

Tabela 15. Resultados significativos das análises de regressão do rs4728700 do gene *ABCB1* da análise da variável CDR - C em pacientes.

CDR - C - rs4728700					
C	Modelo	p	C	Modelo	p
a			d		
2	CC x CT x TT	<b>0.0034</b>	5	CC x CT x TT	<b>0.0005</b>
	Sexo	0.7548		Sexo	0.4551
	Genótipo <i>APOE</i>	0.5775		Genótipo <i>APOE</i>	0.6061
	Tempo de doença	0.9480		Tempo de doença	0.8197
b			e		
2	CC+CT x TT	<b>0.0047</b>	5	CC+CT x TT	<b>0.0053</b>
	Sexo	0.6597		Sexo	0.7900
	Genótipo <i>APOE</i>	0.8133		Genótipo <i>APOE</i>	0.9756
	Tempo de doença	0.5082		Tempo de doença	0.4529
c			f		
2	CC x CT+TT	<b>0.0146</b>	5	CC x CT+TT	<b>0.0019</b>
	Sexo	0.5569		Sexo	0.3147
	Genótipo <i>APOE</i>	0.7084		Genótipo <i>APOE</i>	0.6638
	Tempo de doença	0.8243		Tempo de doença	0.7388

C=combinação.

- Análise com o modelo de combinação 2 - rs323036 (*ABCG4*) e rs4728700 (*ABCB1*) – modelo codominante
- Análise com o modelo de combinação 2 - rs323036 (*ABCG4*) e rs4728700 (*ABCB1*) – modelo dominante
- Análise com o modelo de combinação 2 - rs323036 (*ABCG4*) e rs4728700 (*ABCB1*) – modelo recessivo
- Análise com o modelo de combinação 5 - rs323072 (*ABCG4*) e rs4728700 (*ABCB1*) – modelo codominante
- Análise com o modelo de combinação 5 - rs323072 (*ABCG4*) e rs4728700 (*ABCB1*) – modelo dominante
- Análise com o modelo de combinação 5 - rs323072 (*ABCG4*) e rs4728700 (*ABCB1*) – modelo recessivo

No nível de gravidade do grupo 2+3, 42,7% dos pacientes apresentam o genótipo C/C, enquanto apenas 18% dos pacientes no nível 1 de gravidade apresentam este genótipo, porém quando comparados pacientes heterozigotos dos dois níveis analisados, apresentam quase a mesma frequência, cerca de 48% (ver distribuição de genótipos no gráfico 5).

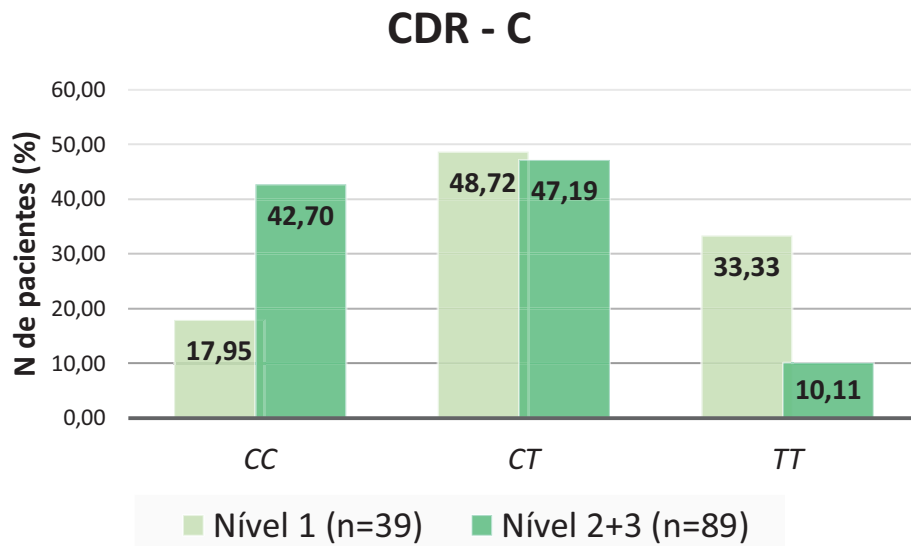


Gráfico 5. Distribuição de genótipos do rs4728700 do gene *ABCB1* em relação ao nível de gravidade da doença na análise da variável CDR - C.

O rs2235035 também apresentou resultados significativos nas três análises em que foi incluído (1 e 4), porém apenas na análise do modelo de combinação 4 obteve significância tanto no modelo genético codominante ( $p=0.0218$ , tabela 16b) quanto no modelo recessivo ( $p=0.0089$ , tabela 16c), apresentando um  $p$  mais significativo no modelo genético recessivo. No modelo de combinação 1 ele apresentou resultado significativo apenas em seu modelo recessivo ( $p=0.0302$ , tabela 15a).

Tabela 16. Resultados significativos das análises de regressão do rs2235035 do gene *ABCB1* da análise da variável CDR - C em pacientes.

CDR - C - rs2235035						
C	Modelo	p	C	Modelo	p	
a						
1	GG x GA+AA	<b>0.0302</b>				
	Sexo	0.9683				
	Genótipo <i>APOE</i>	0.6001				
	Tempo de doença	0.5125				
b			c			
4	GG x GA x AA	<b>0.0218</b>	4	GG x GA+AA	<b>0.0089</b>	
	Sexo	0.6588		Sexo	0.7394	
	Genótipo <i>APOE</i>	0.6115		Genótipo <i>APOE</i>	0.5761	
	Tempo de doença	0.6491		Tempo de doença	0.5231	

C=combinação.

- Análise com o modelo de combinação 1 - rs323036 (*ABCG4*) e rs2235035 (*ABCB1*) - modelo recessivo
- Análise com o modelo de combinação 4 - rs323072 (*ABCG4*) e rs2235035 (*ABCB1*) - modelo codominante
- Análise com o modelo de combinação 4 - rs323072 (*ABCG4*) e rs2235035 (*ABCB1*) - modelo recessivo

Para o rs2235035 indivíduos com a presença do alelo A (A/A, G/A) são 23,5% mais frequentes no grupo de níveis de maior gravidade (2+3) e 54% dos pacientes no nível de menor gravidade da doença apresentam o genótipo G/G (distribuição dos genótipos no gráfico 6).

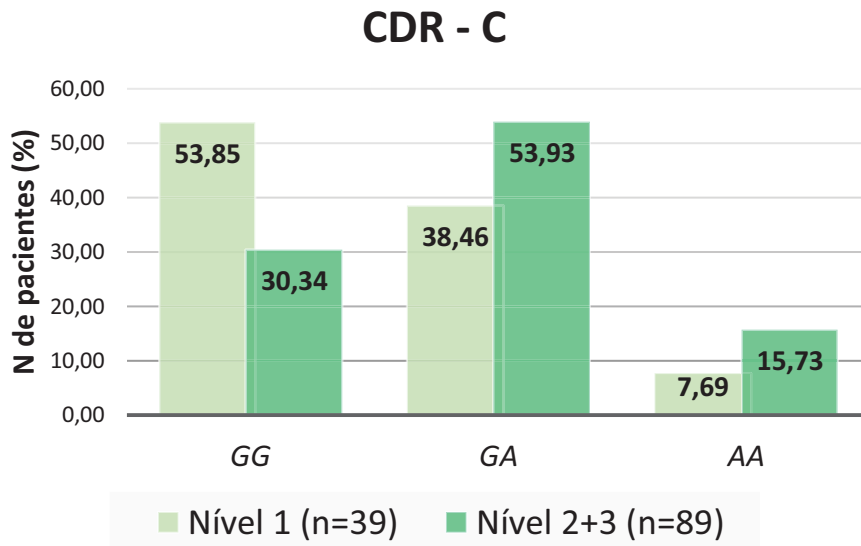


Gráfico 6. Distribuição de genótipos do rs2235035 do gene *ABCB1* em porcentagem em relação ao nível de gravidade da doença na análise da variável CDR3.

Não encontramos associação do rs7787082 do gene *ABCB1* e dos rs323036 e rs323072 do gene *ABCG4*, para nenhuma variável analisada. Também não foram encontradas associações com as variáveis de idade de início da doença e tratamento para colesterol.

## 7. DISCUSSÃO

As demências neurodegenerativas têm-se evidenciado cada vez mais devido ao aumento da expectativa de vida e conseqüentemente, aumento da população idosa. Segundo o último Relatório Mundial de Alzheimer, atualmente cerca de 47 milhões de pessoas vivem com alguma forma de demência, porém apenas uma média de 40% dessas pessoas recebem o diagnóstico correto, sendo que o índice pode ser menor em até 10% em países de baixa e média renda, o que dificulta a devida assistência com cuidados e possíveis tratamentos com cada demência (NAKAMURA et al., 2015; PRINCE et al., 2016).

A DA se destaca como a demência de maior prevalência e incidência entre os idosos, porém sua etiologia ainda não é bem elucidada e também não há tratamentos que curem ou diminuam os avanços da sua patologia (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2017a). Por haverem estudos que indicam associação da demência com o metabolismo de colesterol, nossa pesquisa teve como foco investigar alguns genes candidatos que estão relacionados com o transporte de lipídios e possam estar colaborando com o desenvolvimento da DA.

O presente estudo encontrou associação significativa entre o rs10870162 do gene *ABCA2* apenas com relação à susceptibilidade à DA quando analisado sem ajuste da presença do alelo  $\epsilon 4$ , porém quando ajustado com esta covariável, deixa de apresentar associação significativa, o que indica que possivelmente esse SNP tenha um efeito fraco sobre a doença e mostra o quanto o alelo  $\epsilon 4$  do gene *APOE* atua fortemente como um fator de risco e, matematicamente pelas análises de regressão, pode mascarar o efeito de outras variáveis que biologicamente possam estar contribuindo com o desenvolvimento da DA, já que se trata de uma demência de etiologia multifatorial. Em todas as análises, o alelo  $\epsilon 4$  apresenta uma associação significativa muito forte com a DA, corroborando estudos anteriores, que já o indicam como fator de risco para a doença (CORDER et al., 1993; KUUSISTO et al., 1994; MICHAELSON, 2014; SADIGH-ETEGHAD; TALEBI; FARHOUDI, 2012; SAUNDERS et al., 1993; STRITTMATTER et al., 1993).

Nosso estudo verificou que para o rs10870162 a frequência de indivíduos com o genótipo *G/G* é maior no grupo de controle que pacientes (10% a mais). Isso indica, neste caso, que o genótipo *G/G* possa estar atuando como fator protetivo para a susceptibilidade à doença, quando comparados com indivíduo com a presença de pelo menos um alelo *A* (tanto em homozigose *A/A* quanto como heterozigoto *G/A*). Mesmo que este SNP esteja em uma região intrônica, por ele ser um tag SNP, pode estar mostrando

efeito de algum outro SNP que leva a uma mudança de base que mude de alguma forma a expressão ou conformação da proteína Abca2, ou seja, que esteja atuando na regulação transcricional ou pós transcricional deste gene. Recente estudo encontrou evidências de que o gene *ABCA2* é super-expresso em pacientes com a DA, quando comparados com idosos saudáveis, sugerindo que a observação de níveis de mRNA do gene possa ser utilizada como biomarcador para diagnóstico para demência (HU et al., 2017). O único estudo realizado com este SNP, não encontrou associações significativas com a DA (MACÉ et al., 2005). Mesmo não tendo sido encontrados outros estudos que relacionem esse SNP especificamente com a DA, diferentes estudos encontraram associações significativas do SNP rs908832 (C/T – mutação sinônima D679D) do gene *ABCA2* com a DA tanto de início precoce, quanto de início tardio, que apresenta alto desequilíbrio de ligação com o rs10870162 ( $D'=1$  e  $r^2=1$ ) e sugerem uma forte relação com a modulação da expressão do gene *APP* e produção de peptídeos  $\beta$ -amiloide, sendo que super-expressão do gene *ABCA2* aumenta a produção de peptídeos  $\beta$ A e sua baixa expressão também diminui a produção destes peptídeos (CHEN et al., 2004; DAVIS JR, 2010; MACÉ et al., 2005; MICHAKI et al., 2012; XU et al., 2013).

O gene *ABCA2* é altamente expresso no cérebro, dentro de neurônios e oligodendrócitos do sistema nervoso central (KIM et al., 2006; VULEVIC et al., 2001), e células de Schwann no sistema nervoso periférico (SAITO et al., 2007). Este gene está relacionado com a homeostase de colesterol, principalmente na expressão de receptores de colesterol LDL (*Low-density lipoprotein* – Lipoproteína de baixa densidade), que são importantes no desenvolvimento de neurônios e na regeneração de axônios (DAVIS, 2011; MACK et al., 2007). A super-expressão de *ABCA2* reduz os receptores de LDL e essa deficiência nas células e gera aumento dos níveis de colesterol livre, que são fatores contribuintes para o desenvolvimento da DA.

A hipercolesterolemia têm sido relacionada com o aumento do acúmulo de proteínas  $\beta$ A que levam à formação das placas senis, a partir de mudanças do processamento da APP. O aumento de colesterol modula a formação da membrana plasmática, o que pode alterar a forma com que a APP se localiza, afetando o contato enzima-substrato e então alterando a atividade de secretases que clivam a APP, para a formação dos peptídeos (REFOLO et al., 2000; XIONG et al., 2008). Uma vez que, *ABCA2* têm sido relacionada tanto com o controle de níveis colesterol quanto com o acúmulo de  $\beta$ A, propõe-se que este gene possa estar contribuindo para reforçar a hipótese da cascata amiloide, e dessa maneira atuar no desenvolvimento da DA.

Para o gene *ABCA3* não foram encontradas associações com a susceptibilidade à doença, porém, foram encontradas associações com as variáveis MEEM e CDR. Apenas o rs150929 apresentou associação com essas duas variáveis. Para o MEEM, o genótipo G/G, é 20% mais frequente em pacientes com pontuação de teste abaixo do valor da mediana (15). Isso indica que o genótipo G/G possa estar contribuindo como um fator de risco, para um aumento do déficit cognitivo, consequentemente levando a valores mais baixos de MEEM. O mesmo acontece com a variável CDR, pacientes com o genótipo G/G são 15% mais frequentes no nível maior de gravidade, CDR 3, novamente indicando que o genótipo G/G esteja contribuindo com o avanço mais acelerado da gravidade da doença.

O gene *ABCA3* é expresso principalmente nos pulmões e fígado e está presente na membrana de corpos lamelares, que são organelas ricas em lipídios que produzem e secretam surfactante pulmonar, composto rico em lipídios variados e algumas proteínas, sendo que a *Abca3*, regula o transporte destas substâncias. Além disso, mutações em *ABCA3* estão associadas à defeitos na formação de corpos lamelares, levando à uma síndrome respiratória fatal em recém-nascidos e outras doenças pulmonares (NAGATA et al., 2004; YAMANO et al., 2001). Também foram detectados níveis de expressão no cérebro, principalmente da proteína, o que indica que a *Abca3*, apresente alguma função em células cerebrais (PROTEIN ATLAS, 2018; STAHLMAN et al., 2007). Outro estudo realizado com células do cérebro fetal humano, encontraram expressões significativas de mRNA de *ABCA3* em olidendrócitos principalmente, mas também detectada em neurônios, micróglia e astrócitos (KIM et al., 2006).

FITZGERALD et al., 2007, em seu estudo em modelos de camundongos *knockout* de *Abca3*, evidencia que o colesterol não é tão afetado, porém os níveis de lipídios como fosfatidilcolina e fosfatidilglicerol são alterados. Há indícios recentes de que a fosfatidilcolina auxilia a retardar e até prevenir mudanças relacionadas ao avanço da idade, por fornecer colina e ácidos graxos essenciais para a manutenção da integridade da região cortical, com isso, indicando uma possível relação positiva entre níveis de fosfatidilcolina e a flexibilidade cognitiva (ZAMROZIEWICZ; ZWILLING; BARBEY, 2016).

Uma vez que nossos resultados mostram que o genótipo G/G do rs150929 está mais presente em pacientes com um maior déficit cognitivo e maior gravidade da doença, esse SNP pode estar em desequilíbrio com outro SNP que altere os níveis de expressão de *Abca3*, consequentemente alterando o transporte e níveis lipídicos no cérebro, como a fosfatidilcolina, levando a processos que possam acelerar o processo de

neurodegeneração, levando à uma diminuição da flexibilidade cognitiva, o que justifica a associação com maior déficit cognitivo e maior gravidade.

Outra hipótese, é a de que o genótipo *T/T* possa estar contribuindo com uma menor longevidade dos pacientes com DA, por isso encontramos mais pacientes com maiores comprometimentos com o genótipo *G/G*. Ao se analisar a distribuição dos genótipos de acordo com o tempo de doença (gráfico de *boxplot* de distribuição em apêndice), notamos que o genótipo *G/G* é presente em pacientes com tempo de doença maior, enquanto pacientes com o genótipo *T/T* está presente em pacientes com menor tempo de doença, porém essa análise não apresentou resultados significativos ( $p=0.07$ ). Este efeito só foi observado no rs150929, outros SNPs que apresentaram associação com CDR, não apresentam diferença entre os genótipos de acordo com o tempo de doença (gráfico 1 de *boxplot* em apêndice).

Também encontramos associação com dois SNPs do gene *ABCB1* para gravidade da doença medida através do CDR. Nenhum deles foi relacionado diretamente com a susceptibilidade à doença, indicando que essas variações não são suficientes para o seu desenvolvimento, mas se já apresentado a doença, essas variações podem contribuir na gravidade da doença.

O rs4728700 apresentou associação apenas com o CDR - C, que são os níveis 2+3 comparados ao nível 1. Cerca de 43% dos pacientes do grupo de CDR nível 2+3 apresentam o genótipo *C/C*, enquanto apenas 18% dos pacientes de CDR nível 1 apresentam este mesmo genótipo, o que indica que a presença do genótipo *C/C* em pacientes esteja contribuindo para uma maior gravidade da doença quando comparados com pacientes de genótipo *T/T*, que estão mais presentes no menor nível de CDR. O único estudo de associação encontrado com o rs4720700, indica que este SNP tenha uma interação com o rs34104788 do gene *SIRT1*, sugerindo que estes dois genes em conjunto estejam modificando o risco da DA através da remoção de proteínas  $\beta$ A do cérebro (HOHMAN et al., 2016). A proteína codificada pelo gene *SIRT1* atua no geral, desacetilando proteínas regulatórias para desencadear resistência à estresses metabólicos, oxidativo, térmico e hipóxico, e é sugerido que este gene atue na regulação da produção de  $\beta$ A, a partir da modulação das  $\alpha$ -secretases (DONMEZ et al., 2010; QIN et al., 2006).

O rs2235035, também apresentou associação apenas com CDR - C, sendo que pacientes com a presença de pelo menos um alelo *A* apresentem uma maior gravidade da doença que indivíduos *G/G*. 54% dos pacientes com menor nível de CDR apresentam o



genótipo G/G, o que indica que este genótipo possa estar atuando de forma protetiva contra a doença, mesmo que também esteja em uma região intrônica, também pode estar em desequilíbrio com outro gene que atue na modulação e expressão do gene *ABCB1* e da proteína P-gp. Nenhum outro estudo relacionado com doenças neurodegenerativas foi encontrado com esse SNP.

O gene *ABCB1* é reconhecido por participar do metabolismo de fármacos e ser o mais importante transportador de drogas no cérebro, uma vez que é altamente expresso no cérebro e na BBB (*blood-brain-barrier*), a barreira hematoencefálica. (FROMM, 2004), ou seja, contribui para a excreção de metabólitos no cérebro, além de permear a entrada de outras substâncias que podem ser tóxicas (MILLER; BAUER; HART, 2008). Há um consenso em uma série de estudos, que indicam uma forte relação da proteína P-gp, que é sintetizada pelo *ABCB1*, e o balanço entre níveis de proteína  $\beta$ A através do transporte pela BBB e que deficiências nesse efluxo causariam um aumento do acúmulo neurotóxico desta proteína no cérebro (ELALI; RIVEST, 2013; GOSSELET; SAINT-POL; FENART, 2014; KUHNKE et al., 2007; KUNTZ et al., 2015; MAGLIULO et al., 2011; SAINT-POL et al., 2013; WANG; BODLES-BRAKHOP; BARGER, 2016). A expressão da proteína P-gp diminui de acordo com o avanço da idade, tanto em indivíduos com alguma demência neurodegenerativa, quanto em idosos saudáveis. Portanto essa redução da sua função na BBB dificulta o transporte de  $\beta$ A para a corrente sanguínea, causando seu acúmulo e danos em células neuronais. Em pacientes com DA a expressão de P-gp é significativamente menor que em idosos cognitivamente saudáveis (BARTELS et al., 2009). Além disso CHEN et al., 2011 ao analisar a expressão de *ABCB1* em idosos saudáveis, pacientes com comprometimento cognitivo leve e pacientes com DA, encontrou diferença significativa entre os três grupos e de maneira gradual, indicando que este gene possua uma importante relação com a progressão da doença. Neste mesmo estudo, encontraram uma correlação positiva da expressão do gene *ABCB1* com resultados de MEEM.

Nossa hipótese é de que se a expressão já diminui de acordo com a idade e é menor ainda em pacientes com a doença, essas variantes podem estar contribuindo mais ainda para reduzir a expressão do gene e, conseqüentemente, aumentando os danos causados no cérebro, devido ao aumento da deposição de proteínas  $\beta$ A, uma vez que seu transporte para a corrente sanguínea se torna mínimo ou quase que ineficiente por essa via. Estes danos levam à um avanço mais rápido da doença, apresentando uma maior gravidade. Porém, são necessários estudos futuros para investigar como são modulados os níveis de expressão deste gene, de acordo com a relação status de CDR e genótipo.

Não há dados na literatura de associação entre o gene *ABCB1* e a gravidade da doença, sendo este o primeiro estudo a encontrar associações entre estes polimorfismos e a gravidade da doença.

Para o gene *ABCD1* também encontramos associação do rs1055847 em seu modelo dominante com CDR - A, que é a comparação de níveis de gravidade 3 contra 2,. Porém, por ser um gene localizado no cromossomo X, ao estratificar a análise de regressão por sexo, apenas pacientes homens continuam apresentando resultados significativos. Pacientes homens com a presença do alelo G apresentam uma maior gravidade da doença que pacientes com o alelo A. Estes resultados indicam que a presença do alelo G possa estar atuando como fator de risco para doença de Alzheimer quando comparados com pacientes hemizigotos A, uma vez que a frequência de pacientes homens G é 10% maior no grupo de maior gravidade da doença.

Este SNP apresentou associações positivas apenas em 3 dos 9 modelos de combinações que foi analisado, isso pode indicar que SNPs incluídos nestas três análises (modelo 1: rs323036 do gene *ABCG4* e rs2235035 do gene *ABCB1*; modelo 2: rs323036 do gene *ABCG4* e rs4728700 do gene *ABCB1* e modelo 3: rs323036 do gene *ABCG4* e rs7787082 do gene *ABCB1*, sendo que o rs2235035 e o rs4728700 também apresentaram associação com a doença, com a variável CDR), em conjunto com o rs1055847 possam estar contribuindo para que esta variante esteja atuando de alguma forma no desenvolvimento da doença.

O gene *ABCD1* transporta ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA – *very-long-chain-fatty-acids*) no cérebro, para degradação nos peroxissomos, principal organela responsável pela desintoxicação celular. Os peroxissomos estão presentes principalmente no fígado, em hepatócitos e a expressão de suas proteínas também são detectadas em regiões do o cérebro, como o hipocampo e em células neuronais como oligodendrócitos e astrócitos, mantendo o equilíbrio de VLCFA e seus componentes oxidados, na manutenção da mielina (ISLINGER et al., 2012; TROMPIER et al., 2014). Possuem importante papel no metabolismo lipídico e no controle da homeostase do estresse oxidativo, por ser uma organela responsável pela oxidação de inúmeras substâncias, uma delas é o ácido graxo, para a síntese de colesterol. *ABCD1* também atua como sinalizador do processo fisiológico e patológico da via inflamatória e sistema imune inato (ANTONENKOV et al., 2010; WANDERS; WATERHAM, 2006).

Alterações nas funções peroxissomais contribuem para o desequilíbrio na homeostase de espécies reativas de oxigênio, causando um estresse oxidativo, que pode

desencadear um processo de neuroinflamação, além de causar um acúmulo de VLCFA, contribuindo para iniciar ou ampliar a progressão de doenças neurodegenerativas, por causar um processo de morte celular e desmielinização. Uma vez que o produto do gene *ABCD1* atua como transportador direto nos peroxissomos, foi observado que a ausência de proteínas *Abcd1* induzem uma superprodução de espécies reativas de oxigênio, induzidas pelo aumento das concentrações de VLCFA (BAARINE et al., 2012).

Alguns estudos mostram a relação que os peroxissomos têm com peptídeos  $\beta$ A, como no estudo de SANTOS et al., 2005, que observou em culturas de neurônios hipocámpais de ratos, que a alta quantidade de peroxissomos induzida, apresentava proteção à morte celular induzida por peptídeos  $\beta$ A. Outro estudo, também em ratos, mostrou que a inibição de algumas atividades peroxissomais, favorece o aumento da expressão da *APP* e da  $\beta$ -secretase (*BACE1*), aumentando a formação de peptídeos  $\beta$ A-42, causado parcialmente pelo aumento da concentração de VLCFA livres e não processados, pois sua importação é comprometida (SHI et al., 2012).

Uma vez que pacientes com DA apresentam níveis mais elevados de VLCFA, havendo contribuição peroxissômica para a patologia, o gene *ABCD1* quando expresso em baixa quantidade, pode estar atuando como contribuinte para o acúmulo destes ácidos graxos, levando à cascata de eventos de estresse oxidativo. Esta, leva ao acúmulo de  $\beta$ A e, conseqüentemente, danos cerebrais que aumentem a gravidade da doença em uma velocidade maior do que pacientes que possuam níveis de expressão normais de *ABCD1*.

Este é o primeiro estudo a relacionar o gene *ABCD1* com a DA em humanos, pois quase todos os estudos anteriores foram realizados com ratos ou culturas celulares de ratos machos. Portanto, não há uma comparação destes resultados com fêmeas. O único estudo encontrado envolvendo peroxissomos e DA em fêmeas, encontraram níveis elevados de *Abcd3*, outra proteína similar que atua como dímero com *Abcd1*. Esta, também atua na importação de VLCFA em ratos no estágio inicial de DA, hipotetizando que esse aumento poderia representar uma resposta de compensação para uma melhor eficiência de  $\beta$ -oxidação, devido ao aumento de VLCFA e proteínas  $\beta$ A no organismo (FANELLI et al., 2013). Ou seja, essa proteína pode estar atuando de forma protetiva em fêmeas, evitando que a doença progrida rapidamente e conseqüentemente apresente maior gravidade. Como nosso estudo apresentou associação apenas com homens, consideramos que esse mesmo efeito de compensação possa estar acontecendo com mulheres, porém não em homens, os tornando mais suscetíveis a baixa regulação de

Abcd1. Porém estudos futuros com relação à expressão do gene e sua atuação devem ser realizados para elucidar estas questões.

Não encontramos associação com nenhum SNP do gene *ABCG4*, porém em estudos recentes, há evidências da forte relação de *Abcg4* com o depósito de proteína  $\beta$ A, tanto por atuar na BBB quanto por suprimir a produção de  $\beta$ A por mudanças no processamento da APP (DODACKI et al., 2017; SANO et al., 2016). Então apesar dos nossos resultados não terem sido positivos, não se exclui a participação do gene no desenvolvimento da DA.

Mesmo que em estudo anterior do nosso grupo com genes da família ABC encontrou-se associações com idade de início da doença e com indivíduos que fazem ou não tratamento para reduzir os níveis de colesterol (SULZBACH, 2016), em nossas análises, nenhum dos SNPs analisados apresentaram associação com estas variáveis. Melhores informações, como os níveis exatos de colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos são necessárias para melhor avaliação desta relação.

Apesar disso, ainda não se exclui o envolvimento dos níveis de colesterol com a DA. Estudo recente, mostra que o comprometimento do transporte e eliminação do colesterol podem afetar a progressão da doença (PICARD et al., 2018), mas acrescenta-se que mais lipídios possam estar envolvidos no desenvolvimento e progressão da doença, indicando que mais estudos devem ser realizados, avaliando a relação do metabolismo e transporte lipídico e a DA.



## 8. CONCLUSÕES

- O rs10870162 do gene *ABCA2* apresenta associação com relação à suscetibilidade à DA, com o genótipo *G/G* atuando como fator protetivo à doença.
- O rs150929 do gene *ABCA3* apresentou associação com as variáveis MEEM e CDR, com o genótipo *G/G* atuando como fator de risco, contribuindo para um maior declínio cognitivo e maior gravidade da doença.
- O gene *ABCB1* apresentou associação com a variável CDR, com o genótipo *C/C* do rs4728700 atuando como fator de risco e contribuindo para maior gravidade da doença e o genótipo *G/G* do rs2235035 atuando como fator protetivo, contribuindo para um menor aumento da gravidade da DA.
- O gene *ABCD1* apresentou associação com a variável CDR, apenas nos pacientes homens, com o alelo *G* contribuindo para uma maior gravidade da doença.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABUZNAIT, A. H.; KADDOUMI, A. Role of ABC Transporters in the Pathogenesis of Alzheimer ' s Disease Department of Basic Pharmaceutical Sciences , College of Pharmacy , University of Louisiana at. 2012.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2013 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's and Dementia**, v. 9, n. 2, p. 208–245, 2013.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2017 Alzheimer's Disease Facts and Figures. **Alzheimers Dement** , v. 13, p. 325–373, 2017a.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. FDA-approved treatments for Alzheimer's. 2017b.
- ANDERSEN, O. M.; WILLNOW, T. E. Lipoprotein receptors in Alzheimer's disease. **Trends in Neurosciences**, v. 29, n. 12, p. 687–694, 2006.
- ANTONENKOV, V. D. et al. Peroxisomes Are Oxidative Organelles. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, n. 4, p. 525–537, 2010.
- BAARINE, M. et al. Evidence of oxidative stress in very long chain fatty acid - Treated oligodendrocytes and potentialization of ROS production using RNA interference-directed knockdown of ABCD1 and ACOX1 peroxisomal proteins. **Neuroscience**, v. 213, p. 1–18, 2012.
- BARRETT, J. C. et al. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263–265, 2005.
- BARTELS, A. L. et al. Blood-brain barrier P-glycoprotein function decreases in specific brain regions with aging: A possible role in progressive neurodegeneration. **Neurobiology of Aging**, v. 30, n. 11, p. 1818–1824, 2009.
- BENARROCH, E. E. Brain cholesterol metabolism and neurologic disease. **Neurology**, v. 71, p. 1368–1373, 2008.
- BETTENS, K.; SLEEGERS, K.; VAN BROECKHOVEN, C. Genetic insights in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 1, p. 92–104, 2013.
- BLENNOW, K. et al. Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease. **Trends in pharmacological sciences**, v. 36, p. 297–309, 2015.
- BOCHE, D.; NICOLL, J. A. R. Are we getting to grips with Alzheimer ' s disease at last ? **Scientific Commentaries**, n. page 1312, p. 1297–1299, 2010.
- BRAAK, H.; BRAAK, E. Staging of Alzheimer-related cortical destruction. **International psychogeriatrics / IPA**, v. 9 Suppl 1, p. 257-61-72, jan. 1997.
- BROCCARDO, C. et al. ABCA2 is a marker of neural progenitors and neuronal subsets in the adult rodent brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 97, p. 345–355, 2006.
- BROCCARDO, C.; LUCIANI, M. F.; CHIMINI, G. The ABCA subclass of mammalian transporters. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1461, p. 395–404, 1999.

CAI, H. et al. Metabolic dysfunction in Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders. **Current Alzheimer research**, v. 9, n. 1, p. 5–17, 2012.

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

CARTER, C. J. Convergence of genes implicated in Alzheimer's disease on the cerebral cholesterol shuttle: APP, cholesterol, lipoproteins, and atherosclerosis. **Neurochemistry International**, v. 50, p. 12–38, 2007.

CASEY, D. A; ANTIMISIARIS, D.; O'BRIEN, J. Drugs for Alzheimer's disease: are they effective? **P & T: a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 35, n. 4, p. 208–211, 2010.

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

CHEN, Z. J. et al. Association of ABCA2 expression with determinants of Alzheimer's disease. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 3, p. 1129–31, 2004.

CHEN, K. DEN et al. Gene expression profiling of peripheral blood leukocytes identifies and validates ABCB1 as a novel biomarker for Alzheimer's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 43, n. 3, p. 698–705, 2011.

CORDER, E. et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. **Science**, v. 261, n. 5123, p. 921–923, 1993.

DAVIS, W. The ATP-binding cassette transporter-2 (ABCA2) regulates cholesterol homeostasis and low-density lipoprotein receptor metabolism in N2a neuroblastoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1811, n. 12, p. 1152–1164, 2011.

DAVIS JR, W. The ATP-binding Cassette Transporter-2 (ABCA2) Promotes Amyloidogenic Processing of Amyloid Precursor Protein by Glu11 Site Cleavage. **Curr Alzheimer Res.**, v. 7, n. 7, p. 566–577, 2010.

DEAN, M.; HAMON, Y.; CHIMINI, G. The Human ATP-Binding Cassette ( ABC ) Transporter Superfamily. v. 42, p. 1–50, 2002.

DEAN, M.; RZHETCKY, A.; ALLIKMENTS, R. The Human ATP-Binding Cassette transporter superfamily. **Genome Research**, v. 11, p. 1156–1166, 2001.

DIETSCHY, J. M.; TURLEY, S. D. Cholesterol metabolism in the brain. **Current opinion in lipidology**, v. 12, p. 105–112, 2001.

DODACKI, A. et al. Expression and function of Abcg4 in the mouse blood-brain barrier: Role in restricting the brain entry of amyloid- $\beta$  peptide. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.

DONMEZ, G. et al. SIRT1 Suppresses  $\beta$ -Amyloid Production by Activating the  $\alpha$ -Secretase Gene ADAM10. **Cell**, v. 142, n. 2, p. 320–332, 2010.



ELALI, A.; RIVEST, S. The role of ABCB1 and ABCA1 in beta-amyloid clearance at the neurovascular unit in Alzheimer's disease. **Frontiers in Physiology**, v. 4 MAR, n. March, p. 1–6, 2013.

FANELLI, F. et al. Age-dependent roles of peroxisomes in the hippocampus of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 8, n. 1, p. 1, 2013.

FEHÉR, Á. et al. ABCB1 C3435T Polymorphism Influences the Risk for Alzheimer's Disease. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 54, n. October, p. 826–829, 2014.

FINSTERER, J.; LÄSSER, S.; STÖPHASIUS, E. Dementia from the ABCD1 mutation c.1415-1416delAG in a female carrier. **Gene**, v. 530, n. 1, p. 155–157, 2013.

FITZGERALD, M. L. et al. ABCA3 inactivation in mice causes respiratory failure, loss of pulmonary surfactant, and depletion of lung phosphatidylglycerol. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 3, p. 621–632, 2007.

FRANKFORT, S. V et al. ABCB1 genotypes and haplotypes in patients with dementia and age-matched non-demented control patients. **Molecular neurodegeneration**, v. 1, p. 13, 2006.

FROMM, M. F. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 8, p. 423–429, 2004.

FROTA, N. A. F. et al. Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer. **Dement Neuropsychol**, v. 5, n. Suppl 1, p. 5–10, 2011.

GABRIEL, S.; ZIAUGRA, L.; TABBAA, D. SNP genotyping using the sequenom massARRAY iPLEX Platform. **Current Protocols in Human Genetics**, n. January, p. 1–18, 2009.

GÄRTNER, J. et al. Functional Characterization of the Adrenoleukodystrophy Protein (Aldp) and Disease Pathogenesis. **Endocrine Research**, v. 28, n. April, p. 741–748, 2002.

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

GENETICS: Gregory Warnes, with contributions from Gregor Gorjanc, Friedrich Leish and Michael Man. Genetics: Population Genetics, **R Package version 1.2.8.1**, 2013. <https://CRAN.R-project.org/package=genetics>.

GOSSELET, F.; SAINT-POL, J.; FENART, L. Effects of oxysterols on the blood-brain barrier: Implications for Alzheimer's disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 446, n. 3, p. 687–691, 2014.

HARDY, J.; SELKOE, D. J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. v. 297, n. July, p. 353–357, 2002.

HIGGINS, C. F. ABC Transporters: From Microorganisms to Man. [Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Cb.08.110192.000435](http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Cb.08.110192.000435), p. 67–113, 1992.

HIRSCH-REINSHAGEN, V.; BURGESS, B. L.; WELLINGTON, C. L. Why lipids are important for Alzheimer disease? **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 326, p. 121–

129, 2009.

HIRSCH-REINSHAGEN, V.; WELLINGTON, C. L. Cholesterol metabolism, apolipoprotein E, adenosine triphosphate-binding cassette transporters, and Alzheimer's disease. **Current opinion in lipidology**, v. 18, p. 325–32, 2007.

HOHMAN, T. J. et al. Discovery of gene-gene interactions across multiple independent datasets of Late Onset Alzheimer Disease from the Alzheimer Disease Genetics Consortium. v. 77, n. 7, p. 616–623, 2016.

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

HU, W. et al. ATP Binding Cassette Subfamily A Member 2 (ABCA2) Expression and Methylation are Associated with Alzheimer's Disease. **Medical Science Monitor**, v. 23, p. 5851–5861, 2017.

HUYNH, T.-P. V. et al. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: the influence of apolipoprotein E on amyloid- $\beta$  and other amyloidogenic proteins. **Journal of Lipid Research**, v. 58, n. 5, p. 824–836, 2017.

ISLINGER, M. et al. The peroxisome: An update on mysteries. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 137, n. 5, p. 547–574, 2012.

KIM, W. S. et al. Quantitation of ATP-binding cassette subfamily-A transported gene expression in primary brain cells. **Molecular Neuroscience**, v. 17, n. 9, p. 891–896, 2006.

KIM, W. S.; WEICKERT, C. S.; GARNER, B. Role of ATP-binding cassette transporters in brain lipid transport and neurological disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 104, p. 1145–1166, 2008.

KOHEN, R. et al. ABCB1 genotype and CSF beta-amyloid in Alzheimer disease. **Journal of geriatric psychiatry and neurology**, v. 24, n. 2, p. 63–6, 2011a.

KOHEN, R. et al. ABCB1 genotype and CSF  $\beta$ -amyloid in Alzheimer disease. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, v. 24, n. 2, p. 63–66, 2011b.

KUHNKE, D. et al. MDR1-P-glycoprotein (ABCB1) mediates transport of Alzheimer's amyloid- $\beta$  peptides - Implications for the mechanisms of A $\beta$  clearance at the blood-brain barrier. **Brain Pathology**, v. 17, n. 4, p. 347–353, 2007.

KUNTZ, M. et al. Bexarotene Promotes Cholesterol Efflux and Restricts Apical-to-Basolateral Transport of Amyloid- $\beta$  Peptides in an in Vitro Model of the Human Blood-Brain Barrier. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 48, n. 3, p. 849–862, 2015.

KUUSISTO, J. et al. Association of apolipoprotein E phenotypes with late onset Alzheimer's disease: population based study. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 309, p. 636–638, 1994.

LAMBERT, J. C. et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. **Nature genetics**, v. 45, p. 1452–8, 2013.

LEONARD, G. D. The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. **The Oncologist**, v. 8, p. 411–424, 2003.

LESCHZINER, G. D. et al. ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. **Pharmacogenomics**, v. 7, n. September 2006, p. 154–179, 2006.

LI, G.; GU, H.-M.; ZHANG, D.-W. ATP-binding cassette transporters and cholesterol translocation. **IUBMB life**, v. 65, p. 505–12, 2013.

LINTON, K. J.; ZOLNERCIKS, SCHMITT, L. General Introduction , Structure and Likely Mechanism of Action of ABC Transport Proteins. n. Table 1, p. 1–27, 2011.

MACÉ, S. et al. ABCA2 is a strong genetic risk factor for early-onset Alzheimer's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 18, p. 119–125, 2005.

MACK, J. T. et al. The ATP-binding cassette transporter ABCA2 as a mediator of intracellular trafficking. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 60, p. 587–592, 2006.

MACK, J. T. et al. The ABCA2 transporter: intracellular roles in trafficking and metabolism of LDL-derived cholesterol and sterol-related compounds. **Current drug metabolism**, v. 8, n. 1, p. 47–57, 2007.

MAGLIULO, L. et al. Do CYP3A and ABCB1 genotypes influence the plasma concentration and clinical outcome of donepezil treatment? **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 67, n. 1, p. 47–54, 2011.

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

MCGUINNESS, M. C. et al. Role of ALDP (ABCD1) and Mitochondria in X-Linked Adrenoleukodystrophy. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 2, p. 744–753, 2003.

MCKHANN, G. et al. 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. 939–939, 1984.

MICHAELSON, D. M. APOE  $\epsilon\epsilon$ : The most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease. **Alzheimer's and Dementia**, v. 10, n. 6, p. 861–868, 2014.

MICHAKI, V. et al. Down-regulation of the ATP-binding cassette transporter 2 (Abca2) reduces amyloid- $\beta$  production by altering nicastrin maturation and intracellular localization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 2, p. 1100–1111, 2012.

MILLER, D. S.; BAUER, B.; HART, A. M. S. Modulation of P-glycoprotein at the Blood-Brain Barrier: Opportunities to Improve CNS Pharmacotherapy. **Pharmacol Rev.**, v. 60, n. 2, p. 196–209, 2008.

NAGATA, K. et al. Human ABCA3, a product of a responsible gene for abca3 for fatal surfactant deficiency in newborns, exhibits unique ATP hydrolysis activity and generates intracellular multilamellar vesicles. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 324, n. 1, p. 262–268, 2004.

NAKAMURA, A. E. et al. Dementia underdiagnosis in Brazil. **The Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 418–419, 2015.

NASSIF, M. C.; HOPPE, J.; SALBEGO, C. G. Colesterol, APOE4 e estatinas: implicações na doença de Alzheimer. **Infarma**, v. 17, p. 46–49, 2005.

**NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI)**. Disponível em: [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov) .

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. [s.l: s.n.].

PAOLINI, A. et al. Structural features of the ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCA3. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 19631–19644, 2015.

PICARD, C. et al. Alterations in cholesterol metabolism-related genes in sporadic Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, 2018.

PRINCE, M. et al. World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. **Alzheimer's Disease International**, p. 84, 2015.

PRINCE, M. et al. World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia. Coverage, Quality and costs now and in the future. **Alzheimer's Disease International (ADI)**, p. 1–140, 2016.

PROTEIN ATLAS. Disponível em <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000167972-ABCA3/tissue>. Acesso em fevereiro de 2018.

QIN, W. et al. Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 31, p. 21745–21754, 2006.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R Foundation for Statistical Computing** Vienna, Austria, 2008. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>

REFOLO, L. M. et al. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. **Neurobiology of Disease**, v. 7, n. 4, p. 321–331, 2000.

REITZ, C. Dyslipidemia and the risk of Alzheimer's Disease. **Curr Atheroscler Rep**, v. 15, n. 3, p. 1–14, 2013.

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

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

SADIGH-ETEGHAD, S.; TALEBI, M.; FARHOUDI, M. sporadic late onset Alzheimer ' s disease. v. 17, n. 914, p. 321–326, 2012.

SAINT-POL, J. et al. Oxysterols decrease apical-to-basolateral transport of A $\beta$  peptides via an ABCB1-mediated process in an in vitro Blood-brain barrier model constituted of bovine brain capillary endothelial cells. **Brain Research**, v. 1517, p. 1–15, 2013.

SAITO, T. et al. Expression of ABCA2 protein in both non-myelin-forming and myelin-forming Schwann cells in the rodent peripheral nerve. **Neuroscience Letters**, v. 414, n. 1, p. 35–40, 2007.

- SANO, O. et al. ABCG1 and ABCG4 suppress  $\gamma$ -secretase activity and amyloid  $\beta$  production. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–19, 2016.
- SANTOS, M. J. et al. Peroxisomal Proliferation Protects from  $\alpha$ -Amyloid. v. 280, n. 49, p. 41057–41068, 2005.
- SAUNDERS, A. M. et al. Association of apolipoprotein E allele  $\epsilon$  4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 43, n. 8, p. 1467–1472, 1993.
- SCHMITZ, G.; KAMINSKI, W. E. ABCA2: A candidate regulator of neural transmembrane lipid transport. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 1285–1295, 2002.
- SELKOE, D. J. Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. v. 81, n. 2, p. 741–766, 2001.
- SHI, R. et al. Inhibition of peroxisomal  $\beta$ -oxidation by thioridazine increases the amount of VLCFAs and A $\beta$  generation in the rat brain. **Neuroscience Letters**, v. 528, n. 1, p. 6–10, 2012.
- STAHLMAN, M. T. et al. Expression of ABCA3 in developing lung and other tissues. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 55, n. 1, p. 71–83, 2007.
- ŠTEFKOVÁ, J.; POLEDNE, R.; HUBÁČEK, J. A. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. **Physiological Research**, v. 53, p. 235–243, 2004.
- STRITTMATTER, W. J. et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 5, p. 1977–1981, 1993.
- SULZBACH, C. D. **Envolvimento de polimorfismos dos genes ABCA1, ABCA7 e ABCG1 na Doença de Alzheimer**, 2016.
- SWERDLOW, R. H.; BURNS, J. M.; KHAN, S. M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: Progress and perspectives. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, p. 1219–1231, 2014.
- TARLING, E. J.; DE AGUIAR VALLIM, T. Q.; EDWARDS, P. A. Role of ABC transporters in lipid transport and human disease. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 24, n. 7, p. 342–50, 2013.
- TROMPIER, D. et al. Biochimie Brain peroxisomes. **Biochimie**, v. 98, p. 102–110, 2014.
- UEHARA, Y. et al. ATP-binding cassette transporter G4 is highly expressed in microglia in Alzheimer's brain. **Brain Research**, v. 1217, p. 239–246, 2008.
- VASILIOU, V.; VASILIOU, K.; NEBERT, D. W. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. **Human genomics**, v. 3, n. 3, p. 281–90, 2009.
- VULEVIC, B. et al. Cloning and Characterization of Human Adenosine 5'-triphosphate-binding. **Cancer Research**, v. 2, n. 8, p. 3339–3347, 2001.
- WANDERS, R. J. A.; WATERHAM, H. R. Biochemistry of Mammalian Peroxisomes Revisited. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 295–332, 2006.



- WANG, W.; BODLES-BRAKHOP, A. M.; BARGER, S. W. A Role for P-Glycoprotein in Clearance of Alzheimer Amyloid  $\beta$  -Peptide from the Brain. **Current Alzheimer research**, v. 13, n. 6, p. 615–20, 2016.
- WILKENS, S. Structure and mechanism of ABC transporters. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 14, n. February, p. 426–431, 2015.
- WILTFANG, J. et al. Elevation of  $\beta$ -Amyloid Peptide 2-42 in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease and Its Generation in PS1 Knockout Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 46, p. 42645–42657, 2001.
- WOOD, W. G. et al. Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: A debatable hypothesis. **Journal of Neurochemistry**, v. 129, p. 559–572, 2014.
- WORLD HEALTH ORGANISATION. World Health Statistics 2016: monitoring health for the SDGs. p. 1–79, 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dementia: a public health priority. **Dementia**, p. 112, 2012.
- XIONG, H. et al. Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase activities and A $\beta$  production. v. 29, n. 3, p. 422–437, 2008.
- XU, X. et al. Meta-Analyses of 8 Polymorphisms Associated with the Risk of the Alzheimer's Disease. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.
- YAMANO, G. et al. ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. **FEBS letters**, v. 508, p. 221–225, 2001.
- ZAMROZIEWICZ, M. K.; ZWILLING, C. E.; BARBEY, A. K. Inferior prefrontal cortex mediates the relationship between phosphatidylcholine and executive functions in healthy, older adults. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 8, n. SEP, p. 1–8, 2016.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. International statistical classification of diseases and related health problems. Ed. 10, Geneva, 1992. [online] Disponível em: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en#/F00-F09>.
- Consortium TG. The genotype-tissue expression (GTEx) project. *Nat Genet* (2013) 45(6):580–5. doi:10.1038/ng.2653

## APÊNDICE

Gráfico 1. Boxplot de distribuição de genótipos do rs150929 do gene *ABCA3* de acordo com o tempo de doença de pacientes com DA.

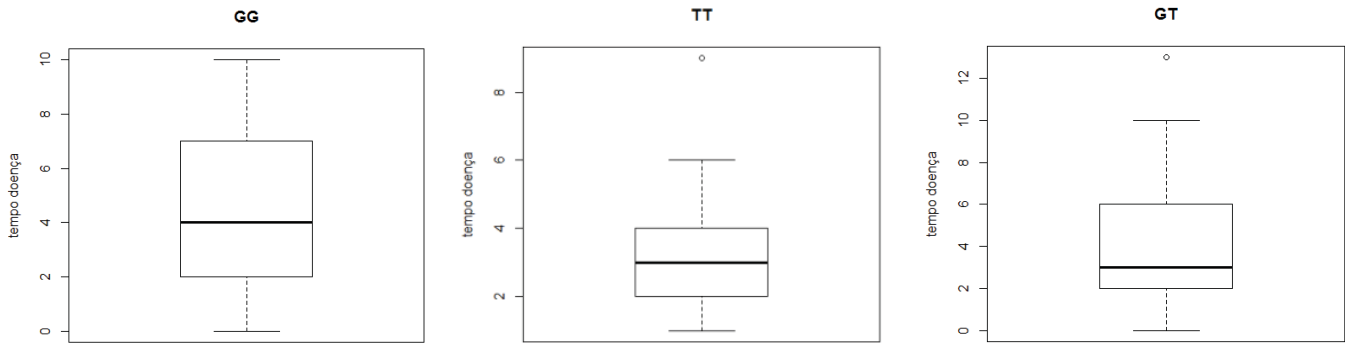


Gráfico 2. Boxplot de distribuição de genótipos do rs4728700 do gene *ABCB1* de acordo com o tempo de doença de pacientes com DA.

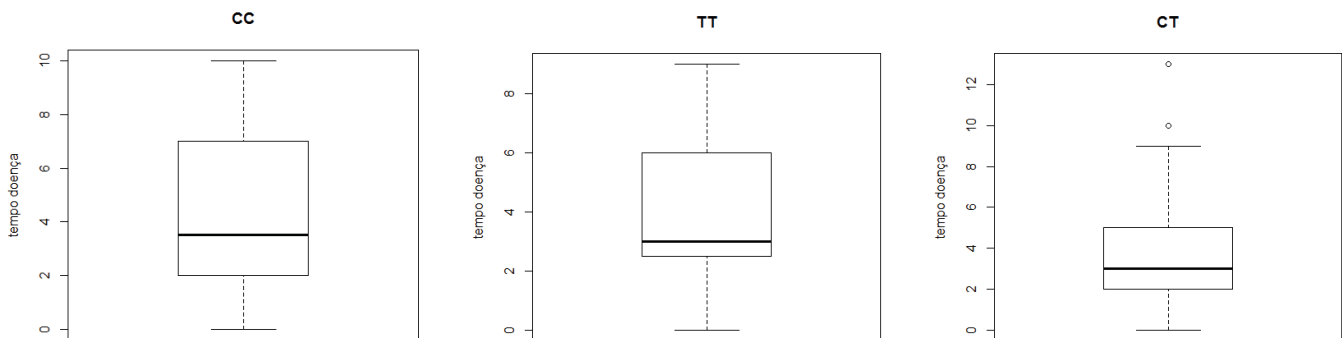


Gráfico 3. Boxplot de distribuição de genótipos do rs2235035 do gene *ABCB1* de acordo com o tempo de doença de pacientes com DA.

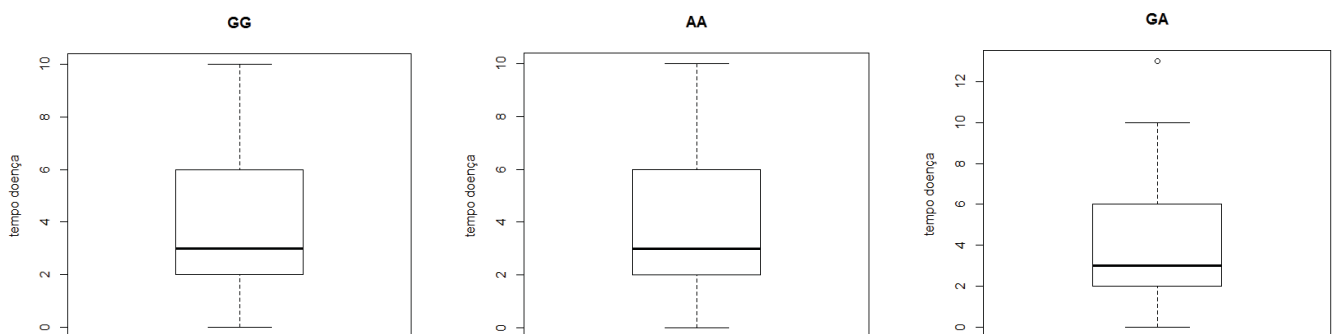
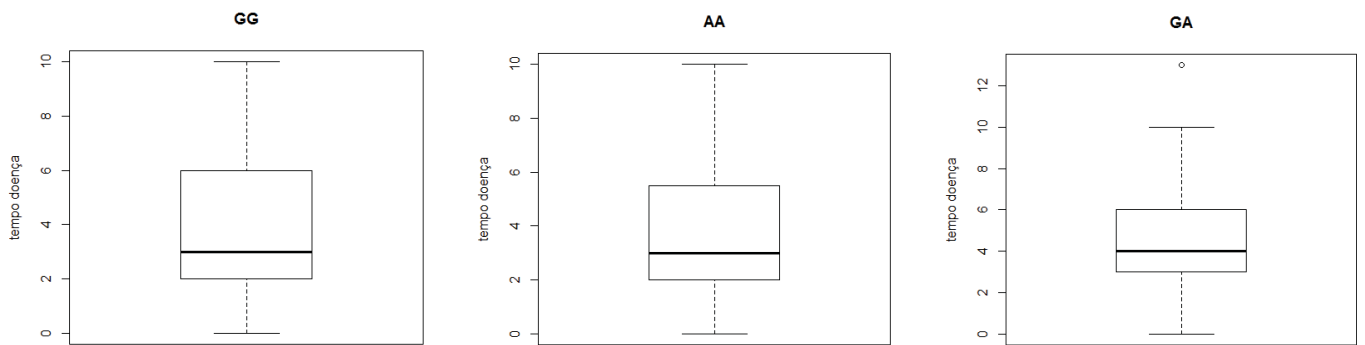


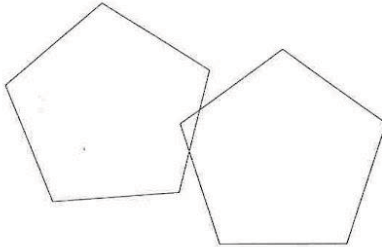
Gráfico 4. Boxplot de distribuição de genótipos do rs1055847 do gene *ABCD1* de acordo com o tempo de doença de pacientes com DA.





## ANEXOS

## Anexo 1- Mini-Exame do Estado Mental (MEEM)

<b>MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL</b>	
(Folstein, Folstein & McHugh, 1.975)	
Paciente:	_____
Data da Avaliação:	___/___/___ Avaliador: _____
<b>ORIENTAÇÃO</b>	
• 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) .....	( )
<b>MEMÓRIA IMEDIATA</b>	
• 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.	
<b>ATENÇÃO E CÁLCULO</b>	
• (100 - 7) sucessivos, 5 vezes sucessivamente (1 ponto para cada cálculo correto) .....	( )
(alternativamente, soletrar MUNDO de trás para frente)	
<b>EVOCAÇÃO</b>	
• Pergunte pelas 3 palavras ditas anteriormente (1 ponto por palavra) .....	( )
<b>LINGUAGEM</b>	
• 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) .....	( )
<b>ESCORE: ( ___/30)</b>	
	

## Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



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:

Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza

Msc. Daiane Priscila Simão-Silva

Dr. Mauro Piovezan

Prontuário N. \_\_\_\_\_

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



## 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 sadios. 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](mailto: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](mailto:ppg-gen@ufpr.br)