

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

LEILA DIAS DE ALMEIDA

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS  
GENES *APOC1*, *BAT1* e *ABCG2*  
NA DOENÇA DE ALZHEIMER

VITÓRIA  
2014

LEILA DIAS DE ALMEIDA

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS  
GENES *APOC1*, *BAT1* e *ABCG2*  
NA DOENÇA DE ALZHEIMER

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

Orientadora: Profa. Dra. Flavia de Paula

VITÓRIA  
2014

LEILA DIAS DE ALMEIDA

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS  
GENES *APOC1*, *BAT1* e *ABCG2*  
NA DOENÇA DE ALZHEIMER

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

Avaliada em 12 de dezembro de 2014.

---

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

---

**Profa. Dra. Flávia Imbroisi Valle Errera**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Membro Interno**

---

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

VITÓRIA  
2014

## **AGRADECIMENTOS**

O primeiro e maior agradecimento é, e sempre será, Àquele que me proporcionou tudo isso. Obrigada, meu Deus, por me abençoar e guiar rumo a mais essa conquista.

À minha família, que sempre me deu apoio incondicional e investiu em mim. Hoje todos nós colhemos os frutos do amor e dedicação de vocês por mim. Obrigada por tudo. Amo infinitamente!

À amiga Dani, por todos os anos de valiosa amizade e por passar junto comigo por todas as etapas até aqui. Sua amizade não tem preço!

Aos colegas de laboratório, em especial à amiga Clara, por tornarem a jornada mais leve e oferecerem o auxílio necessário quando foi preciso. A vivência com vocês me ensinou muito! Também aos colegas de graduação que continuam acompanhando minhas vitórias e torcendo por mim. Vocês são especiais. Obrigada pela amizade!

Aos professores do programa de pós-graduação em Biotecnologia pelos ensinamentos compartilhados, em especial à minha orientadora, professora Flavia de Paula, pela orientação e atenção desde a graduação.

Ao meu noivo, por todo carinho, cuidado e compreensão. Você é peça fundamental na minha vida. Amo você!

Ao Dr. Renato Morelato, pela parceria e apoio dados a essa pesquisa e aos colegas Bruno, Luciano e Daniela pela colaboração.

Às agências FAPES/CNPQ/M.S.Decit/SESA; MCTI/CNPQ/MEC/CAPES e FACITEC pelo financiamento do projeto e pela bolsa concedida.

À todos que de alguma forma contribuíram com a execução e conclusão dessa pesquisa, muito obrigada!

## RESUMO

A doença de Alzheimer (DA), uma doença neurodegenerativa e progressiva, é considerada a forma mais comum de demência. Esta doença pode acontecer de forma esporádica ou ter recorrência familiar. Mais de 90% dos pacientes com DA desenvolvem a doença de forma esporádica e com início tardio. Nesses casos, a doença possui etiologia multifatorial, visto que está relacionada com o envelhecimento, fatores genéticos, atividades comportamentais e fatores ambientais aos quais o paciente está exposto. Vários polimorfismos genéticos têm sido estudados em todo o mundo a fim de verificar suas associações com a DA. Estudos como esse devem ser feitos em diferentes comunidades, a fim de criar um perfil de risco genético para populações específicas. Foram analisados os polimorfismos *APOC1 H2*, *BAT1-22* e *ABCG2 C421A*, por meio da técnica de PCR-RFLP e estudo de associação caso: controle, com o objetivo de avaliar o potencial de risco dessas variações genéticas para a DA na população de Vitória-ES. O genótipo H1/H1 do gene *APOC1* apresentou valores estatisticamente significativos (OR= 0.186, 95%IC= 0.044 - 0.777; P= 0.021), se comportando como fator de proteção contra a doença na população em questão. Os demais polimorfismos não apresentaram associação com a DA. Os polimorfismos *APOC1 H2*, *BAT1-22* e *ABCG2 C421A* foram também investigados em outras populações, onde apresentaram resultados diferentes dos dessa pesquisa. Sugere-se que tais divergências podem ser explicadas pelas diferenças étnicas existente entre as populações.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer. *APOC1*. Fator de proteção.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD), a progressive neurodegenerative disorder, is considered the most common form of dementia. This disease can occur sporadically or have familial recurrence. More than 90% of AD patients develop the disease sporadically and with late onset. In such cases, the disease has a multifactorial etiology, since it is related to aging, genetic factors, environmental factors and behavioral activities to which the patient is exposed. Several genetic polymorphisms have been studied worldwide in order to verify their association with AD. Studies such as this should be done in different communities in order to create a genetic risk profile for specific populations. The polymorphisms *APOC1 H2*, *BAT1-22* and *ABCG2 C421A* were analyzed using the PCR-RFLP technique and case: control study, in order to evaluate the risk potential of these genetic variations for AD in Vitória-ES population. The H1 / H1 *APOC1* genotype showed statistically significant values (OR = 0.186, 95% CI = 0044-0777; P = 0.021), behaving as a protective factor against the disease in the population concerned. The other polymorphisms didn't show any association with AD. Polymorphisms *APOC1 H2*, *BAT1-22* and *ABCG2 C421A* were also investigated in other populations, where they showed different results from the ones in this research. It is suggested that such differences could be explained by existing ethnic differences among populations.

Keywords: Alzheimer's disease. *APOC1*. Protective fator.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alterações histopatológicas encontradas em cérebros de pessoas com doença de Alzheimer.....	13
Figura 2: Posição cromossômica dos principais genes envolvidos na doença de Alzheimer.....	13
Figura 3: Clivagem da <i>APP</i> pela $\beta$ -secretase e $\gamma$ -secretase e formação de oligômeros e placas amilóides.....	14
Figura 4: Padrão de bandas em gel de poliacrilamida de <i>APOC1</i> .....	24
Figura 5: Padrão de bandas em gel de poliacrilamida de <i>BAT1</i> .....	24
Figura 6: Padrão de bandas em gel de poliacrilamida para de <i>ABCG2</i> .....	24

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição da idade dos indivíduos.....	20
Tabela 2. Caracterização sociodemográfica da amostra.....	20
Tabela 3. Sequência e referência dos primers utilizados nas reações de PCR.....	22
Tabela 4: Condições das reações de PCR para cada gene.....	22
Tabela 5: Condições de digestão enzimática, eletroforese e análise das reações de FRLP.....	23
Tabela 6: Distribuição genotípica.....	25
Tabela 7: Análise de regressão logística.....	25

## LISTA DE SIGLAS

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABCG2	<i>ATP-binding cassette subfamily G member 2</i>
APOC 1	Apolipoproteína C1 (Apolipoprotein C1)
APOE	Apolipoproteína E (Apolipoprotein E)
APP	Proteína Precursora da Amiloide (Amyloid beta precursor protein)
BCRP	Proteína de resistência ao câncer de mama (Breast cancer resistance protein)
DA	Doença de Alzheimer
DAE	Doença de Alzheimer Esporádica
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)
RFLP	Polimorfismo de Tamanhos de Fragmentos de Restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
2.1 HISTÓRICO.....	12
2.2 DOENÇA DE ALZHEIMER FAMILIAL.....	13
2.3 DOENÇA DE ALZHEIMER ESPORÁDICA.....	15
2.3.1 GENE <i>APOC1</i> .....	15
2.3.2 GENE <i>BAT1</i> .....	16
2.3.3 GENE <i>ABCG2</i> .....	16
2.4 ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS COM A DA ESPORÁDICA.....	17
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>19</b>
4.1 AMOSTRA.....	19
4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
4.3 MÉTODOS.....	21
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>29</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>34</b>
<b>ANEXO 2.....</b>	<b>35</b>
<b>ANEXO 3.....</b>	<b>38</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A demência, incluindo a doença de Alzheimer, é um dos maiores desafios de saúde pública global enfrentados por nossa geração. Em todo o mundo, 44 milhões de pessoas são acometidas por demência e estima-se que esse número quase dobre em 2030 e mais que triplique até 2050. Calcula-se que em 2010 os custos com a demência foram de 604 bilhões de dólares, e com o aumento do número de casos esse valor tende a aumentar de igual modo (WORLD ALZHEIMER REPORT, 2014).

A doença de Alzheimer (DA), considerada a forma mais comum de demência, é uma doença degenerativa e progressiva caracterizada por perda de memória, cognição e autonomia (LAMBERT et al., 2009). As principais alterações encontradas em cérebros de pacientes que sofrem de DA são as placas senis, que consistem em depósitos extracelular de proteína  $\beta$  amilóide, os emaranhados neurofibrilares, caracterizados pelo acúmulo intracelular de proteína tau hiperfosforilada, e uma extensa perda neuronal (FRIDMAN et al., 2004; AVRAMOPOULOS, 2009).

A DA pode ocorrer de forma esporádica ou ter recorrência familiar (BLENNOW et al., 2006). A doença de Alzheimer esporádica (DAE) é multifatorial, resultante da combinação de envelhecimento, predisposição genética, exposição a um ou mais agentes ambientais como traumatismo craniano, fatores sociodemográficos como nível de educação/estudo, estilo de vida, aspectos de nutrição, condicionamento aeróbico e exercício mental. Esses fatores juntos modificam a idade de início e o curso da doença. Desses fatores, influências genéticas parecem ter maior importância (PAPASSOTIROPOULOS et al., 2006; BIRD, 2008 e GATZ et al., 1997).

As formas rara e hereditária de início precoce da doença têm sido associadas às mutações em três genes: *APP*, que codifica a proteína precursora amilóide, no cromossomo 21, *PSEN1*, codificador da proteína presenilina 1, no cromossomo 14, e *PSEN2*, codificador da proteína presenilina 2, no cromossomo 1. Essas mutações, contudo, explicam menos de 10% dos casos de DA, enquanto que a grande maioria (especialmente para as formas de início tardio da doença) tem outros e mais complexos determinantes genéticos (CAMPION et al., 1999).

Tendo em vista a gravidade da doença e o quanto ela reduz a qualidade de vida dos afetados, torna-se necessária a realização de estudos que investiguem os fatores associados a DA. Novas estratégias para melhores tratamentos podem ser criadas com base no perfil genético de susceptibilidade para a doença, o que torna importante investigações feitas em diferentes populações com o fim de construir tais perfis.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 HISTÓRICO

Em 25 de novembro de 1901, Auguste D. deu entrada no hospital de Frankfurt, onde foi examinada por Alois Alzheimer. Ela tinha um conjunto marcante de sintomas, que incluíam compreensão e memória reduzidas, assim como afasia, desorientação, comportamento imprevisível, paranóia, alucinações auditivas e comprometimento psicossocial (THOMAS e FENECH, 2007; MAURER et al., 1997).

Com o falecimento de Auguste D. em 1906, Alzheimer realizou uma necrópsia e apresentou os resultados encontrados na 37ª Conferência Anual de Psiquiatras, em Berlim. No exame, verificou-se placas, emaranhados neurofibrilares e alterações ateroscleróticas (Figura 1). No ano de 1910, a doença foi pela primeira vez denominada doença de Alzheimer por Emil Kraepelin. Alois Alzheimer publicou o caso de Auguste em 1907, de maneira relativamente resumida. No entanto, em 1911, outro trabalho foi por ele publicado, no qual discutiu o conceito da doença em detalhe. Esta publicação concentra-se no relatório de um segundo paciente acometido por doença de Alzheimer, o caso de Johann F (MÖLLER e GRAEBER, 1998; MAURER et al., 1997; GRAEBER et al., 1997).

Até por volta de 1968, a DA era clinicamente separada da demência senil (de início tardio), sendo considerada demência pré-senil (de início precoce). Somente após a publicação do trabalho de Blessed, Tomlinson e Roth (1968), percebeu-se que a demência senil e a DA pré-senil eram caracterizadas pelo mesmo quadro clínico e apresentavam as mesmas características histopatológicas, e, portanto, tratava-se da mesma doença com idades de acometimento diferentes, a DA de início precoce e a DA de início tardio (CAIXETA, 2012).

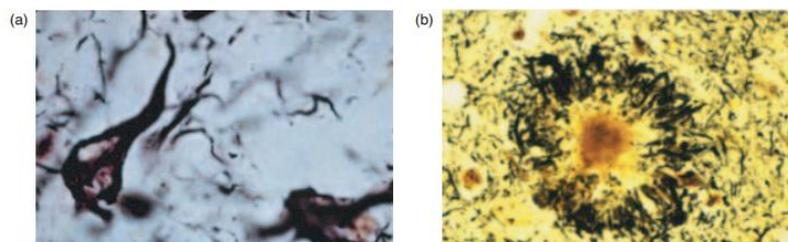


Figura 1: Alterações histopatológicas encontradas em cérebros de pessoas com Alzheimer. (a) Imagem microscópica de um típico emaranhado neurofibrilar. (b) Imagem microscópica de uma placa senil que mostra um núcleo central de  $\beta$  amilóide rodeado por filamentos de tau (Fonte: THOMAS e FENECH, 2007).

## 2.2 DOENÇA DE ALZHEIMER FAMILIAL

DA familiar pode ser tanto de início precoce quanto de início tardio. Os genes envolvidos na forma de início precoce da doença, que ocorre antes dos 65 anos de idade, são: Proteína Precursora da Amilóide (*APP*), localizado no cromossomo 21q21; Presenilina 1 (*PSEN1*), localizado no cromossomo 14q24.3 e Presenilina 2 (*PSEN2*), no cromossomo 1q31q42 (Figura 2) (SCHELLENBERG, 1995; HARDY et al., 2014).

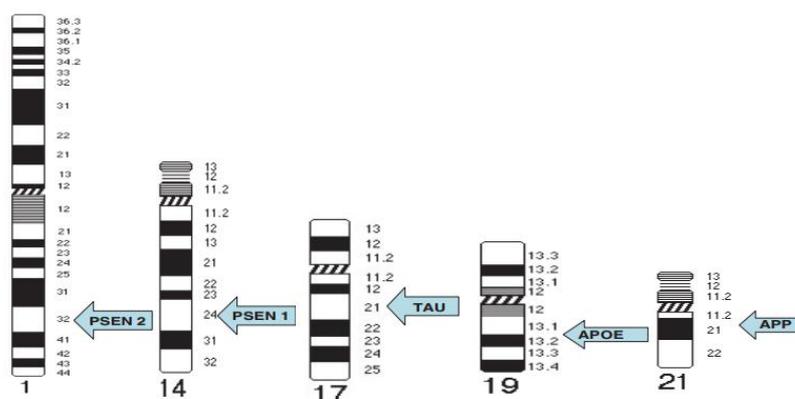


Figura 2: Posição cromossômica dos principais genes envolvidos na DA (Fonte: THOMAS e FENECH, 2007).

O papel das mutações nos genes *APP* e Presenilina na DA de início precoce já é bem conhecido. No entanto, a análise genética da DA de início tardio revelou que estas mutações também são fatores patogênicos, em alguns casos (CRUCHAGA et al., 2012).

A proteína precursora da amilóide (*APP*) é clivada sequencialmente por  $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase, liberando vários peptídeos de  $\beta$  amilóide. Na DA, aumento da produção e/ou diminuição da depuração dos peptídeos de  $\beta$  amilóide resulta na formação de oligômeros e placas amilóides (Figura 3) (ABUZNAIT & KADDOUMI, 2012).

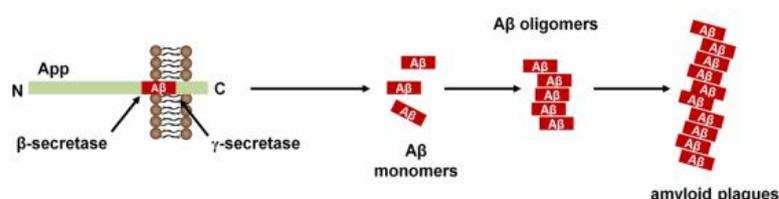


Figura 3: clivagem da *APP* pela  $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase e formação de oligômeros e placas amilóides (Fonte: ABUZNAIT & KADDOUMI, 2012).

A *APP* está presente em muitos tecidos, e no cérebro é uma proteína de membrana, onde há evidência de que está envolvida em interações célula-célula e interação célula-substrato (COULSON et al., 2000), regulação de genes (HEBERT et al., 2006), e ainda desempenha um papel no desenvolvimento do cérebro e sinaptogênese. Mutações causadoras de doenças no gene *APP* incluem aquelas perto do sítio de clivagem da  $\beta$ -secretase (aminoácidos 670-682), perto do sítio de clivagem da  $\gamma$ -secretase (aminoácidos 713-724), ou dentro da sequência da proteína  $\beta$  amilóide (aminoácidos 692-705). Existem diversas maneiras na qual alterações no gene *APP* podem causar DA, e essas alterações podem ter características clínicas e histológicas distintas (RINGMAN et al., 2014).

Mutações no gene *PSEN1* são as causas mais comuns de DA familiar e aquelas que ocorrem no gene *PSEN2* são as causas menos frequentes, com 185 e 13 mutações descritas, respectivamente. Alterações nos genes da presenilina podem resultar em modificações que afetam muitas vias funcionais essenciais. Além disso, essas mutações são responsáveis por uma gama muito heterogênea de disfunções clínicas, incluindo convulsões, afasia, agnosia, ataxia cerebelar e transtornos psiquiátricos e comportamentais (ROHER et al., 2013). Pessoas que sofrem mutações no gene *PSEN1* têm a idade mais precoce de desenvolvimento dos sintomas, e pessoas com mutações no gene *PSEN2* têm o desenvolvimento mais tardio dos sintomas (RYMAN et al., 2014).

## 2.3 DOENÇA DE ALZHEIMER ESPORÁDICA

A DA esporádica e de início tardio tem etiologia multifatorial, compreendendo interações genéticas e ambientais. O envelhecimento é o principal fator de risco associado a todas as doenças neurodegenerativas (AMADORUGE & BARNHAM, 2011). Além disso, o risco de doença de Alzheimer esporádica (DAE) pode ser aumentado por baixo nível de educação, traumatismo craniano grave, doença cerebrovascular, diabetes, obesidade (MUCKE, 2009) e hábito tabagista (OTTO et al., 1998). A prevalência da DAE parece variar amplamente em diferentes grupos étnicos. Alguns fatores de risco para a DAE, genéticos e ambientais, estão bem estabelecidos para a população em geral, mas há pouca informação sobre a relevância destes mesmos fatores em grupos étnicos específicos (HARWOOD et al., 1999), por isso, é importante que estudos sejam feitos em diversas populações a fim de elucidar a importância e papel desempenhados por esses fatores em etnias distintas.

Estudos genéticos mostraram que *APOE* é o único gene de susceptibilidade confirmado para DA. No entanto, mais de 550 outros genes têm sido propostos como candidatos para a susceptibilidade da doença de Alzheimer, demonstrando que esta condição é poligênica e com um complexo padrão de herança genética (HAROLD et al., 2009 e BERTRAM et al., 2007).

Polimorfismos nos genes *APOC1*, *BAT1* e *ABCG2* estão entre aqueles associados com a DA.

### 2.3.1 GENE *APOC1*

Os genes *APOE* e *APOC1* estão ligados e localizados no cromossomo 19. *APOC1* codifica a apolipoproteína C1 (apoC1), uma proteína protoplasmática composta de 57 aminoácidos. Esta proteína está associada à quilomícrons bem como às lipoproteínas LDL e VLDL na circulação (PODUSLO et al., 1998, JONG et al., 1999). A presença de apoC1 na partícula de lipoproteína pode prolongar o seu tempo de residência na circulação e subsequentemente facilitar a sua conversão para a LDL

Estudos *in vitro* demonstraram que as apolipoproteínas C (apoCs) têm um efeito inibitório ou estimulador sobre uma variedade de receptores e enzimas envolvidas no metabolismo de lipoproteína. Estes dados sugerem um complexo papel das apoCs em doenças humanas. (JONG et al., 1999). Um polimorfismo deleção/inserção de 4pb (CGTT) na região promotora do gene APOC1 (alelo H2) está associado com início tardio da doença de Alzheimer (KI et al., 2002; PODUSLO et al., 1995; PODUSLO et al., 1998; PETIT-TURCOTTE et al., 2001).

### **2.3.2 GENE *BAT1***

O gene humano *BAT1* é um membro da família DEAD-box de RNA helicases (PEELMAN et al., 1995). Está localizado no Complexo Principal de Histocompatibilidade no cromossomo 6, numa região que afeta várias desordens imunopatológicas e é considerado um regulador negativo de inflamação (PRICE et al., 1999; CHEONG et al., 2001 e OTA et al., 2001) . Esse gene parece regular a produção de citocinas inflamatórias associadas com a DA. Um polimorfismo no gene *BAT1* é caracterizado por uma troca alélica G→C na região promotora do gene, na posição - 22 (*BAT1* -22), e é encontrado em um haplótipo ancestral conservado associado com um risco aumentado de imunopatologias (WONG et al., 2003). No entanto, um trabalho desenvolvido na população australiana mostrou um efeito de proteção da alteração genética do *BAT1* -22 para DA (GNJEC et al., 2008). O estudo de predisposição genética nos genes do sistema imune na DA é corroborado pelo fato de que a característica patológica proeminente, como inflamação, é observado no cérebro de pacientes com a doença (MCGEER & MCGEER, 1998).

### **2.3.3 GENE *ABCG2***

O gene *ABCG2*, que codifica a proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP), está localizado no cromossomo 4q22 e é o segundo membro da subfamília G da superfamília de transportadores *ATP-binding cassette* (ABC) (MAO & UNADKAT, 2014). Transportadores ABC são proteínas de membrana integrais e ubíquas que translocam uma ampla variedade de substratos através das membranas celulares contra gradiente de concentração, e regulam a disponibilidade de drogas,

metabolismo e a distribuição nas células e matriz extracelular (LINTON, 2007). Xiong et al (2009) sugere que o gene *ABCG2* parece bloquear a barreira hematoencefálica, impedindo, assim, que a proteína  $\beta$  amilóide presente no sangue entre no cérebro.

O polimorfismo C421A do gene *ABCG2* tem sido associado com níveis mais baixos de expressão de proteína, transporte deficiente e susceptibilidade aumentada para degradação proteossomal mediada por ubiquitina (MIZUARAI et al., 2003; FURUKAWA et al., 2009 e IMAI et al., 2002). O tráfego anômalo da proteína  $\beta$  amilóide através da barreira hematoencefálica pode contribuir para o acúmulo desta proteína no cérebro. Sendo assim, variações nos fatores que contribuem para o transporte correto da  $\beta$  amilóide podem desempenhar um papel no desenvolvimento da doença de Alzheimer (FEHÉR et al., 2013).

## **2.4 ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS COM A DA ESPORÁDICA**

Sabe-se que a DA esporádica tem etiologia multifatorial. Por isso, é necessário que um mesmo fator genético seja investigado em diversas populações, uma vez que os hábitos de vida e a etnia interagem juntamente com os fatores genéticos, podendo, portanto, um mesmo polimorfismo se comportar de maneiras diferentes em populações distintas.

A criação de perfis genéticos de susceptibilidade para a DA, em populações específicas, pode ser uma poderosa ferramenta na busca de melhores tratamentos e estratégias mais eficientes de prevenção da doença.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Este trabalho teve como objetivo avaliar a distribuição genotípica de polimorfismos dos genes *APOC1*, *BAT1* e *ABCG2* e sua possível associação com a Doença de Alzheimer em pacientes de Vitória-ES, por meio de estudo caso: controle.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estimar a distribuição genotípica de polimorfismos nos genes *APOC1*, *BAT1* e *ABCG2* em pacientes com Doença de Alzheimer e controles na população de Vitória/ES.
- Avaliar a importância de polimorfismos dos genes *APOC1*, *BAT1* e *ABCG2* como possíveis fatores genéticos de risco para a Doença de Alzheimer na população de Vitória.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 AMOSTRA

A amostra de participantes do estudo de associação desenvolvido nesta pesquisa foi obtida na proporção de 1 caso (pacientes com a Doença de Alzheimer) para 2 controles (pessoas saudáveis). A amostra foi formada por 243 indivíduos não consanguíneos, pareados em relação a idade, sexo e etnia, residentes em Vitória-ES. Entre eles, 82 eram pacientes com Doença de Alzheimer e 161 eram idosos saudáveis.

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

Esta pesquisa teve a anuência da direção clínica do Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (HSCMV) e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, da Escola Superior de Ciências da Saúde de Vitória – EMESCAM (anexo 1). Todos os participantes da pesquisa assinaram o termo de consentimento esclarecido (anexo 2).

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

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

Os dados relativos a média de idade nos grupos controle e de pacientes, bem como a caracterização sociodemográfica da amostra estão apresentados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Descrição da idade dos indivíduos.

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Pacientes	61	108	80.0	7.8
Controle	61	108	81.2	7.5

Tabela 2: Caracterização sociodemográfica da amostra

Variáveis	Categorias	Pacientes		Controles		Total	%
		n	%	n	%		
Gênero	Masculino	28	34.1	43	26.7	71	29.2
	Feminino	54	65.9	118	73.3	172	70.8
Faixa Etária	≤ 80 anos	36	43.9	98	60.9	134	55.1
	> 80 anos	46	56.1	63	39.1	109	44.9
Etnia	Descendência europeia	47	57.3	89	55.3	136	56.0
	Descendência Africana	30	36.6	69	42.9	99	40.7
	Sem informação	5	6.1	3	1.9	8	3.3
Escolaridade	Educação formal	44	53.7	102	63.4	146	60.1
	Iletrados	29	35.4	49	30.4	78	32.1
	Sem informação	9	11.0	10	6.2	19	7.8

## 4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado através da ferramenta online OEGE (*Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies*). A verificação da associação dos polimorfismos dos genes *APOC1*, *BAT1* e *ABCG2* com a doença de Alzheimer foi realizada através da regressão logística. Na literatura há indícios de que alguns fatores como gênero, idade, escolaridade e *APOE* podem influenciar no

desenvolvimento da doença. Sendo assim, a regressão logística foi ajustada a estes fatores. A regressão foi modelada pelo método de entrada “Enter” onde todas as covariáveis são avaliadas simultaneamente. Também foi apresentada a razão de chances (OR) bruta e ajustada. O nível alfa de significância adotado foi de 5% com intervalo de confiança de 95%. O programa utilizado nas análises foi o IBM SPSS *Statistics version 21*.

### **4.3 MÉTODOS**

Foram coletados 9ml de sangue periférico para extração de DNA dos participantes da pesquisa. Os dados clínicos foram obtidos por meio de entrevista realizada a partir de um formulário (Anexo 3).

A extração do DNA foi realizada a partir da metodologia descrita por Miller, Dykes e Poleski (1988), com modificações. A técnica de PCR-RFLP (Polimerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism) foi utilizada para a determinação dos polimorfismos. Para a reação de PCR, foram empregados primers específicos citados previamente na literatura, como mostra a tabela 3. As condições de PCR para cada polimorfismo estão listas na tabela 4. Foi utilizado o modelo de termociclador Veriti™ da empresa Applied Biosystems.

Em seguida, os produtos da PCR gerados foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição específicas, nas temperaturas e condições sugeridas pelo fornecedor e avaliadas no nosso laboratório (tabela 5) .

Tabela 3. Sequência e referência dos primers utilizados nas reações de PCR.

<b>GENE</b>	<b>Fragmento</b>	<b>Sequencia de Primers</b>	<b>Referência</b>
<b>APOC1</b>	195pb	F= ATCGATCACGACCCTCTC R= TCCCCACTCAGAATGTAGC	GAO et al., 2002
<b>BAT1</b>	170pb	F= CAACCGGAAGTGAGTGCA R= CAGACCATCGCCTGTGAA	GNJEC et al., 2008
<b>ABCG2</b>	184pb	F= ATGTTGTGATGGGCACTCTG R= TGCTGATCATGATGCTTTCAG	FEHÉR et al., 2013

Tabela 4. Condições das reações de PCR para cada gene

<b>GENE</b>	<b>ETAPAS</b>				<b>Nº CICLOS</b>
	<b>DENATURAÇÃO INICIAL</b>	<b>DENATURAÇÃO</b>	<b>ANELAMENTO E EXTENSÃO</b>	<b>EXTENSÃO FINAL</b>	
<b>APOC1</b>	94° C por 4'	94°C por 30''	60°C por 30'' e 72°C por 30''	72°C por 10'	30
<b>BAT1</b>	95°C por 5'	95°C por 30''	54°C por 35'' e 72°C por 40''	72°C por 10'	44
<b>ABCG2</b>	94°C por 4'	94°C por 30''	68°C por 30'' e 72°C por 30''	72°C por 10'	30

Tabela 5: Condições de digestão enzimática, eletroforese e análise das reações de FRLP.

	Enzima	Tempo/temperatura de Encubação e análise	Fragmentos gerados pb
<b>APOC1</b>	<i>HpaI</i>	37°C por até 24h Gel poliacrilamida a 7%	195pb H1/H1; 137pb e 58pb H2/H2; 195pb, 137pb e 58pb H1/H2
<b>BAT1</b>	<i>Alw44I</i>	37°C por até 24h Gel poliacrilamida a 7%	170pb GG; 152pb e 18pb CC; 170pb, 152pb e 18pb CG
<b>ABCG2</b>	<i>MseI</i>	37°C por até 24h Gel poliacrilamida a 7%	100pb e 84pb CC; 84pb, 64pb e 36pb AA; 100pb, 84pb, 64pb e 36pb AC

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram analisados, por meio de estudo de associação caso: controle, os polimorfismos *APOC1 H2*, *BAT1-22* e *ABCG2 C421A*, relacionados a Doença de Alzheimer em pacientes de Vitória-ES. O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg mostrou que os polimorfismos de *APOC1* estão em equilíbrio no grupo de pacientes ( $X^2= 0,061$ ;  $p= 0,805$ ), no grupo controle ( $X^2= 0,377$ ;  $p= 0,539$ ) e na amostra total ( $X^2= 0,075$ ;  $p= 0,785$ ). Os polimorfismos de *ABCG2* também encontram-se em equilíbrio entre pacientes ( $X^2= 1,349$ ;  $p= 0,245$ ), controles ( $X^2 = 1,059$ ;  $p= 0,303$ ) e na amostra total ( $X^2= 2,273$ ;  $p= 0,132$ ). Os polimorfismos de *BAT1*, no entanto, estão fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo de pacientes ( $X^2= 15,965$ ;  $p= 0$ ), no grupo controle ( $X^2= 39,228$ ;  $p= 0$ ) e na amostra total ( $X^2= 54,727$ ;  $p= 0$ ), por isso foram excluídos da análise de regressão logística.

As figuras 4, 5 e 6 mostram o padrão de bandas, após a digestão com enzimas de restrição, dos polimorfismos dos genes *APOC1*, *BAT1* e *ABCG2*, respectivamente.

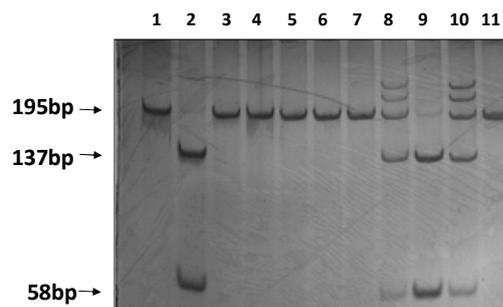


Figura 4: padrão de bandas de *APOC1*. Colunas 1, 3, 4, 5, 6, 7 e 11 = genótipo H1/H1.  
Coluna 2 e 9 = genótipo H2/H2. Colunas 8 e 10 = genótipos H1/H2.

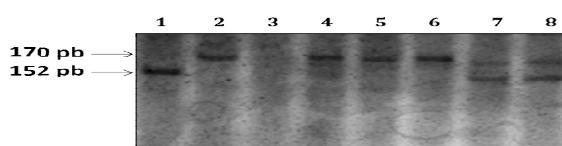


Figura 5: padrão de bandas de *BAT1*. Coluna 1 = genótipo CC.  
Colunas 2, 4, 5 e 6 = genótipo GG. Colunas 7 e 8 = genótipo CG.  
Coluna 3 = não amplificado.

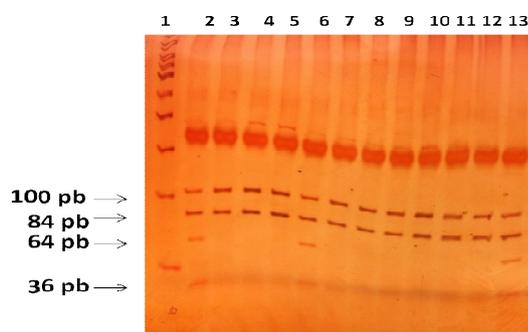


Figura 6: padrão de bandas de *ABCG2*. Coluna 1 = ladder de 50pb.  
Colunas 2, 6 e 13 = genótipo AC. Coluna 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 = genótipo CC.

A tabela 6 traz as distribuições genotípicas de todos os genes entre pacientes e controles. A tabela 7 relata os resultados encontrados na análise de regressão logística com o OR bruto e ajustado aos fatores que podem influenciar no desenvolvimento da doença de Alzheimer.

Tabela 6: Distribuição genotípica

Variáveis	Categorias	Pacientes		Controles		Total	%
		n	%	N	%		
APOE*	ε4 Negativo	47	57.3	49	30.4	96	39.5
	ε4 Positivo	35	42.7	112	69.6	147	60.5
APOC1	H1/H1	42	51.2	113	70.2	155	63.8
	H1/H2	34	41.5	45	28.0	79	32.5
	H2/H2	6	7.3	3	1.9	9	3.7
BAT1	GG	30	36.6	45	28.0	75	30.9
	CG	49	59.8	110	68.3	159	65.4
	CC	0	0	3	1.9	3	1.2
	Não amplificados	3	3.7	3	1.9	6	2.5
ABCG2	CC	59	72.0	124	77.0	183	75.3
	AC	18	22.0	23	14.3	41	16.9
	AA	0	0	0	0	0	0
	Não amplificados	5	6.1	14	8.7	19	7.8

\*Dados obtidos por pesquisa realizada anteriormente (ALMADA et al., 2012)

Tabela 7: Regressão logística com OR bruto e ajustado aos fatores gênero, faixa etária, escolaridade e APOE.

Variáveis	Categorias	Desfecho		OR**	Valor p	OR***	Valor p
		Controles	Pacientes				
Etnia	Descendência europeia	89	47	1.304 (0.726 - 2.342)	0.374	1.335 (0.686 - 2.596)	0.561
	Descendência africana	69	30	1	-	1	-
APOC1	H1/H1*	113	42	0.186 (0.044 - 0.777)	<b>0.021</b>	0.434 (0.086 - 2.202)	0.314
	H1/H2	45	34	0.378 (0.088 - 1.620)	0.190	0.567 (0.115 - 2.797)	0.486
	H2/H2	3	6	1	-	1	-
ABCG2	CC	125	59	0.608 (0.305 - 1.213)	0.158	0.47 (0.207 - 1.070)	0.072
	AC	23	18	1	-	1	-

\*Valor estatisticamente significativo \*\* Odds Ratio bruto. \*\*\* Odds Ratio ajustado para gênero, faixa etária, escolaridade e APOE.

Nota: O valor 1 é a categoria de referência.

O genótipo AA do gene *ABCG2* não entrou na análise pelo fato de não ter sido encontrado na amostra, e por consequência disso, haveria diminuição da robustez do teste.

Somente o genótipo H1/H1 do gene *APOC1* foi significativo, reduzindo as chances de Alzheimer em 81.4%  $[(1.00 - 0.186) \times 100]$ , em comparação a H2/H2. Porém, ao ajustar este polimorfismo aos outros fatores de risco para a doença (gênero, faixa etária, escolaridade e *APOE*), este genótipo deixa de ser significativo. Os demais polimorfismos não demonstraram serem fatores de risco ou proteção para a doença de Alzheimer na população de Vitória/ES.

Em estudo anterior, realizado pelo mesmo grupo de pesquisa do presente trabalho, foi investigada a associação do gene *APOE* com a DA na população de Vitória/ES. O alelo e4 mostrou associação estatisticamente significativa com a doença, se comportando como um fator de risco (OR = 3.01, 95%IC = 1.96-4.61; P < 0.0001). O alelo e3, por sua vez, apresentou-se como fator de proteção contra a doença (OR = 0.46, 95%CI = 0.30-0.67; P < 0.0001) (ALMADA et al., 2012).

Estudos apontam o alelo H2 do gene *APOC1* como fator de risco para a doença de Alzheimer em diferentes populações mundiais (KI et al., 2002; SCACCHI et al., 1999; PODUSLO et al., 1998 e PODUSLO et al., 1995). No entanto, os resultados obtidos nesse trabalho diferem daqueles apresentados na literatura, uma vez que o genótipo H2/H2 não apresentou associação com a doença e o genótipo H1/H1 se comportou como fator de proteção para a população estudada.

O genótipo CC do gene *BAT1 -22* mostrou um efeito de proteção contra a DA na população da Austrália, uma comunidade com descendência norte-européia (GNJEC et al., 2008). Contudo, o fato desse polimorfismo estar fora do equilíbrio de Hardy-Weiberg na amostra analisada no presente estudo, tornou sua análise inviável, uma vez que os resultados gerados não poderiam ser considerados confiáveis. Torna-se necessária, então, a realização de um estudo posterior aprofundado para averiguar as causas desse desvio e quais soluções devem ser tomadas a fim de permitir a correta e confiável análise do polimorfismo *BAT1 -22*

Outra divergência foi encontrada entre dados da literatura e os resultados desse estudo em relação ao polimorfismo C421A do gene *ABCG2*. O estudo de Fehér et al (2013) aponta o alelo CC do gene como fator de risco. Nossos resultados, porém, mostraram que não há associação entre este polimorfismo e a DA na população de Vitória-ES.

Tais diferenças podem ser explicadas pelo fato de que a doença de Alzheimer é multifatorial, e cada uma das populações estudadas provavelmente tem um perfil específico de etnia e diferenças genéticas e comportamentais. Os estudos que relatam a associação do polimorfismo *APOC1 H2* com a DA, foram feitos na população coreana (KI et al., 2002) e em descendentes europeus (sem descendência hispânica, negra ou de índios) (PODUSLO et al., 1998). Por fim, a amostra utilizada no estudo do polimorfismo *ABCG2 C421A* é proveniente da Hungria (FEHÉR et al., 2013), uma população que também apresenta descendência europeia em sua maioria (BRANDSTATTER et al., 2007 e GUGLIELMINO et al., 2000).

O presente estudo foi realizado na população de Vitória-ES, Brasil. As comunidades que vivem na costa do Brasil, como Vitória, tem um grau relevante de miscigenação com maior contribuição genética de afro-americanos, índios e europeus (FREIRE-MAIA, 1957). Sugere-se, então, que a diferença étnica entre a população de Vitória-ES e as demais populações citadas, pode ser a razão pela qual os resultados do presente estudo divergiram daqueles relatados na literatura.

## 6. CONCLUSÃO

Um mesmo polimorfismo genético, associado a doenças multifatoriais, pode se comportar como fator de risco, fator de proteção ou fator nulo, em comunidades diferentes, devido ao perfil específico de etnia e diferenças genéticas e comportamentais. Portanto, estudos em populações distintas tornam-se importantes para a identificação de polimorfismos de risco. Neste estudo, os resultados apontam o genótipo H1/H1 do gene *APOC1* como fator de proteção contra a DA na população de Vitória-ES. Por outro lado, os polimorfismos nos genes *BAT1* e *ABCG2* não apresentaram associação com a doença na população capixaba.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUZNAIT, A.H.; KADDOUMI, A. Role of ABC Transporters in the Pathogenesis of Alzheimer's disease. ACS. Chem. Neurosci. Vol 3. p 820-831. 2012.

ALMADA, B.V.; ALMEIDA, L.D.; CAMPOREZ, D.; et al. Protective effect of the APOE-e3 allele in Alzheimer's disease. Braz J Med Biol Res. 45:8–12. 2012.

AMADORUGUE, P.C.; BARNHAM, K.J. Alzheimer's Disease and Metals: A Review of the Involvement of Cellular Membrane Receptors in Metallosignalling. International Journal of Alzheimer's Disease. 2011.

AVRAMOPOULOS, D. Genetics of Alzheimer's disease: recent advances. Genome Medicine, 1:34, 2009.

BERTRAM, L.; MCQUEEN, M.B.; MULLIN, K.; et al. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. Nat. Genet. 39, 17–23, 2007.

BIRD, T.D. Genetic Aspects of Alzheimer Disease. Genet Med, 10(4): 231–239, 2008.

BLENNOW, K.; Leon, M.J.; Zetterberg, H. Alzheimer's disease. Lancet, 368: 387-403, 2006.

BLESSED, G.; TOMLINSON, B.E.; ROTH, M. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. Br. J. Psychiatry. Vol 114. p. 797–811. 1968.

BRANDSTATTER, A.; EGYED, B.; ZIMMERMANN, B.; et al. Migration Rates and Genetic Structure of two Hungarian Ethnic Groups in Transylvania, Romania. Ann. Hum. Genet. Vol 71. p 791-803. 2007.

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

CAMPION, D.; DUMANCHIN, C.; HANNEQUIN, D.; et al.- Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. Am. J. Hum. Genet, 65, 664–670, 1999.

CHEONG, K.Y.; ALLCOCK, R.J.N.; EERLIGH, P.; et al. Localization of central MHC genes influencing type 1 diabetes. Hum. Immunol. Vol 62. p 1363–1370. 2001.

COUSOL, E.J.; PALIGA, K.; MASTERS, C.L. What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. **Neurochem Int.** 36(3): 175-84. 2000.

CRUCHAGA, C.; CHAKRAVERTY, S.; MAYO, K.; et al. Rare Variants in APP, PSEN1 and PSEN2 Increase Risk for AD in Late-Onset Alzheimer's Disease Families. *Plos One*. Vol 7. 2012.

FEHÉR, Á.; JUHÁSZ, A.; LÁSZLÓ, A.; et al. Association between the ABCG2 C421A polymorphism and Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*. 2012.

FREIRE-MAIA, N. Inbreeding in Brazil. *Am J Hum Genet*. Vol 9. p 284-298. 1957.

FRIDMAN, C.; GREGÓRIO S. P.; NETO E. D.; et al. Alterações genéticas na doença de Alzheimer *Rev. psiquiatr. Clín.*, V 31. 2004.

FURUKAWA, T.; WAKABAYASHI, K.; TAMURA, A.; et al. Major SNP (Q141K) variant of Human ABC Transporter ABCG2 Undergoes Lysosomal and Proteasomal Degradations. *Pharm Res.* 26(2): 469-479. 2009.

GATZ, M.; PEDERSEN, N.L.; BERG, S.; et al. Heritability for Alzheimer's Disease: The Study of Dementia in Swedish Twins. *Journal of Gerontology: Medical Sciences*, 52, 1997.

GNJEC, A.; D'COSTA, K.J.; LAWS, S.M.; et al. Association of alleles carried at TNFA -850 and BAT1 -22 with Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation.* 5:36. 2008.

GRAEBER, M.B.; KÖSEL, S.; BANATI, R.B.; et al. Rediscovery of the case described by Alois Alzheimer in 1911: historical, histological and molecular genetic analysis. *Neurogenetics.* 1(1), p 73-80, 1997.

GUGLIELMINO, C.R.; DE SILVESTRI, A.; BERES, J. Probable ancestors of Hungarian ethnic groups: an admixture analysis. *Ann. Hum. Genet.* Vol 64. p 145-159. 2000.

HARDY, J.; BOGDANOVIC, B.; WINBLAD, B.; et al. Pathways to Alzheimer's disease. *Journal of Internal Medicine.* 2014.

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

- HARWOOD, D.G.; BARKER, W.W.; LOEWENSTEIN, D.A.; et al. A cross-ethnic analysis of risk factors for AD in white Hispanics and white non-Hispanics. *Neurology*. 52(3): 551-6. 1999.
- HEBERT, S.S.; SERNEELS, L.; TOLIA, A.; et al. Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes. *EMBO Rep*. 7:739–45. 2006.
- IMAI, Y.; NAKANE, M.; KAGE, K.; et al. C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. *Mol Cancer Ther*. 1(8): 611-6. 2002.
- JONG, M.C.; HOFKER, M.H.; HAVEKES, L.M. Functional Differences Between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Vol 19. p 472-484. 1999.
- KI, C.; NA, D.L.; KIM, D.K.; et al. Genetic association of an apolipoprotein C-I (APOC1) late-onset Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*. Vol 319. p 75-78. 2002.
- LAMBERT, J.; HEATH, S.; EVEN, G.; et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.*, 41:1094–1099. 2009.
- LINTON, K.J. Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)*. 22:122-30. 2007.
- MAO, Q.; UNADKAT, J.D. Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport-an Update. *AAPS Journal*. 2014.
- MAURER, K.; VOLK, S.; GERBALDO, H. Auguste D and Alzheimer's disease. *The Lancet*. Vol 349. p 1546-1549, 1997.
- MCGEER, E.G.; MCGEER, P.L. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. *Exp Gerontol*. Vol 33. p 371-378. 1998.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. Vol 16. p 1215. 1988.
- MIZUARAI, S.; AOZASA, N.; KOTANI, H. Single Nucleotide Polymorphisms Result In Impaired Membrane Localization And Reduced Atpase Activity In Multidrug Transporter ABCG2. *Int. J. Cancer*. Vol 109. p 238-246. 2003.

MÖLLER, H.J.; GRAEBER M.B. The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 248(3), 1998

MUCKE, L. Alzheimer's Disease. *Neuroscience.* Vol 461. 2009.

OTA, M.; KATSUYAMA, Y.; KIMURA, A.; et al. A second susceptibility gene for developing rheumatoid arthritis in the human MHC is localized within a 70-kb interval telomeric of the TNF genes in the HLA class III region. *Genomics.* Vol 71. p 263–270. 2001.

OTT, A.; SLOOTER, A.J.C.; HOFMAN, A.; et al. Smoking and risk of dementia and Alzheimer's disease in a population-based cohort study: the Rotterdam Study. *The Lancet.* Vol 351. p 1840-1843. 1998.

PAPASSOTIROPOULOS, A.; FOUNTOULAKIS, M.; DUNCKLEY, T.; et al. Genetics, transcriptomics and proteomics of Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry,* 67(4): 652–670, 2006.

PODUSLO, S.E.; NEAL, M.; HERRING, K.; et al. The Apolipoprotein C1 A Allele As a Risk Factor for Alzheimer's disease. *Neurochemical Research.* 023: 361-367, 1998.

PODUSLO S.E.; NEAL M.; SHELLY J. A closely linked gene to apolipoprotein E may serve as an additional risk factor for Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* Vol 201. p 81-83. 1995.

PEELMAN, L.J.; CHARDON, P.; NUNES, M.; et al. The BAT1 gene in the MHC encodes an evolutionary conserved putative nuclear RNA helicase of the DEAD family. *Genomics.* Vol 26. p 210–218. 1995.

PETIT-TURCORE, C; STOHL, S.M; BEFFERT, U.; et al. Apolipoprotein C-I Expression in the Brain in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Disease.* Vol 8. p 953-963. 2001.

PRICE, P.; WITT, C.; ALLCOCK, R.J.N.; et al. The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunogenetics.* Vol 167. p 257–274. 1999.

RINGMAN, J.M.; GOATE, A.; MASTERS C, L.; et al. Genetic Heterogeneity in Alzheimer Disease and Implications for Treatment Strategies. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 14:499. 2014.

ROHER, A.E.; MAAROUF, C.L.; MALEK-AHMADI, M.; et al. Subjects harboring presenilin familial Alzheimer's disease mutations exhibit diverse white matter biochemistry alterations. *Am J Neurodegener Dis.* 2(3): 187-207. 2013.

RYMAN, D.C.; ACOSTA-BAENA, N.; AISEN, P.S.; et al. Symptom onset in autosomal dominant Alzheimer disease: a systematic review and meta-analysis. *Neurology.* 83 (3): 253-60. 2014.

SCACCHI, R.; GAMBINA, G.; RUGGERI, M.; et al. Plasma levels of apolipoprotein E and genetic markers in elderly patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* Vol 259. p 33-36. 1999.

SHELLENBERG, G. D. Genetic dissection of Alzheimer disease, a heterogeneous disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol 92. p 8552-8559, 1995.

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

XIONG, H.; CALLAGHAN, D.; JONES, A.; et al. ABCG2 is up-regulated in Alzheimer's brain with cerebral amyloid angiopathy and may act as a gatekeeper at the blood-brain barrier for A $\beta$ 1-40 peptides. *J Neurosci.* 29(17): 5463-5475. 2009.

WONG, A.M.; ALLCOCK, R.J.; CHEONG, K.Y.; et al. Alleles of the proximal promoter of BAT1, a putative anti-inflammatory gene adjacent to the TNF cluster, reduce transcription on a disease-associated MHC haplotype. *Genes Cells.* Vol 8. p 403-412. 2003.

WORD ALZHEIMER REPORT. Londres: Alzheimer's Disease International, 2009. Anual.

## ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



### DECLARAÇÃO

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

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

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

Vitória, 28 de julho de 2010.

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

Av. N. S. da Penha, 2190  
Santa Luiza - Vitória  
ES - Brasil - CEP 29045-402

EMESCAM  
Escola Superior de Ciências da Santa Casa  
de Misericórdia de Vitória

Tel.: +55 27 3334 3500  
info@emescam.br  
www.emescam.br

**ANEXO 2- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO**  
Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento Ciências Biológicas  
/CCHN

I - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA:

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

Pesquisador responsável: Flavia de Paula

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

Avaliação do risco da pesquisa:

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

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

## II – DIREITOS E GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

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

## III – Informações sobre os responsáveis pelo acompanhamento da pesquisa:

Referências: Flavia de Paula.

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

## IV- DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA.

NOME

DATA NASCIMENTO  IDADE  SEXO  M  F

ENDEREÇO

ESCOLARIDADE

Responsável legal (se necessário):

NOME

GRAU DE PARENTESCO

TELEFONE

#### V – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

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

Local e data

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Assinatura do pesquisador responsável (Flavia de Paula)

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

**ANEXO 3** - Questionário de Saúde Pessoal

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

## HISTÓRIA PESSOAL

■ Data

■ Qual a sua idade?  anos

■ Sexo  Masculino  Feminino

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

Caucasiano

Negro

Oriental

Indígena

Outro. Qual?

■ Qual o seu estado civil?

Casado

Solteiro

Separado

Divorciado

Viúvo

Não informado

■ De quantos filhos o(a) Sr(a) é pai (mãe) natural (isto é, não inclua filhos adotados e de criação e inclua filhos que moram separadamente)?

■ Qual é a renda mensal de sua família?  salários.

■ Qual a sua escolaridade?

Sem escolaridade

Ensino fundamental

Ensino médio

Educação superior

Não informado

## HISTÓRIA OCUPACIONAL

■ Qual é o seu local de trabalho?

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

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

■ Que tipo de trabalho o(a) Sr(a) faz?

■ Qual é a sua carga horária de trabalho?

## EXPOSIÇÃO

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

Nos últimos 10 anos

Quantas vezes por mês?

Nos últimos 12 meses

Quantas vezes por mês?

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

SIM Qual?

NÃO

## HISTÓRIA DE FUMO

■Alguma vez o(a) Sr(a) fumou?

SIM e não fuma atualmente

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

Há quanto tempo parou de fumar?  anos

O que fumou?

Cigarro

Charuto

Cachimbo

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

SIM e fuma atualmente

O que fuma?

Cigarro

Charuto

Cachimbo

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

NÃO, e não convive com fumantes.

NÃO, mas convive com fumantes.

## MEDICAMENTOS E DOENÇAS

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

NÃO

SIM

Medicamento

Dose

Duração do tratamento




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

NÃO SIM

Medicamento

Dose

Duração do tratamento

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

Medicamento

Dose

Duração do tratamento

**■**O(a) Sr(a) teve alguma dessas doenças? Câncer      Tipo  Hepatite Mononucleose Herpes AIDS Meningite Infecção bacteriana ou viral Doença cardiovascular Diabete Doença renal crônica Doença de Parkinson Doença Alzheimer      Tempo desde o diagnóstico  Outra(s) doença(s) importante(s)**■**Liste as vacinações que o (a) Sr (a) recebeu nos últimos 12 meses.

Vacina

Data

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

Razão para o raio-X

Data (ano)



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

Motivo

Data



### HÁBITOS ALIMENTARES FREQUENTES

■ O(a) Sr(a) come apenas vegetais?

SIM

NÃO

■ O(a) Sr(a) come carne?

NÃO

SIM

Com que frequência?

Dias por semana

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

■ O(a) Sr(a) usa adoçantes?

NÃO

SIM. Quantas vezes ao dia?

■ O(a) Sr(a) bebe refrigerantes?

NÃO

SIM. Quantas vezes por semana?

■O(a) Sr(a) toma café?

NÃO

SIM. Quantas xícaras pequenas por dia?

■O(a) Sr(a) bebe chá?

NÃO

SIM. Quantas xícaras pequenas por dia?

■O(a) Sr(a) toma chimarrão?

NÃO

SIM. Com que frequência?

■O(a) Sr(a) bebe cerveja?

NÃO

SIM. Qual a sua média de consumo semanal?

menos de uma garrafa por semana

1-6 garrafas por semana

7-12 garrafas por semana

13-24 garrafas por semana

mais de 24 garrafas por semana. Quantas?

■O(a) Sr(a) bebe vinho?

NÃO

SIM. Qual a sua média de consumo semanal:

1-4 copos por semana ou menos

5-8 copos por semana

9-16 copos por semana

mais de 16 copos por semana. Quantos?

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

NÃO  SIM. Qual ou quais?