

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Murilo e Olga e à minha tia
Nena, pelo grande amor que nos une.

Ao meu tio João, que despertou em mim
o interesse em compreender a doença de
Alzheimer.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Nitrini, que valendo-se do seu profundo conhecimento científico, ajudou-me a crescer como neurologista e pesquisadora, permitindo que eu seguisse seus passos e me espelhasse em seu exemplo.

Ao Dr Fernando Kok por sua ajuda e atenção inestimáveis na realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Sueli Kazue Nagahashi Marie por seu apoio e incentivo nos momentos mais difíceis desta jornada.

Ao Dr. Paulo Caramelli por seu apoio e incentivo desde os tempos de Residência Médica.

Aos meus colegas do Grupo de Neurologia Cognitiva e do Comportamento pelo incentivo e companheirismo.

Aos colegas do Centro de Investigação em Neurologia: Dra Sueli Oba-Shinjo, Keyla Barbosa, Mônica Rusticci, Dra Tânia Marcourakis, Eliene Campos e Rose Bedim pela ajuda e amizade.

À Dra Letícia Mansur, Cláudia Sellitto Porto, Dra Márcia Radanovic e Renata Arezza pelo apoio e amizade, com a esperança de que juntas possamos continuar a compartilhar idéias.

À D. Mary por seu carinho e sua ajuda.

Aos funcionários da Clínica de Neurologia: Erli, Reiko, Alair, Sueli, Waldirene, Vera Lúcia, Mercedes e Eliseth, pelo grande carinho e amizade que sempre me dispensaram.

Aos pacientes pela colaboração e confiança no meu trabalho.

À minha família pelo estímulo e paciência que tiveram comigo nesta trajetória.

À Monica, Rosana, Marina e Helena por me fazerem compreender o verdadeiro sentido da palavra “amizade”.

A todos os mestres que despertaram em mim a vontade e o prazer em compreender a ciência.

À FAPESP pelo auxílio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

ÍNDICE

| | |
|----------------------------|------|
| Lista de abreviaturas..... | vii |
| Lista de figuras..... | viii |
| Lista de tabelas..... | ix |
| Lista de quadros..... | xiii |
| Resumo..... | xiv |

INTRODUÇÃO

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 01 |
| 1.1. Etiologia genética da doença de Alzheimer..... | 04 |
| 1.2. Apolipoproteína E..... | 05 |
| 1.2.1. Envolvimento da apoE na fisiopatologia da doença de Alzheimer..... | 08 |
| 1.2.2. Estudos epidemiológicos..... | 11 |
| 1.2.3. Determinação genotípica da APOE como teste diagnóstico de DA..... | 14 |
| 1.2.4. ApoE em outras doenças..... | 14 |
| 1.3. Região promotora do gene APOE..... | 16 |
| 1.4. Proteína relacionada ao receptor LDL..... | 18 |

| | |
|--|----|
| 1.5. Considerações finais..... | 20 |
| OBJETIVOS | |
| 2. Objetivos..... | 22 |
| METODOLOGIA | |
| 3. Metodologia..... | 23 |
| 3.1. Casuística..... | 23 |
| 3.2. Técnicas laboratoriais..... | 28 |
| 3.2.1. Apolipoproteína E..... | 28 |
| 3.2.2. Posição –491 do gene APOE..... | 32 |
| 3.2.3. Posição –219 do gene APOE..... | 35 |
| 3.2.4. Proteína relacionada ao receptor LDL..... | 38 |
| 3.3. Estudo estatístico..... | 42 |
| 3.4. Aspectos éticos..... | 43 |
| RESULTADOS | |
| 4. Resultados..... | 44 |
| 4.1. Análise dos genótipos e alelos da APOE..... | 44 |
| 4.2. Análise dos genótipos e alelos da localização –491 da região promotora do gene APOE..... | 52 |
| 4.3. Análise dos genótipos e alelos da localização –219 da região promotora do gene APOE..... | 55 |

| | |
|---|----|
| 4.4. Análise dos genótipos e alelos do gene do LRP..... | 61 |
| 4.5. Antecedentes familiares..... | 64 |

DISCUSSÃO

| | |
|--|----|
| 5. Discussão..... | 65 |
| 5.1. Apolipoproteína E..... | 65 |
| 5.2. Região promotora do gene APOE..... | 69 |
| 5.3. Proteína relacionada ao receptor LDL..... | 71 |
| 5.4. Antecedentes familiares..... | 72 |
| 5.5. Considerações finais..... | 72 |

CONCLUSÕES

| | |
|--|----|
| 6. Conclusões..... | 74 |
| 6.1. Apolipoproteína E..... | 74 |
| 6.2. Região promotora do gene APOE..... | 75 |
| 6.3. Proteína relacionada ao receptor LDL..... | 75 |

| | |
|--|-----------|
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 76 |
|--|-----------|

| | |
|---------------------|------------|
| SUMMARY..... | 100 |
|---------------------|------------|

| | |
|-------------------|------------|
| ANEXO..... | 101 |
|-------------------|------------|

Lista de abreviaturas

- **APP** = proteína precursora de amilóide
- **APPs** = proteína precursora de amilóide secretada
- **cr** = cromossomo
- **DA** = doença de Alzheimer
- **APOE** = apolipoproteína E (gene)
- **apoE** = apolipoproteína E (proteína)
- **LRP** = proteína relacionada ao receptor LDL
- **PCR** = Reação em cadeia de polimerase
- **bA** = proteína β amilóide
- **LCR** = líquido cefalorraqueano
- **SNC** = sistema nervoso central
- **SNP** = sistema nervoso periférico
- **RNA_m** = RNA mensageiro

Lista de figuras

- Figura 1.** Topologia e processamento da proteína precursora de amilóide...03
- Figura 2.** Seqüência de parte do gene da APOE ϵ 4.....30
- Figura 3.** Fragmentos A-G gerados pela ação da enzima *HhaI* no produto de PCR do gene APOE ϵ 4.....31
- Figura 4.** Seqüência de parte do gene da região promotora da APOE, localização dos *primers* e do polimorfismo -491A/T.....34
- Figura 5.** Seqüência gênica de parte da região promotora do gene APOE, localização dos *primers* e do polimorfismo -219T/G.....37
- Figura 6.** Seqüência de parte do gene do LRP.....39
- Figura 7.** Fotografias dos géis de poliacrilamida.....41

Lista de tabelas

- Tabela 1.** Freqüência do alelo $\epsilon 4$ da APOE em diferentes países.....13
- Tabela 2.** Caracterização demográfica e de antecedentes da casuística geral (%).....25
- Tabela 3.** Caracterização demográfica e de antecedentes de indivíduos com DA dos subgrupos senil e pré-senil (%).....26
- Tabela 4.** Caracterização demográfica e de antecedentes de indivíduos com DA e controles idosos muito idosos (≥ 80 anos) (%).....27
- Tabela 5.** Distribuição dos genótipos da APOE em indivíduos com DA e controles(%).....44
- Tabela 6.** Distribuição dos genótipos da APOE em indivíduos com DA senil e controles(%).....45
- Tabela 7.** Distribuição dos genótipos da APOE em indivíduos com DA pré-senil e controles(%).....46
- Tabela 8.** Freqüências de alelos da APOE entre pacientes e controles.....46
- Tabela 9.** Número e porcentagem (%) de indivíduos com DA e controles segundo a freqüência do alelo $\epsilon 4$ ou $\epsilon 2$47

- Tabela 10.** Correlação entre a ocorrência de DA e o número de alelos $\epsilon 4$ em homens e mulheres.....48
- Tabela 11.** Número e porcentagem (%) de indivíduos com DA senil ou pré-senil e controles segundo a presença de genótipos com pelo menos um alelo $\epsilon 2$ ou $\epsilon 4$49
- Tabela 12.** Número e porcentagem (%) de indivíduos idosos muito idosos com DA e controles, segundo a frequência do alelo $\epsilon 4$ 50
- Tabela 13.** Médias e respectivos desvios padrão da idade de início dos indivíduos com DA, segundo a frequência do alelo $\epsilon 4$50
- Tabela 14.** Médias e respectivos desvios padrão da idade de início dos indivíduos do subgrupo senil, segundo a frequência do alelo $\epsilon 4$51
- Tabela 15.** Médias e respectivos desvios padrão da idade de início dos indivíduos do subgrupo pré-senil, segundo a frequência do alelo $\epsilon 4$52
- Tabela 16.** Distribuição dos genótipos da localização -491 da região promotora do gene APOE em indivíduos com DA e controles (%).....53
- Tabela 17.** Distribuição dos genótipos da localização -491 da região promotora do gene APOE nos subgrupos senil ou pré-senil (%).....53

- Tabela 18.** Número e porcentagem (%) de indivíduos com DA comparados aos controles, segundo a presença de genótipos com pelo menos um alelo A ou T.....54
- Tabela 19.** Número e porcentagem (%) de indivíduos com DA senil ou pré-senil comparado aos controles, segundo a presença de genótipos com pelo menos um alelo A ou T.....55
- Tabela 20.** Distribuição dos genótipos da localização -219 da região promotora do gene APOE em indivíduos com DA e controles (%).....56
- Tabela 21.** Distribuição dos genótipos da localização -219 da região promotora do gene APOE nos subgrupos senil e pré-senil (%).....57
- Tabela 22.** Número e porcentagem (%) de indivíduos com DA comparados aos controles, segundo a presença de genótipos com pelo menos um alelo T ou G.....58
- Tabela 23.** Número e porcentagem (%) de indivíduos com DA senil ou pré-senil comparados aos controles, segundo a presença de genótipos com pelo menos um alelo T ou G.....58
- Tabela 24.** Distribuição dos genótipos da localização -219 da região promotora do gene da APOE entre os indivíduos idosos muito idosos com DA e controles (%).....59

- Tabela 25.** Número e porcentagem (%) de indivíduos com DA e controles muito idosos, segundo a presença de genótipos com pelo menos um alelo T ou G.....60
- Tabela 26.** Número e porcentagem (%) de indivíduos segundo os genótipos da APOE e localização -219 da sua região promotora.....61
- Tabela 27.** Distribuição dos genótipos do LRP entre pacientes e controles (%)62
- Tabela 28.** Distribuição dos genótipos do LRP em pacientes com DA senil e pré-senil (%).....62
- Tabela 29.** Número e porcentagem (%) de indivíduos com DA comparados aos controles, segundo a presença de genótipos com pelo menos um alelo C ou T.....63
- Tabela 30.** Número e porcentagem (%) de indivíduos com DA senil ou pré-senil comparados aos controles, segundo a presença de genótipos com pelo menos um alelo C ou T.....64
- Tabela 31.** Número e porcentagem (%) de indivíduos (casos e controles) segundo antecedentes familiares para demência.....64

Lista de quadros

- Quadro 1.** Leitura dos genótipos da APOE de acordo com os fragmentos originados pelo processo de digestão.....32
- Quadro 2.** Leitura dos genótipos do polimorfismo A/T da localização -491 de acordo com os fragmentos originados pelo processo de digestão com a endonuclease *DraI*.....35
- Quadro 3.** Genótipos da região -219 do gene APOE de acordo com os fragmentos originados pelo processo de digestão pela endonuclease *MvaI*.....38
- Quadro 4.** Leitura dos genótipos do LRP de acordo com os fragmentos originados do processo de digestão pela endonuclease *RsaI*.....40

RESUMO

POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA E CODIFICADORA DO GENE APOE E DO GENE LRP NA DOENÇA DE ALZHEIMER EM INDIVÍDUOS BRASILEIROS

Fundamentos: A doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de demência nos países ocidentais. Do ponto de vista clínico, a doença pode se iniciar antes dos 65 anos, sendo denominada pré-senil, ou a partir dos 65 anos, caracterizando a forma senil. Polimorfismos do gene da apolipoproteína E (APOE), presentes em sua região codificadora e também na região promotora (-491 e -219, sendo o último denominado Th1E47cs) e polimorfismos do gene da proteína relacionada ao receptor LDL (LRP) são considerados como fatores de risco para o desenvolvimento da doença.

Objetivos: Analisar a relevância dos polimorfismos $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ da APOE, A/T do -491, G/T do -219 e C/T do LRP, separadamente e em conjunto no desenvolvimento de DA em indivíduos brasileiros.

Metodologia: Realizou-se o estudo em 120 indivíduos com DA provável e em 120 indivíduos controles normais emparelhados por sexo e idade, por meio da análise do DNA genômico amplificado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Resultados: Houve diferença entre os dois grupos quanto à frequência do alelo $\epsilon 4$ da APOE, observado em 31% dos pacientes e 10% dos controles. Indivíduos com dois alelos $\epsilon 4$ apresentaram risco quase três vezes maior de desenvolver a doença ($p=0,002$; OR= 10,68; IC95%=2,33-48,96) do que aqueles que possuíam apenas um alelo ($p=0,001$; OR=3,76; IC95%=2,05-6,89). A presença de um alelo $\epsilon 2$ conferiu um efeito protetor ($p=0,025$; OR=0,38; IC95%=0,16-0,91). Na posição -219 do gene APOE, a presença do alelo T mostrou-se associada a maior risco de DA ($p=0,038$; OR=2,09; IC95%=1,03-4,24), enquanto que o alelo G, não conferiu proteção. No entanto, o polimorfismo -219 encontra-se em desequilíbrio de ligação com a região codificadora do gene APOE. O genótipo A/A, na posição -491 do gene da APOE e o genótipo C/C, na posição 766 do gene LRP não se mostraram associados a maior risco de DA.

Conclusões: Na população estudada, o alelo $\epsilon 4$ do gene APOE mostrou-se associado a maior risco de DA e o alelo $\epsilon 2$ conferiu efeito protetor contra a doença. Não foi encontrada correlação entre o risco de desenvolvimento de DA e os outros polimorfismos analisados.