

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PCR – RFLP como diagnóstico molecular para Doença de Alzheimer

FREDERICO ROGÉRIO FERREIRA

Aluno de IC

LUIZ RICARDO GOULART FILHO

Orientador

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Uberlândia - MG.
dezembro - 1999.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PCR – RFLP como diagnóstico molecular para
Doença de Alzheimer

FREDERICO ROGÉRIO FERREIRA

LUIZ RICARDO GOULART FILHO

Monografia apresentada à Coordenação do Curso
de Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Uberlândia para obtenção do grau de Bacharel
em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
dezembro de 1999

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PCR – RFLP como diagnóstico molecular para
Doença de Alzheimer

FREDERICO ROGÉRIO FERREIRA

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 16 / 12 / 99

Nota 100,00

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Profª Ana Maria Coelho Carvalho
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

MsC. Waldesse Piragé de Oliveira Junior

MSc. Kleber Simônio Parreira

Uberlândia, 16 de dezembro de 1999

OBRIGADO, em sua essência, guarda o sentido
"estou na *obrigação* de servir..." Assim, agradecer, na verdade é colocar-se
servo. Por isso, meu obrigado a aqueles que de algum modo pode servir...

mas ainda, os sinceros agradecimentos

ao Maurício Machaim
pela disposição e dedicação em dividir o conhecimento,

Juliana Meola,
pela vibração de força e determinação na busca do objetivo,

Ana Cândida,
por estar sempre ao lado nos momentos mais importantes

Adriana Freiras
por dividir os deveres e as alegrias

Kleber Simônio,
pela atenção sincera nos momentos mais oportunos

Waldesse Jr.,
pela credibilidade depositada no trabalho em grupo

Elisângela Rosa
por ensinar os primeiros passos no laboratório

Bárbara Amélia
por mostrar que existe sempre um caminho mais simples e direto...

Cristiane, Kláudia e Mercia,
por fazer de seu trabalho o suporte aos trabalhos de todos

Juliana Alves
pela clareza e disposição em ensinar

Wânia Lima
pelo exemplo de dedicação e comprometimento ao trabalho

Walter Vieira
pelo desprendimento

a 44ª Turma de Ciências Biológicas
por compor juntos o cenário dos 4 anos de um começo

aos amigos ocultos,
que vibram pelo nosso sucesso

a esta universidade
por receber alunos e devolver a sociedade, cidadãos

ao Professor Luiz Ricardo
pelo exemplo de humanismo, acima de qualquer valor

a DEUS,
por fazer de tudo isso, realidade.

dedico este trabalho aos que deixaram o conforto das respostas formuladas e mergulharam no desafio da descoberta, defendendo a verdade acima do orgulho e vaidade.

PCR - RFLP COMO DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DOENÇA DE ALZHEIMER

RESUMO: (INTRODUÇÃO) A doença de Alzheimer (DA) é um tipo de demência caracterizada pela degeneração progressiva e seletiva das populações de neurônios no córtex entorrinal, no hipocampo, nos córtices de associação de ordem superior das regiões temporal, frontal e parietal. Foi descrita em 1907 pelo médico neuropatologista alemão Alois Alzheimer ao demonstrar a presença de placas senis em cérebros de pacientes acometidos de demência senil. O caráter genético começou a ser estudado em 1963 por Lorsson e Sjogren ao verificarem maior frequência em familiares quando comparado a população. Estudos recentes têm demonstrado mutações em três genes: *APP*, *PS1* e *PS2* nos cromossomos 21, 14 e 1 respectivamente. O primeiro fator genético correlacionado à DA foi o gene para apolipoproteína-E (apoE) presente no cromossomo 19. Estudos revelam sua associação com a proteína- β amiloide sugerindo atividade na remoção de placas senis. Especula-se que a apoE também atue no metabolismo e transporte de colesterol no cérebro, por possuir distintos receptores hepáticos de lipoproteínas (receptor LDL e receptor ApoE). Trabalhos tem mostrado que o alelo $\epsilon 4$ é responsável por mais de 50% dos casos de demência do tipo Alzheimer acima de 65 anos, contudo ainda não é plenamente conhecido o mecanismo que envolve a apoE com a DA. O diagnóstico para a DA é diferencial uma vez que só pode ser confirmado por análise histológica de tecido cerebral. Este trabalho propõe-se a otimizar a técnica de PCR-RFLP desenvolvida por Hixon e Vernier, 1990 para diagnóstico molecular para DA, uma vez que as condições de reação conhecidas não se aplicam a todas as situações. (METODOLOGIA) A reação de PCR foi otimizada empregando-se a metodologia proposta por Innis, 1990, na qual são estabelecidos parâmetro para as reações com diferentes concentrações de $MgCl_2$, *primers*, DNA, *Taq*-polimerase, dNTPs e temperaturas de anelamento, desnaturação e extensão. (RESULTADO) Obteve-se melhor condições com 5pmol de cada *primer*, 1.5mM de $MgCl_2$, 1U de *Taq*-polimerase, 100 μ M de dNTPs e 100-200ng de DNA para volume final de 30 μ L. O programa da reação inicia-se a 95°C por 5min, repetindo 35 ciclos de anelamento a 60°C-40s, extensão a 70°C-40s e desnaturação a 94°C-40s. O produto de 244pb é submetido a digestão pela *HhaI* a 37°C-3h. (CONCLUSÃO) Este trabalho mostra boa repetibilidade da metodologia empregada por Hixon assim como a possibilidade de genotipagem empregando gel de poliacrilamida 19:1, 8%, corado por prata, o que dispensa uso de material radioativo e biotina, diminuindo os riscos e custos ao laboratório.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	01
2 - OBJETIVO	04
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
3.1. Manifestações clínicas	05
3.2. Histórico	06
3.3. Patogenia	07
3.4. Vias da Apolipoproteína E e DA	08
3.5. Via secretora da β amilóide	09
3.6. Biologia das Presinilinas	12
3.7. Diagnóstico	14
3.7.1. Demencial e Diferencial	14
3.7.2. Diferencial por biologia molecular	14
3.7.2.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	14
3.7.2.2. Técnica da RFLP	16
3.7.2.3. Detecção por eletroforese	16
3.8. Ética em pesquisas com seres humanos	17
4 - MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Material biológico	20
4.2. Extração de DNA	21
4.3. Otimização da técnica da PCR	21
4.4. Teste genético e detecção	22
4.4.1. Amplificação do gene	22
4.4.2. Restrição Enzimática	23
4.4.3. Detecção em Gel de Agarose	24
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6 - CONCLUSÃO	29
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
8 - ANEXO	34

Introdução

A fusão de dois ramos da ciência, psicologia e neurologia gerou uma nova linha do conhecimento, a neuropsicologia, que pode ser definida como análise sistemática dos distúrbios de comportamento que se seguem a alterações da atividade normal do cérebro causadas por doença, lesão ou modificações experimentais, ou também como estudo da relação cérebro-comportamento. Contudo, esse termo foi utilizado pela primeira vez em 1913 iniciando o desenvolvimento desta ciência juntamente com os trabalhos de Hebb em 1949. (Engelhardt *et al.*, 1995a,b,c).

Os principais fatores que propiciaram a evolução da neuropsicologia foram a integração das neurociências com as ciências do comportamento, a introdução de técnicas de observação do cérebro e/ou sua atividade (TC, RM, PE, PET, etc.) e avanços na neurocirurgia, com o objetivo de possibilitar a restauração de funções psíquicas superiores comprometidas por lesão cerebral. Atualmente, as técnicas de biologia molecular oferecem novas ferramentas que possibilitam desvendar as origens de alguns distúrbios cerebrais, bem como do funcionamento normal que não seria possível pelos métodos usualmente empregados (Engelhardt *et al.*, 1995c).

Dentre os distúrbios neurológicos, a demência é classificada segundo Organização Mundial da Saúde - OMS em 1993, na sua 10ª revisão, como: “é uma síndrome decorrente de uma doença cerebral, usualmente de natureza crônica ou progressiva, na qual há perturbação de múltiplas funções corticais superiores incluindo memória, pensamento, orientação, compreensão, cálculo, capacidade de aprendizagem, linguagem e julgamento, sem que, contudo haja obnubilação de consciência”. Ocasionalmente, o comprometimento de funções cognitivas são acompanhados por deterioração no controle emocional, motivação,

comportamento social, sendo responsável por parte dos casos de depressão em idosos. Esta síndrome ocorre na doença de Alzheimer, na doença cerebrovascular e em outras condições que, primariamente ou secundariamente, afetam o cérebro.

A Doença de Alzheimer (DA) é apontada como responsável por 50 a 60% dos casos, sendo seguida pelas demências vasculares (25-30%) e pelas demências reversíveis (5-10%) – (Katzman, 1986, Franglioni *et al*, 1991; Sayeg, 1991; Hachinski, 1992; Bachman *et al.*, 1993; Breitner *et al.*, 1993; Drachman, 1993; Fraga Jr., 1996; Carraro, 1996; Corrêa, 1996) (Figura 1).

Distribuição dos Tipos de Demência

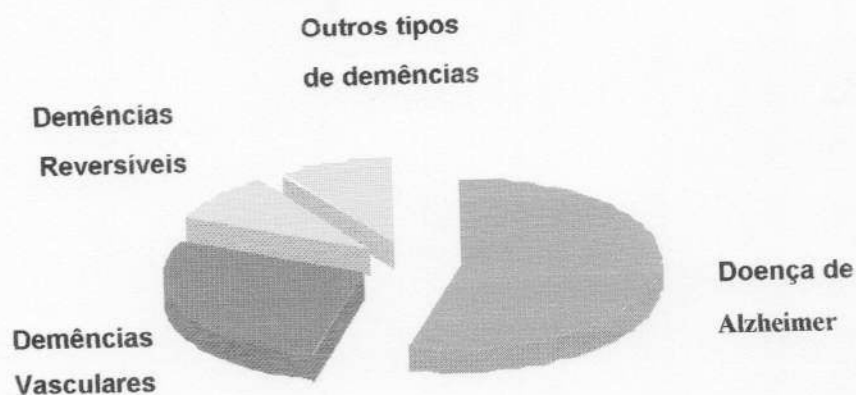


Figura 1. Distribuição de frequência dos tipos de demência.

Um dos reflexos da sociedade moderna é o aumento da longevidade decorrente da melhoria das condições de suporte a vida oferecida pela medicina, fato este que vem provocando um crescimento progressivo da porcentagem de idosos em relação ao restante da população. Contudo, esse fenômeno reflete de forma negativa em relação a doença, uma vez que sua incidência aumenta como o aumento da idade. Por volta dos 65 anos, ela acomete 5 a 10% dos idosos e aos 85 anos, aproximadamente 47% (Laks *et al.*, 1995; Katzman, 1986; Bachman *et al.*, 1993; Kokmen *et al.*, 1993; Carraro, 1996; Corrêa, 1996).

O aumento progressivo dos casos de demência decorrente do crescimento da população de idosos não é um fenômeno restrito aos países desenvolvidos, uma vez que, a partir de 1960, mais da metade da população mundial acima de 65 anos vive nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. A previsão para o ano 2000 é que ocorrerá um aumento de 120% da população mundial, enquanto que a população acima de 60 anos aumentará em 236%, merecendo atenção especial no que diz respeito a esta crescente parcela da população (Laks *et al.*, 1995; Kalache and Veras, 1987; Veras *et al.*, 1987; Ramos *et al.*, 1987; Veras *et al.*, 1990; Veras, 1988; OPS, 1994; Gorzoni and Lima, 1995).

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1995), revelam que a tendência mundial de envelhecimento populacional é acentuada no Brasil, uma vez que a população acima de 60 anos, em 1950, saltou de 2 milhões (4,8% da população brasileira) para quase 11 milhões em 1991, (7,3% da população); e está prevista ser de 27 milhões em 2025 (12,1% da população). Estudos mostram que de 11 a 15% desta crescente parcela da população apresenta um declínio intelectual anormal, de grau moderado a grave o que torna a demência um problema de saúde pública de grande importância (Katzman, 1986; Fraga Jr., 1996; Carraro, 1996; Ramos *et al.*, 1987, OPS., 1994; Corrêa, 1996).

Quanto ao aspecto sócio-econômico, dados estatísticos demonstram que nos EUA, em 1986 foram gastos de 25 a 40 bilhões de dólares, e estimativas prevêem um gasto de 720 bilhões de dólares em 2030. Atualmente, a DA custa a cada ano à sociedade norte-americana cerca de 80 bilhões de dólares. Apesar de não haver dados concretos sobre a doença no Brasil, é possível estimar seu elevado custo para o nosso país (Sayeg, 1991).

Os aspectos econômicos tornam-se relevante se comparado ao efeito social da DA sobre o paciente e familiares, uma vez que a doença já no estado de moderado a avançado compromete as relações sociais, freqüentemente acompanhado de depressão, perda das capacidades motoras e de julgamento.

Deste modo, os recursos da medicina moderna que levam a maior longevidade devem se somar a estudos que garantam a preservação das funções neurológicas, para que realmente represente ganho não somente no tempo, mas também na qualidade de vida da crescente população de idosos.

Atualmente, as técnicas de biologia molecular ganham espaço tanto na compreensão das vias de desenvolvimento das doenças neurológicas, como também, se associam ao tratamento convencional de modo a obter resultados mais expressivos no tratamento.

2 – Objetivo

O presente trabalho teve por objetivo padronizar a técnica de PCR associada a RFLP para detecção do alelo $\epsilon 4$ determinado como fator de risco para Doença de Alzheimer na forma familiar tardia e realizar um estudo preliminar das frequências alélicas e genotípica para Apolipoproteína E.

3 - Revisão Bibliográfica

3.1. Manifestações clínicas

No início, a DA é insidiosa e sutil, com alterações mais observáveis primeiramente na memória para acontecimentos recentes e outros aspectos da atividade mental. Distúrbios emocionais, como depressão, ansiedade ou episódios peculiares ou imprevisíveis de comportamento, podem ser sinais salientes nas fases iniciais. A progressão é em geral lenta e gradativa e, a menos que sobrevenham outras doenças, poderá persistir por 10 anos, ou mais (Beal *et al.*, 1991).

A seguir aparecem sintomas de disfunção cortical pre-frontal tais como dificuldade no raciocínio abstrato, no planejamento e julgamento. O cálculo e as habilidades visio-espaciais apresentam-se já com grande comprometimento.

Nos estágios intermediários inicia-se a afasia fluente, com dificuldade em nomear objetos e escolher a palavra correta para expressar a idéia. A afasia é progressiva evoluindo para distúrbio afásico sensorial.

A apraxia aparece nos estágios intermediário e grave da doença impedindo o paciente de prover suas necessidades básicas pessoais como cuidados de higiene pessoal, alimentação e no vestir (Laks *et al.*, 1995). Apesar de preservar sua fala, seus desempenhos motores e suas boas maneiras sociais, os pacientes de Alzheimer não são capazes de manter o emprego e mais cedo ou mais tarde tornam-se sem condições de lidar com as atividades cotidianas. É comum uma perda do relacionamento afetivo, que os parentes podem descrever como superficialidade ou falta de interesse. Decisões insensatas com relação à

propriedade ou aos investimentos são feitas com frequência durante esses estágios iniciais da doença, especialmente se um membro da família protetor não está disponível para intervir. Comumente ocorrem sinais de mau julgamento e uma deterioração dos relacionamentos sociais (Damasio, 1992).

O estágio final é marcado por afasia e apraxia totais, espasticidade e incontinência esfinteriana. Essa seqüência segue a descrição por Reisberg para elaborar sua Escala de Deterioração Global (GDS), no qual o estágio 1 não apresenta declínio cognitivo, no estágio 2 o declínio cognitivo é leve, e os estágios de 3 a 7 são definidos, respectivamente, como apresentando declínio leve, moderado, moderadamente grave, grave e muito grave (Laks *et al.*, 1995).

3.2. Histórico

O conceito de demência começou a ser desenvolvido no século passado com os trabalhos de Esquirol em 1816 ao diferenciar demência de idiotia ou deficiência mental congênita. Em 1838, utilizou-se o termo demência senil pela primeira vez. Kraepelin em 1896, estudando cérebro de indivíduos demenciados, verificou que alguns apresentavam infartos devido a aterosclerose, outros apenas atrofia e em outros havia associação de ambas as alterações (Sayeg, 1991).

Os estudos de Alois Alzheimer, médico neuropatologista alemão, em 1907 demonstraram que certas lesões não poderiam ser imputadas somente à aterosclerose, constatando a presença de placas senis em cérebros de pacientes acometidos de demência senil. Descreveu esse tipo de demência, de apresentação precoce, em uma mulher com 55 anos que há mais de 4 apresentava quadro demencial. Encontrou em seu cérebro, além das conhecidas placas senis, um tipo de lesão descrita por ele como degeneração neurofibrilar (Sayeg, 1991).

O caráter genético da DA começou a ser questionado pelos autores Lorsson e Sjogren em 1963, ao observarem que a frequência de casos semelhantes era maior nos familiares de um paciente com demência senil quando comparado com a frequência na população (Sayeg, 1991). Este evento, norteou os estudos de Strittmatter e outros, levando-os a demonstrar em 1993 que o genótipo para apolipoproteína-E (ApoE) estava relacionado com o risco de desenvolvimento de DA sendo o primeiro fator genético descrito para doença (Smith *et al.*, 1998).

Atualmente, sabe-se que a etiologia desta doença é bastante complexa, sendo descritos cinco diferentes loci gênicos que lhe conferem suscetibilidade hereditária nas formas precoce, primeiros sintomas entre 35 e 55 anos, e tardia com primeiros sintomas entre 55 e 65 anos. A proteína β -amilóide tem sido relacionada à forma precoce da doença com mutação no cromossomo 21, juntamente com as proteínas presinilina 1 e presinilina 2 nos cromossomos 14 e 1, respectivamente. Deleção no gene para enzima conversora da angiotensina – dipetidil carboxipeptidase (DPC1) e o alelo ϵ 4 da apolipoproteína E incrementam o risco de desenvolvimento da DA na forma tardia. Este último, seria responsável por mais de 50% dos casos tardios, isto é, em paciente acima de 65 anos. As segregações para todas as formas, precoces ou tardias, demonstram que DA é uma doença autossômica dominante (Sherrington *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 1995; Gustafson *et al.*, 1998; Morelli *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998; Kehoe *et al.*, 1999).

3.3. Patogenia

A DA é causada por uma degeneração progressiva e seletiva das populações de neurônio no córtex entorrinal, no hipocampo, nos córtices de associação de ordem superior das regiões temporal, frontal e parietal, e em alguns núcleos subcorticais no prosencéfalo basal (núcleos septais e núcleo basal) e tronco cerebral (*locus cerúleo*). A lesão neuronal e a perda associada da densidade simpática incapacitam várias tramas neuronais essenciais para o aprendizado e recuperação de memórias (Carraro, 1996). Por si, o componente cortical da lesão explicaria os efeitos proeminentes da memória nos pacientes de Alzheimer. Além disso, a lesão aos neurônios colinérgicos no prosencéfalo basal resulta numa perda da liberação de acetilcolina no córtex cerebral, enquanto a lesão no *locus cerúleo* do tronco cerebral impede a liberação de noradrenalina para o córtex cerebral (Carraro, 1996). Histologicamente, os neurônios enfermos apresentam emaranhados neurofibrilares citoplasmáticos compostos de filamentos helicoidais pareados visíveis com corantes como vermelho Congo e tioflavina (Carraro, 1996) (Figura 2).

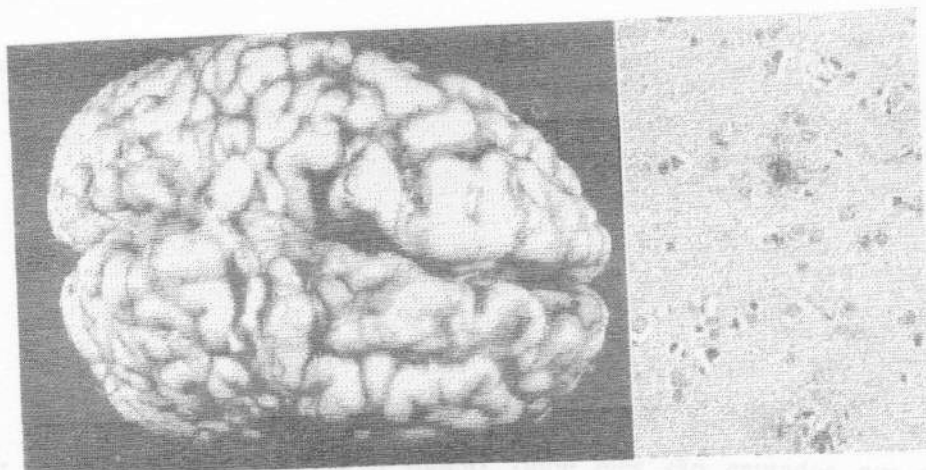


Figura 2.

As duas imagens mostram atrofia primária difusa em Doença de Alzheimer e cortex cerebral com placa senis. As áreas atrofiadas são mais acentuadas nos lóbulos frontal e temporal.

A alteração estrutural mais proeminente consiste em placas amilóides contendo fragmentos neuronais degenerados, todas circundando um pequeno núcleo denso de material amilóide, contudo estas placas neuríticas estão presentes nos cérebros de pessoas idosas normais, diferindo do doente apenas pela quantidade, o que levou alguns investigadores a acreditarem que a demência de Alzheimer poderia apresentar uma forma acelerada de envelhecimento cerebral em vez de ser uma doença convencional (Carraro, 1996).

3.4. Vias da Apolipoproteína E e DA.

As apolipoproteínas são proteínas existentes no sangue e que se ligam aos lipídios atuando como transportadoras de triacilglicerois, fosfolipídios, colesterol e ésteres do colesterol, entre vários órgãos. As apolipoproteínas (“apo” designa a fração de proteína na sua forma livre de lipídios) podem combinar-se com vários tipos de lipídios para formar várias classes de partículas lipoproteicas (quilomicrons) formando os agregados esféricos com lipídios hidrofóbicos no centro e, na superfície, as cadeias laterais proteicas hidrofílicas e os grupos cabeça de lipídios (Nelson and Cox, 1995).

A apoE, apoB-48 e apoB-100 formam os quilomicrons que são as maiores partículas lipoproteicas transportando os triacilglicerois captados nas células epiteliais do intestino delgado, passando através do sistema linfático para chegar até a corrente sanguínea para serem aproveitados pelos tecidos. Os remanescentes dos quilomicrons juntamente com as lipoproteínas desprovidas da maior parte dos seus triacilglicerois, mas ainda contendo

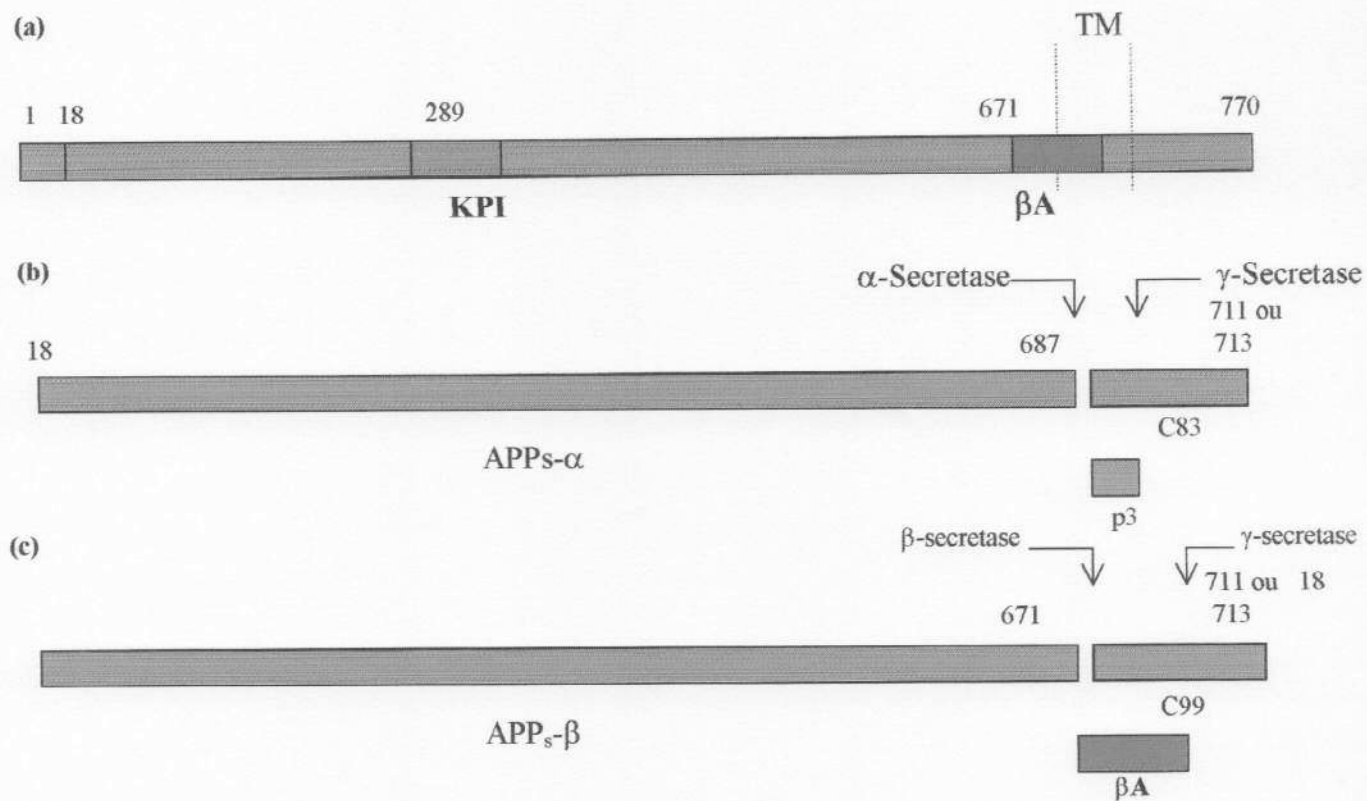


Figura 3.

Diagrama esquemático da proteína precursora da β-amiloide e seus principais derivados metabólicos. (a) A forma maior com 770 aminoácidos. Um peptídeo sinal de 17 resíduos apontado N-terminal. Dois exons *splicing* alternativos de 56 e 19 aminoácidos são inseridos no resíduo 289; o primeiro contém um domínio inibidor da protease serina do tipo Kunitz (KPI). Um simples domínio transmembrana (TM) no aminoácido 700-723 é indicado pelas linhas verticais. O fragmento da proteína β-amiloide inclui 28 resíduos fora 12-14 resíduos do domínio transmembrana. (b) Após o resíduo 687, indica a clivagem proteolítica constitutiva feita pelas proteases designadas α-secretase que possibilita a secreção do segmento maior solúvel do ectodomínio da APP (APP-α), enquanto o fragmento C-terminal fica retido na membrana. O fragmento C83 pode ser clivado pela protease designada γ-secretase no resíduo 711 ou 713 para liberar o peptídeo p3. (c) A proteólise alternativa após o resíduo 671 pela enzima β-secretase que resulta na secreção da molécula truncada APP-β e retenção do fragmento C-terminal com 99 resíduos (C99). O fragmento C99 pode ser clivado pela γ-secretase para liberar o peptídeo βA.

A região C-terminal da βA é heterogênea com peptídeos alternando entre resíduos de peptídeos. O significado desta heterogeneidade começou a ser entendida por estudos imunológicos usando anticorpos que reconhecem seletivamente as formas 40Val e 42Ala da βA. Foi possível demonstrar que a forma 42Ala é a primeira a ser depositada em cérebro de pacientes com DA e Síndrome de Down (Selkoe, 1998).

Estudos de progressão temporal para formação de placas em cérebros de pacientes acometidos pela síndrome, tem demonstrado que o peptídeo βA_{42} pode formar numerosas placas difusas em pacientes com apenas 12 anos de idade, enquanto a forma βA_{40} são depositadas duas décadas depois em pacientes com DA e Síndrome de Down. Estudos bioquímicos mostraram que o peptídeo βA_{42} , com os dois resíduos hidrofóbicos adicionais (isoleucina e alanina), agregam dentro das fibras amilóides mais rapidamente do que os peptídeos da forma βA_{40} (Selkoe, 1998).

3.6. Biologia das presinilinas

Presinilinas (PS1 e PS2) são proteínas de membrana de mamíferos altamente homólogas principalmente localizadas no Retículo Endoplasmático (RE) e Golgi, com função ainda não precisamente determinada. PS1 pode interagir com proteínas de membrana para servir de componente intracelular do complexo de adesão célula-célula. Deleção no gene PS1 em camundongos produz um fenótipo embrionário letal caracterizado pela severa semitogênese desordenada e alterações esqueléticas como no desenvolvimento cerebral seletiva à região frontal (Clark *et al*, 1995)

Presinilinas são expressas com pouca abundância em células nervosas devido a não proteólise do precursor para gerar os fragmentos N- e C-terminal. A proteólise constitutiva cliva o sítio⁵⁴ apontada no extenso *loop* citoplasmático entre o sexto e sétimo dos oito domínios transmembrânicos da PS1 (Figura 4). Os níveis de presinilina NTFs e CTFs (Fragmentos N e C Terminais) e aparentemente podem ser altamente regulados, uma vez que a expressão acentuada de PS1 em células transferidas ou camundongos geneticamente alterados não incrementa os níveis de fragmentos. O excesso da holoproteína, é provavelmente degradado por uma via proteolítica ainda não especificada (Selkoe, 1998).

As formas da presinilina apresentadas na célula pode ser o fragmento PS1 associado a proteínas com tamanho aproximado de 150 kDa formando complexos. Fracionamento subcelulares mostrou que a holoproteína PS1 reside principalmente nas vesículas do RE, onde ocorre a endoproteólise constitutiva formando os fragmentos que são enviados por vesículas ao Golgi para serem estabilizadas. A presinilina 1 e presinilina 2 são diferenciadas por fosforilação citoplasmática.

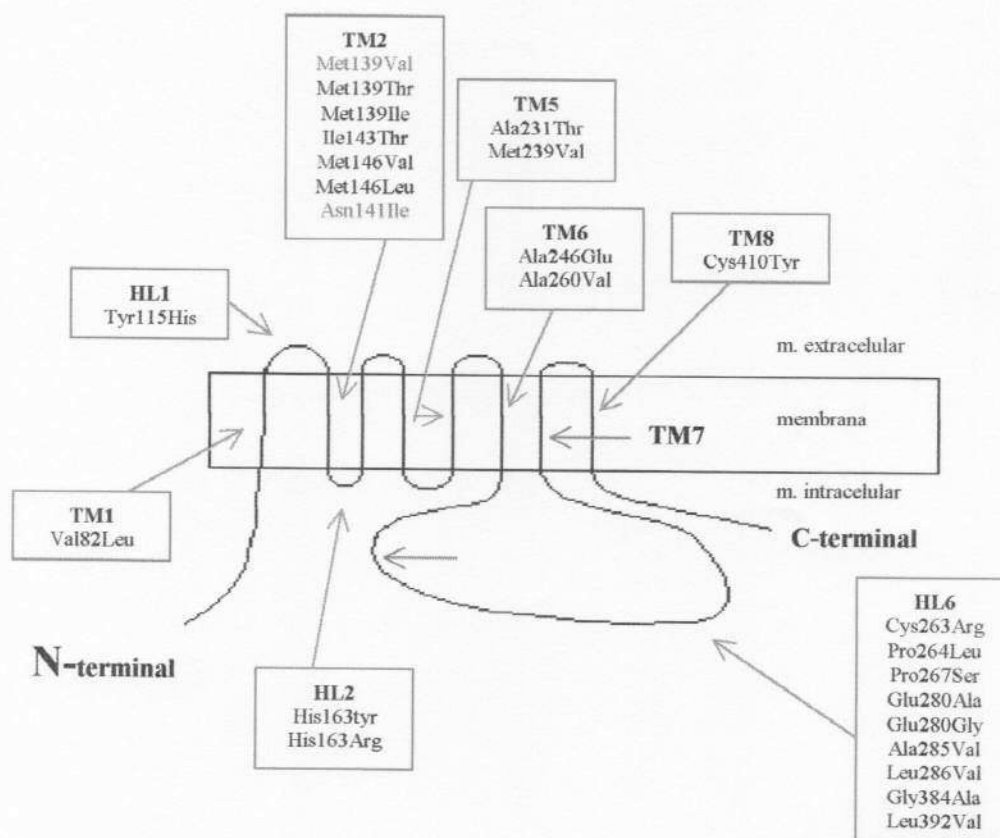


Figura 4.

Diagrama químico da presinilina 1 (PS1), indicando os oito domínios transmembrana. O *loop* entre TM6 e TM7 compreende a maior face citoplasmática. As caixas indicam algumas das 50 mutações identificadas ao longo da PS1 causando DA. As duas mutações indicadas em vermelho (Asn141Ile e Met239Val) são homólogas para proteína PS2 causando DA. A seta em vermelho indica o sítio de clivagem constitutiva na PS1.

Em famílias com Doença de Alzheimer precoce são encontradas PS1 e PS2 com mais de 50 mutações diferentes (Figura 4). Modelos transgênicos e celulares de cada mutação em PS1 e PS2 mostraram aumento seletivo na produção de βA_{42} , podendo refletir diretamente no aumento específico de placas βA_{42} em cérebro de pacientes com DA convencional carregando mutações na PS1. Deste modo, a PS1 passou a ser apontada como atuante em eventos cruciais na via da γ -secretase ligando a DA a mutações seletivas por promover um aumento na formação do resíduo βA_{42} através da clivagem da PS1 pela γ -secretase (Selkoe, 1998).

3.7. Diagnóstico

3.7.1. Demencial e Diferencial

O diagnóstico demencial deve ser iniciado verificando se existe, em verdade, um declínio nas capacidades cognitivas e comportamentais indicativas de doença neurológica adjacente, pois muitos indivíduos idosos normais sentem impropriamente que suas capacidades mentais estão diminuindo. Esquecimento, especialmente de nomes próprios, é comum em qualquer idade da vida, contudo o esquecimento benigno não é acompanhado nem por amnésia para eventos sociais e pessoas recentes nem pelo comprometimento de julgamento e tomada de decisão. Um histórico e entrevista para investigação, junto com um exame neurológico normal, podem excluir rapidamente a possibilidade de demência. Em adição, testes breves como o *Minimal Status Examination* ou escala de *Blessed* oferecem medidas simples de capacidade psicológica que podem ser utilizadas para reforçar a confiança do paciente em questão (Damasio, 1992).

O diagnóstico diferencial é necessário uma vez que existem mais de 50 possíveis causas de demência, porém muitas são raras e a mais comum, a doença de Alzheimer, tem um perfil bastante distinto. Não obstante, apenas a análise histológica do tecido cerebral na necropsia oferece uma confirmação absoluta desta doença, de maneira que o diagnóstico clínico permanece sendo de exclusão.

3.7.2. Diferencial por Biologia Molecular

3.7.2.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase é uma nova ferramenta para biologia molecular com grande efeito nas descobertas associadas a restrição enzimática e *Southern blot*. Por meio dela é possível detectar e amplificar fragmentos da complexa seqüência do DNA genômico, para então serem analisados qualitativamente (Innis *et al*, 1990). Kary Mullis, em meados de 1985, foi o responsável por essa invenção, que lhe conferiu Nobel de medicina em 1993, oito anos após (Abrão *et al.*, 1994).

O desenvolvimento dessa técnica foi possível devido as propriedades da enzima *Taq*-DNA polimerase obtida da bactéria termófila *Thermus aquaticus*, primeiramente isolada em 1976. Quando foi descoberta, observou-se característica particular – cataliza a polimerização de dNTPs em altas temperaturas - contudo não foi previsto seu impacto para a biologia molecular. Sua vantagem é que enzimas extraídas de organismos mesófilos (37°C) apresentam contaminantes que não são ativos na temperatura ótima da *taq*-polimerase.

O gene da *taq* é de 2499 nucleotídeos e 832 códonos para aminoácidos. Possui massa teórica de 93.900 Da e em gel, massa de 97.300 Da devido a formação de agregados. A unidade é definida pela incorporação de 10nmol de dTTP radioativo a 80°C por 30 min. Estudos de fidelidade da *taq* mostram taxa de incorporação errada de $1,1 \times 10^{-4}$ e $2,5 \times 10^{-5}$ por fragmentos mutantes. Trocas T-C são mais freqüentes do que outros erros de incorporação.

Atividade ótima a 75-80°C, na qual incorpora em média 150 nucleotídios por segundo por molécula de enzima. A incorporação de nucleotídios diminui em temperaturas superior a 90°C. Perde atividade se submetida a 5min a 92,5°C e 6min a 97,5°C respectivamente.

A atividade enzimática depende do cátion bivalente $MgCl_2$ numa concentração ótima de 2mM. A taxa máxima de polimerização é obtida com 0.7-0.8 mM de dNTPs. A concentração de cátion monovalente exerce efeito sobre a atividade da enzima, de modo que a concentração ótima é de 50mM KCl, sendo inibida em concentrações superiores a 75mM de KCl. Outros íons como NaCl, NH_4Cl e NH_4 não substituem o KCl.

A reação de PCR combina as propriedades da *Taq* polimerase para síntese *in vitro* de DNA de modo a obter sinal amplificado de um segmento do DNA genômico. Fundamentalmente, a execução da PCR é simples e consiste na mistura de: amostra biológica (DNA alvo), dois pequenos fragmentos de DNAs sintéticos (iniciadores ou *primers*, específicos para o gene de interesse) e enzima *Taq*-DNA polimerase. O aquecimento e resfriamento desta mistura permite a desnaturação da fita dupla do DNA, e ligação dos iniciadores (*primers*) para que a enzima atue estendendo a fita simples, tornando-a fita dupla de DNA novamente (Innis *et al*, 1990). Os passos da reação seguem a ordem:

- a – Desnaturação, 90-94°C; separação da fita dupla inicial em duas fitas simples,
- b – Anelamento, 50-65°C; ligação dos *primers* na região específica do gene,
- c – Extensão, 70-72°C; temperatura na qual a *Taq*-DNA polimerase é ativa, formando nova fita de DNA a partir de uma fita simples molde,
- d – Repetição do ciclo de 25-45x, o que oferece multiplicação exponencial do segmento alvo, podendo chegar até 10^6 cópias.

Contudo, um simples protocolo não é apropriado para todas situações, tornando necessário a realização de otimização (Innis *et al.*, 1990).

A técnica da PCR para detecção de mutações no gene que codifica a ApoE foi empregada por Strittmatte *et al.* em 1993, ao descrever 3 alelomorfos distintos: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$, e maior susceptibilidade aos indivíduos portador de duplo $\epsilon 4$ ($\epsilon 4/\epsilon 4$) de desenvolver Alzheimer (Smith *et al.*, 1998).

3.7.2.2. Técnica da RFLP

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) entende-se, em uma tradução livre do termo, por polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por corte da fita dupla de DNA. Esta técnica foi empregada primeiramente há 20 anos em estudos de detecção de mutações em DNA de vírus, sendo posteriormente bastante utilizada para estudos de polimorfismo em DNA de diferentes organismos.

Esta técnica se baseia em enzimas de restrição, que possuem a capacidade de reconhecer seqüências específicas do DNA (sítios de restrição com 4 a 8 pares de base) onde realiza o corte.

O polimorfismo pode ser determinado pela presença ou ausência de sítio de restrição para a enzima ou pelas diferentes posições destes sítios geradas por mutação de ponto, inserção, deleção, translocação ou inversão, o que pode variar de indivíduo para indivíduo. O polimorfismo devido a essas fontes de variabilidade, é demonstrado pelo padrão de bandas formadas em gel, conforme os tamanhos dos fragmentos produzidos pela enzima de restrição.

3.7.2.3. Detecção por Eletroforese

O termo eletroforese é geralmente aplicado para o movimento de pequenos íons e moléculas carregadas em soluções sobre influência de um campo elétrico. A taxa de migração depende do tamanho e forma das moléculas, de sua carga, da corrente aplicada e resistência do meio. Em biologia molecular, os meios mais comumente empregados são compostos por agarose, acrilamida a mistura agarose e acrilamida.

A eletroforese em géis de agarose, acrilamida ou composição de agarose-acrilamida é comumente aplicada para separação de fita dupla de DNA em pH neutro. Nesta condição, o DNA apresenta cargas negativas, migrando do catodo (-) para o anodo (+) da cuba e sua

mobilidade depende dos comprimento dos fragmentos e não da composição ou ordem das bases (Ferreira and Grattapaglia, 1995).

Géis de agarose apresentam sensibilidade para análise de fragmentos próximos a 70 pares de base, em géis de agarose a 3%, até 800 000 pb em géis de agarose a 0.1%. Geis de poliacrilamida são feitos de acrilamida e *N,N'*-methylene bisacrylamida (bisacrilamida) em mistura polimerizada pela adição de catalisador químico. O potencial de resolução destes géis são determinadas pela concentração de acrilamida e proporção de bisacrilamida adicionada como cruzamentos ligados. A malha formada tem capacidade de separação de fragmentos com menos de 0,5% de diferença de tamanho e detecção de quantidades menores que nanogramas de ácidos nucléicos, de modo que, géis de poliacrilamida são indicados para fragmentos entre 6pb (20% de acrilamida) à 1000pb (3% de acrilamida) (Ferreira and Gattapaglia, 1995).

As bandas formadas no gel podem ser visualizadas por meio de brometo de etídio acrescentado ao gel. Este reagente interpola-se entre as bases DNA no gel e emite luz visível quando exposto a comprimento de ondas do ultravioleta, marcando a posição das banda.

3.8. Ética em pesquisa com seres humanos

A necessidade de progresso da ciência e tecnologia no campo da saúde promoveu o emprego do Método Científico em pesquisas com seres humanos, contudo o descomprometimento com princípios ideológicos, próprio da ciência, pode conduzi-la a caminhos diversos: a serviço da humanidade com fins nobres ou com fins prejudiciais. Deste modo, vários organismos internacionais vêm se preocupando com a questão da observância de princípios éticos no desenvolvimento da pesquisa em seres humanos, com intuito de preservar o princípio da sacralidade da vida, e impedir a repetição de atrocidades vivenciadas no passado recente (Oliveira, 1997).

A pesquisa em saúde deve ter como fim último o estabelecimento de procedimentos, métodos e produtos para a prevenção de doenças, a recuperação ou a reabilitação da saúde, podendo ser de cunho preventivo, diagnóstico e/ou terapêutico, sendo contudo movidas pelo princípio da beneficência, objetivando aumentar o bem-estar da ser humano (Fortes, 1998).

Este princípio ético começou a ser discutido semente após os depoimentos obtidos nos julgamentos dos médicos nazistas acusados por crimes atrozes contra prisioneiros utilizados em pesquisas na Segunda Guerra Mundial (Oliveira, 1997; Fortes, 1998).

As revelações trazidas com esses julgamentos fez surgir o primeiro documento de repercussão internacional em 1947, denominado de Código de Nuremberg, o qual continha dez regras emitidas pelo Tribunal Militar para orientar pesquisas em humanos. O documento afirma que toda experiência deve ter como objetivo o bem da sociedade tendo em vista resultados práticos que não possam ser obtidos por outros meios. Evoca a condição autônoma das pessoas que se prestam a pesquisa, enfatizando a essencialidade da informação e do recolhimento do consentimento voluntário (Oliveira, 1997; Fortes, 1998).

Em 1964, a Associação Médica Mundial aprova e promulga a Declaração de Helsinque, que tornou-se o documento fundamental no campo da ética em pesquisas biomédicas. Sua contribuição fundamental foi devido a introdução do consentimento informativo, o que confere autonomia do ser humano (Oliveira, 1997). Este documento sofreu sucessivas revisões, mais recentemente, em Somerset West/África do Sul (1996), reforça a necessidade de que as pesquisas sejam analisadas, em sua fase de projeto, por comissões ou comitês independentes que avaliem sua conformidade com as diretrizes éticas (Fortes, 1998).

Em 1993, o Conselho para as Organizações Internacionais das Ciências Médicas (CIOMS), juntamente com a Organização Mundial da Saúde (OMS), publica as Normas Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Seres Humanos. O texto conta com quinze diretrizes, e atenta para as peculiaridades das diferentes realidades existentes nos países em desenvolvimento. Reforça o princípio da participação autônoma, da privacidade, da confidencialidade e sigilo dos dados e a necessidade dos comitês de ética em pesquisa (Oliveira, 1997; Fortes, 1998).

No Brasil, a preocupação de alertar e regulamentar as atividades de pesquisa desenvolvidas pelos profissionais de saúde teve início em 1988, quando o Conselho Nacional de Saúde (CNS) emitiu a Resolução nº 01/88, aprovando normas de pesquisas para a área de saúde. Para a época, esta resolução foi considerada um importante avanço, pois estabeleceu níveis de risco e forneceu orientações normativas para uma boa conduta ética. Sete anos após, a Comissão Internacional de Ciência e Tecnologia (CICT) e o CNS atualizaram a resolução em seus conceitos de bioética e restauraram possíveis lacunas geradas pelo desenvolvimento científico (Oliveira, 1997; Fortes, 1998).

As novas normas publicadas na Resolução de 196/96 foram fruto de uma ampla consulta à comunidade, aos sujeitos da pesquisa e aos meios científicos. Procurou abranger representantes das áreas temáticas e específicas tais como: reprodução humana, genética, pesquisas envolvendo populações indígenas, equipamento e dispositivos para a saúde, fármacos e medicamentos. Sua importância está em estabelecer a obrigatoriedade da criação

de Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em toda instituição que realiza pesquisa, bem como vários aspectos da implantação dos comitês.

O presente trabalho buscar no método científico instrumentalização que contribua com novas pesquisas, prevenção e tratamento dos pacientes de Alzheimer, estando consciente de que seus métodos de investigação não tragam nenhum tipo de desconforto que firam os princípios éticos estabelecidos pela resolução 196/96. Os métodos empregados tendem a observar os direitos, riscos e benefícios do paciente, bem como sua autonomia em participar da pesquisa conforme descritos adiante.

4 - Material e Métodos

4.1. Material Biológico

Para este trabalho foram utilizadas aliquotas de DNA cedidas pelo laboratório BioGenetics Tecnologia Molecular LTDA proveniente de exames de rotina realizados em pacientes sadios para DA de todas as regiões do Brasil. As amostras não foram identificadas. Como as aliquotas foram retiradas após a etapa de extração do DNA, este procedimento não ocasionará em desconforto extra ao paciente, uma vez que não passa pela etapa de coleta de sangue, o que exigiria punção de sangue periférico.

Amostras de sangue provenientes de idosos diagnosticados para DA foram colhidas pelo acadêmico do Curso de Medicina Êmerson Nunes Costa, sob orientação do Prof. Dr. Carlos Henrique Alves de Rezende. As colheitas somente foram realizadas mediante consentimento do idoso e responsável mais próximo, por meio do termo de consentimento (anexo I) no qual consta informações sobre riscos, desconforto (ocasionado pela punção do sangue periférico), importância da pesquisa, benefícios ao idoso e seus direitos. O idoso também foi informado que pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo próprio. Foram colhidas amostras de cinco idosos com possível demência do tipo Alzheimer, segundo os critérios do NINCDS-ADRA.

4.2. Extração de DNA

De cada paciente foram coletados 15 mL de sangue em tubos com anticoagulante, e armazenados a 4°C por 2 h, tempo suficiente para formação da camada de leucócito. Removeu-se de 100 a 500 µL dessa camada, e depositou-se em microtubos de 2 mL juntamente com mesmo volume de tampão de lise (20mM Tris-HCl em pH 7.5, 640mM sacarose, 10mM de MgCl₂ e 4% de Triton X-100). Os tubos foram agitados suavemente e incubados em gelo por 5 a 10 min. Centrifugados a 4000xg por 1 min e descartado o sobrenadante. O *pellet* (sedimento) foi lavado por ressuspensão em 500µL de tampão de lise gelado 2x diluído, incubado em gelo por 5 a 10 min, e centrifugado a 4000xg por 1 min. A lavagem foi repetida 2 a 3 vezes para que o *pellet* ficasse livre de hemoglobina (branco-palha). Esse passo foi repetido utilizando-se TE (10mM Tris, 1mM EDTA; pH 8.0). Em seguida, foi adicionado 200µL do tampão de extração, para ressuspender completamente o *pellet* incubando-o a 55°C por 1 hora. O DNA foi precipitado com 100µL do tampão de precipitação, agitando-se suavemente por 30min. Para concluir a precipitação, separou-se o DNA de impurezas adicionado-se 300µL de isopropanol e incubando em gelo por 10min. O sobrenadante foi descartado após centrifugação a 13000rpm por 4min. Em seguida, o *pellet* foi lavado 2 vezes com etanol 70%. O DNA foi diluído em TE, conforme o seu tamanho. *Pellets* grandes são normalmente diluídos com 300µL de tampão, e *pellets* pequenos com cerca de 200µL, para uma concentração final do DNA de 100 a 200ng/µL.

4.3. Otimização da Técnica de PCR

Apesar do uso da técnica de PCR ser bastante utilizada para o estudos de polimorfismo no gene da apoE, foi necessário realizar a otimização da técnica, uma vez que variáveis como, modelo de termociclador, fornecedor dos reagentes, tipo de extração do DNA, entre outros, podem interferir no sucesso da reação (Innis *et al*, 1990). A reação foi otimizada por meio da combinação de diferentes concentrações dos reagente. Combinações entre as concentrações de taq-DNA polimerase (0,5 U e 1 U), MgCl₂ (1,5 mMol, 2 mMol e 2,5 mMol), *primer* (5 pmol e 10 pmol), efetuando-se as possíveis combinações entre cada concentração e temperatura de anelamento (58 e 60°C) foram realizadas conforme tabela I. Os

produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e corado com Brometo de Etídio.

Tabela I. Condições de Reação para Otimização.

Condição	Temperatura de Anelamento	Unidades de DNA polimerase	Picomols de cada primer (pmol)	Concentração de MgCl ₂ (mMol)
1	58 °C	0,5 unit	5	1,5
2				2
3				2,5
4			10	1,5
5				2
6				2,5
7		1 unit	5	1,5
8				2
9				2,5
10			10	1,5
11				2
12				2,5
13	60 °C	0,5 unit	5	1,5
14				2
15				2,5
16			10	1,5
17				2
18				2,5
19		1 unit	5	1,5
20				2
21				2,5
22			10	1,5
23				2
24				2,5

4.4. Teste Genético e Detecção

4.4.1. Amplificação do gene

Para identificação do polimorfismo no gene para apoE, foi utilizado o par de *primers*: F4 (5'- ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC - 3') e F6 (5'- TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A - 3'), descritos por Hixon (Hixon and Vernier, 1990) que resulta na amplificação do fragmento alvo de 244 pares de bases (Figura 5).

Cada reação conteve DNA da amostra, 200µmol de dNTPs (adenina, guanina, citosina e timina) e tampão da enzima 1(x), num volume final de 30µL. A concentração dos demais reagentes (*primer* e taq-polimerase) foram definidas conforme o resultado da otimização. As condições de reação no termociclador foram: 94°C por 40s para desnaturação, seguida por temperatura de anelamento de 58°C ou 60°C (conforme otimização) por 1 min e

extensão a 72°C por 40s. O termociclador utilizado foi da marca MJ Research e modelo PCT-150 para 16 tubos de 500µL.

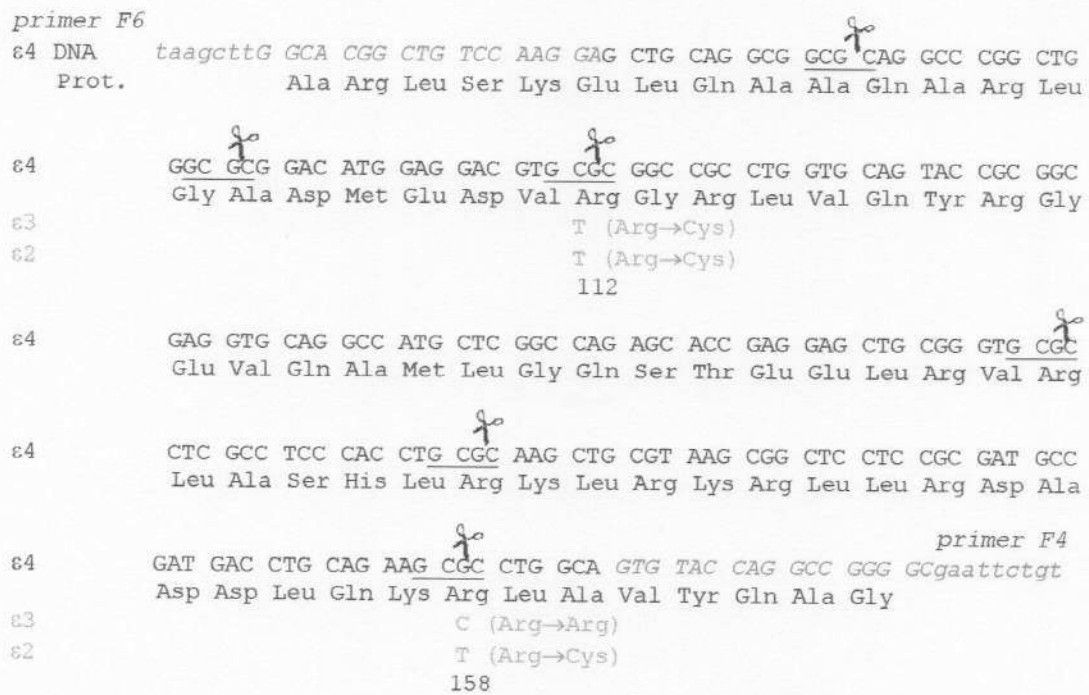


Figura 5. Sequência do fragmento do gene para ApoE que confere polimorfismo aos alelos ε2, ε3 e ε4, com os respectivos pontos de mutação e resíduos de aminoácido alterados. As letras sublinhadas representam os sítios de restrição para *Hha* I, contudo somente os sítios 112 e 158 conferem polimorfismo aos alelos. Em azul estão representadas as sequências de *primers*.

4.4.2. Restrição Enzimática

O produto amplificado da PCR foi submetido a digestão pela enzima de restrição *Hha* I. A reação foi realizada tomando-se 20µL do produto amplificado em tubos de 500µL e adicionados 5 µL da mistura de restrição. Esta mistura foi preparada tomando-se 1 unidade de enzima para cada reação, juntamente com tampão da enzima e soroalbumina bovina (BSA) diluída 1x para um volume final de reação de 25 µL. Em seguida, os tubos permaneceram no termociclador a temperatura de 37°C por 4 horas, tempo suficiente para digestão de todos fragmentos.

4.4.3. Detecção em Gel de Poliacrilamida

Os produtos da restrição foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, 49:1 para cuba eletroforética vertical. Os géis foram preparados a partir da mistura de 4,48mL de acrilamida a 30%; 118 μ L de persulfato a 10%; 5,9 μ L de TEMED; 3,36 mL de tampão TBE 5x e 8,96mL de água para completar um volume final de 16,8mL. Esta mistura foi acondicionada entre duas placas de vidro de 150/150/1,5mm para polimerização. Após o período de 30 minutos necessário à polimerização, 10 μ L de cada amostras foi aplicada em mistura com 2 μ L de tampão de carregamento 6x(0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol e 40% sacarose em água). Em seguida foi aplicada corrente de 40mA por 4 h.

Os fragmentos de restrição foram visualizados em gel corado por prata que inicia-se com fixação por ácido acético a 10% por 20min. Lavagem com água 2 vezes por 2min cada. Corado com solução contendo 100mg de nitrato de prata e 150 μ L de formaldeído em 100mL de água por 30min. Em seguida, foi feita a lavagem com água por 10 segundos e revelado com solução gelada contendo 3g de carbonato de sódio, 150 μ L de formaldeído e 50 μ L de sulfato de sódio num volume final de 100mL. O gel foi imerso nessa solução até a visualização das bandas. A reação de coloração foi interrompida com 100mL de ácido acético a 10% e lavado com água por 2min para posterior fixação em papel celofane.

Indivíduos de genótipo $\epsilon 4/\epsilon 4$ apresentaram 3 bandas no gel correspondente a fragmentos do tamanho em pares de base de: 72, 48 e 35. Já os genótipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ apresentaram as bandas de tamanho 72, 48 e 35 (referente ao alelo $\epsilon 4$) e 91pb referente ao alelo $\epsilon 3$. Os indivíduos $\epsilon 2/\epsilon 4$ apresentarão tanto as bandas 72, 48 e 35 ($\epsilon 4$) como a banda de 82pb referente ao alelo $\epsilon 2$. Os genótipos $\epsilon 2/\epsilon 2$ apresentaram somente 2 fragmentos, 91 e 83, enquanto os genótipos $\epsilon 3/\epsilon 3$ apresentaram os fragmentos 91, 48 e 35. Os genótipos $\epsilon 2/\epsilon 3$ foram representados pela combinação dos dois últimos genótipos descritos, apresentando as bandas referente aos tamanhos de 91, 82, 48 e 35 (Figura 6).

pb	$\epsilon 4/\epsilon 4$	$\epsilon 3/\epsilon 4$	$\epsilon 2/\epsilon 4$	$\epsilon 2/\epsilon 2$	$\epsilon 3/3$	$\epsilon 2/\epsilon 3$
91		—	—	—	—	—
83			—	—		—
72	—	—	—			
48	—	—	—		—	—
35	—	—	—		—	—

Figura 6.: Esquema representativo do padrão de bandas esperado para cada genótipo do gene da apoE possível.

5 - Resultados e Discussão

Segundo a otimização desenvolvida neste trabalho, a condição ideal para a amplificação com maior especificidade foi com 1 unidade de *Taq* DNA polimerase Gibco (catálogo número 18038-018), 5pmol de cada *primer*, 1,5mM de $MgCl_2$ e temperatura de anelamento a 60°C (Figura 7).

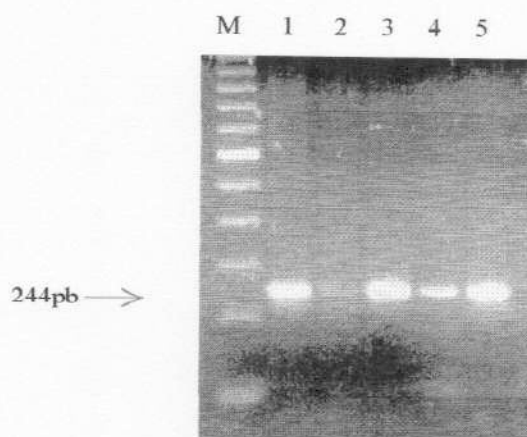


Figura 7.

Produto amplificado do gene ApoE nas condições de 5pMol de cada *primer*, 1,5mM de $MgCl_2$, 1U de *Taq* DNA polimerase a temperatura de anelamento em 60°C. O marcador empregado é de 100pb indicado na linha M. As linhas 1, 2, 3, 4 e 5 são cinco amostras diferentes de DNA indicando que diferenças nas amostras podem influenciar na quantidade e qualidade do produto amplificado.

O gel de agarose mostrou-se ineficiente na definição dos fragmentos da restrição pela enzima HhaI do gene ApoE. Nas linhas 1, 2 e 3 são visíveis as bandas com tamanho correspondente a 91, 48 e 35, contudo as banda 83 e 72 não estão bem definidas, impossibilitando a distinção entre indivíduos $\epsilon 2\epsilon 3$ e $\epsilon 3\epsilon 4$ (Figura 8).

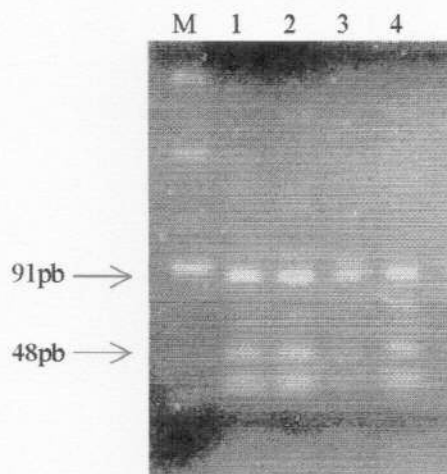


Figura 8.

Gel de agarose a 4% corado com brometo de etídio. Na linha M está o marcador de 100pb. Nas linhas 1, 2, 3 e 4 estão as restrições do gene ApoE pela enzima HhaI, revelando a banda de 91 referente ao alelo $\epsilon 3$ e banda duvidosa (83 ou 72) referente aos alelos $\epsilon 4$ ou $\epsilon 2$, respectivamente.

O gel de poliacrilamida foi otimizado para: poliacrilamida 19:1 a 8% em TBE 1x e eletroforese de 4 horas a 100mV. Nestas condições a separação das bandas é nítida e bem definida, revelando as bandas de 91, 83 e 72 coradas por nitrato de prata (Figura 9).

O fragmento do gene apoE amplificado de 244pb possui até seis sítios de reconhecimento para a enzima HhaI (GCGC) onde ocorre a clivagem durante a restrição, sendo 2 com polimorfismo que diferencia os alelos e 4 sítios monomórficos. A presença dos sítios monomórficos resulta na formação de três fragmentos indiferenciados de 31, 17 e 18pb, de modo que os fragmentos de genotipagem são curtos e com pouca diferença de tamanho entre si, isto é, a diferença entre o fragmento 91($\epsilon 3$) e 83($\epsilon 2$) é de 8pb e o fragmento 83($\epsilon 2$) para 72($\epsilon 4$) é de 11pb. Desta forma, a separação dos fragmentos para genotipagem exige géis de maior resolução.

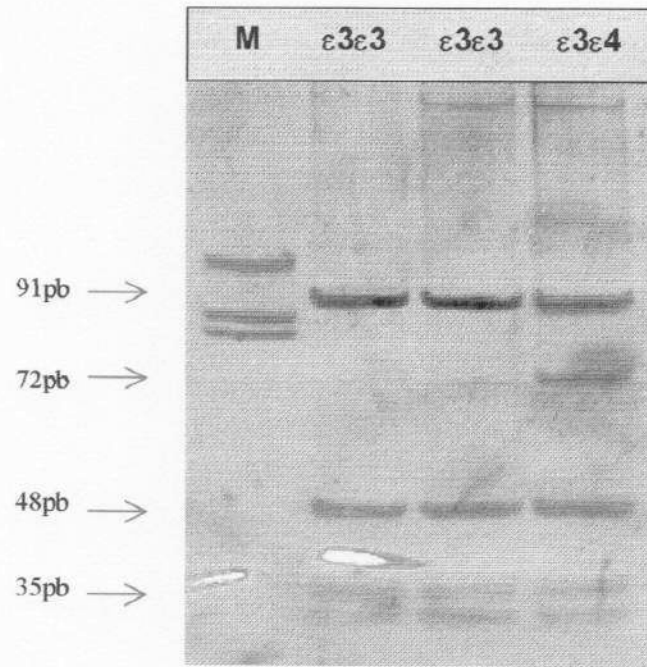


Figura 9

Gel de poliacrilamida 19:1 a 8% corado por prata. Na linha 1 está o marcador e nas demais, os genótipos determinados.

Pelos métodos descrito acima, foi determinado o genótipo de 12 pacientes da população normal de modo que 16% dos pacientes são $\epsilon 2\epsilon 3$; 35% são $\epsilon 3\epsilon 4$ e 50% são $\epsilon 3\epsilon 3$. A frequência alélica encontrada foi de 0,083p/apoE $\epsilon 2$; 0,667p/apoE $\epsilon 3$ e 0,250p/apoE $\epsilon 4$ (Tabela II).

Tabela II. Quadro de frequência alélica e genotípica para o gene ApoE em 12 pacientes da população normal de Uberlândia, MG.

Frequência Genotípica	
$\epsilon 2\epsilon 3$	16%
$\epsilon 3\epsilon 4$	34 %
$\epsilon 3\epsilon 3$	50%
Frequência Alélica	
Apo $\epsilon 2$	0,083p
Apo $\epsilon 3$	0,667q
Apo $\epsilon 4$	0,250z

6 - Conclusão

- A técnica de PCR associada a RFLP mediante corrida em gel de poliacrilamida, mostrou-se eficiente na detecção do fator de risco $\epsilon 4$.
- O reduzido número de amostras, tanto da população normal como de idosos institucionalizados impossibilita o teste de correlação genética do fator de risco $\epsilon 4$ e Doença de Alzheimer, assim como determinação da sua prevalência na população.

7 - Referências Bibliográficas

- Abrão, F.S., Villa, L.L., Carvalho, F.M., Pereira, E.G., Focchi, J. and Abrão, M.S.** (1994). Critérios e conduta terapêutica das infecções pelo papilomavírus no trato genital inferior. *Feminina*. 6-9: 381-388.
- Bachman, D.L., Wolf, P.A., Linn, R.T., Knoefel, J.E., Cobb, J.I., Belanger, A.J., White, L.R. and D'Agostino, R.B.** (1993). Incidence of dementia and probable Alzheimer's disease in a general population: the Framingham study. *Neurolog*. 43: 515-519.
- Beal, M.F., Richardson Jr, E.P. and Martin, J.B.** (1991). Doença degenerativa do sistema nervoso. In: *Tratado de Medicina Interna*. (Wilson, J.P., Isselbacher, K.J., Petersdorf, R.G., Martin, J.B., Fauci, A.S. and Root, R.K. eds) Guanabara Koogan S.A., pp. 13.106 - 13.108.
- Beyreuther, K. and Master, C.L.** (1997). The ins and outs of amyloid- β . *Nature*. 389: 677-678.
- Breitner, J.C.S., Gatz, M., Bergem, A.L.M., Christian, J.C., Mortimer, J.A., McClearn, G.E., Heston, L.L., Welsh, K.A., Anthony, J.C., Folstein, M.F. and Radebaugh, T.S.** (1993). Use of twin cohorts for research in Alzheimer's disease. *Neurology*. 43: 261-267.
- Carraro, S.** (1996). O envelhecimento é sinônimo de deterioração mental?. *Tópicos em Geriatria*. 2: 10-14.
- Clark, R.F., Hutton, M., Fuldner, R.A., Froelich, S., Karran, E., Talbot, C., Crook, R., Lendon, C., Prihar, G., He, C., Korenblat, K., Martinez, A., Wragg, M., Busfield, F., Behrens, M.I., Myers, A., Norton, J., Morris, J., Mehta, N., Pearson, C., Lincoln, S., Baker, M., Duff, K., Zehr, C., Perez-Tur, J., Houlden, H., Ruiz, A., Ossa, J., Lopera, F., Arcos, M., Madrigal, L., Collinge, J., Humphreys, C., Ashworth, A., Sarnier, S., Fox, N., Harvery, R., Kennedy, A., Roques, P., Cline, R.T., Philips, C.A., Venter, J.C., Forsell, L., Axelman, K., Lilius, L., Johnston, J., Cowburn, R., Viitanen, M., Winblad, B., Kosik, K., Haltia, M., Poyhonen, M., Dickson, D., Manm, D., Neay, D., Snowden, J., Lantos, P., Lannfelt, L., Rossor, M., Roberts, G.W., Adams, M.D., Hardy, J. and Goate, A.** (1995). The structure of the presenilin 1 (*S182*) gene and identification of six novel mutation in early onset AD families. *Nature Genetics*. 11: 219-222.

- Corrêa, A.C.O.** (1996). *Envelhecimento, depressão e doença de Alzheimer*. Belo Horizonte, Health.
- Damasio, A.R.** (1992). Doença de Alzheimer e Demência Relacionadas. In: *Tratado de Medicina Interna* (Wyngaarden, J.B., Smith Jr., L.H. and Bennett, J.C. eds), Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 2119-2122.
- Drachman, D.A.** (1993). New criteria for the diagnosis of vascular dementia: do we know enough yet?. *Neurology*. 43: 243-245.
- Engelhardt, E., Rozenthal, M. and Laks, J.** (1995a). Neuropsicologia: introdução. *Rev. Bras. Neurologia*. 1: 38-41, 1995.
- Engelhardt, E., Rozenthal, M., and Laks, J.** (1995b) Neuropsicologia: histórico. *Rev. Bras. Neurologia*. 1: 107-113.
- Engelhardt, E., Rozenthal, M. and Laks, J.** (1995c) III Conceitos básicos. *Rev. Bras. Neurologia*. 31: 38-41.
- Ferreira, M.E. and Grattapaglia, D.** (1995). *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. EMBRAPA-CENAGEN. Brasília.
- Fortes, P.A. de C.,** (1998). Ética nas pesquisas em seres humanos. In: *Ética e Saúde Pedagógica e Universitária*, São Paulo, pp. 105-117.
- Fraga Jr., R.** (1996). O diagnóstico da doença de Alzheimer. *Rev. Bras. Alzheimer*. 0: 10-12.
- Frangioni, L., Grut, M., Forsell, Y., Viitanen, M., Grafström, M., Holmén, K., Ericsson, K., Bäckman, L., Ahlbom, A. and Winblad, B.** (1991). Prevalence of Alzheimer's disease and other dementias in an elderly urban population: relationship with age, sex, and education. *Neurology*. 41: 1886-1992.
- Gorzoni, M.L. and Lima, C.A.C.** (1995). Análise dos parâmetros clínicos de idosos internados em enfermaria de clínica médica. *Rev. Ass. Med. Brasil*. 41: 277-232.
- Gustafson, L., Brun, A., Englund, E., Hangnell, O., Nilsson, K., Stensmyr, M., Öhlin, A. and Abrahamson, M.** (1998). A 50-year perspective of a family with chromosome-14-linked Alzheimer's disease. *Human Genet*. 102: 253-257.
- Hachinski, V.** (1992). Preventable senility: a call for action against the vascular dementias. *The Lancet*. 340: 645-648.
- Hixon, J.E. and Vernier, D.T.** (1990). Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *Hha*I. *Journal of Lipid Research*. 31: 545-548.
- IBGE.** (1995). *Anuário estatístico do Brasil, 1994*. IBGE, Rio de Janeiro.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J. J. and White, T. J.** (1990). *PCR: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press INC, San Diego New Boston.

- Kalache, A. and Veras, R.P.** (1987). O envelhecimento populacional da população mundial. Um desafio novo. *Rev. Saúde Publ.* 21.
- Katzman, R.** (1986). Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine.* 314: 964-973.
- Kehoe, P.G., Russ, C., McLiroy, S., Williams, H., Holmes, C., Liolitsa, D., Vahidassr, D., Powell, J., McGleenon, B., Liddell, M., Plomin, R., Dynan, K., Williams, N., Neal, J., Cairns, N.J., Wilcock, G., Passmore, P., Lovestone, S., Williams, J. and Owen, M.J.** (1999). Variation in *DCP1*, encoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer disease. *Nature Genetics.* 21: 71-72.
- Kokmen, E., Beard, C.M., O'Brien, P.C., Offord, K.P. and Kurland, L.T.** (1993). Is the incidence of dementing illness changing? A 25-year time trend study in Rochester, Minnesota (1960-1984). *Neurology.* 43: 1887-1892.
- Laks, J., Rozenhal, M. and Engelhardt, E.** (1995). Sintomas psiquiátricos na doença de Alzheimer e sua relação com o estado cognitivo. *Rev. Bras. Neurologia.* 31: 225-234.
- Li, L., Perry, R., Wu., J., Pham, D., Ohman, T., Harrell, L.E., Rodney, C.P. and Fukuchi K.** (1998). Polymorphic tetranucleotide repeat site within intron 7 of the β -amyloid precursor protein gene and its lack of association with Alzheimer's disease. *Human Genetics.* 103: 86-89.
- Morelli, L., Prat, M.I., Levy, E., Margone, C.A. and Castaño, E.M.** (1998). Presinilin 1 Met146Leu variant due to an A-T transversion in na early-onset familial Alzheimer's disease pedigree from Argentina. *Clinical Genetics.* 53: 468-473.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M.** (1995). Oxidação dos ácidos graxos. *In: Princípios de Bioquímica.* Sarvier, São Paulo.
- Oliveira, M.L.C.** (1997). Pesquisa em seres humanos e os limites da manipulação da vida. *Ver. Sal. do Distrito Federal,* 8: 41-45.
- Organización Panamericana De La Salud.** (1994). Las condiciones de la salud en las Américas. *New York: OPS.* 1: 549.
- Ramos, L.R., Veras, R.P. and Kalache, A.** (1987). Envelhecimento populacional: uma realidade brasileira. *Rev. Sad. Pública.* 21: 211.
- Saunders, A.M., Stritmatter, W.J., Schmechel, D., George-Hylsop, P.H.St., Pericak-Vance, M.A., Joo, S.H., Rosi, B.L., Gusella, J.F., Crapper-MacLachlan, D.R., Alberts, M.J., Hulette, C., Crain, B., Goldgaber, D. and Roses, A.D.** (1993). Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology.* 43: 1467-1472.
- Sayeg, N.** (1991). *Doença de Alzheimer: guia do cuidador.* São Paulo.
- Selkoe, D.J.** (1998). The cell biology of β -amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Cell Biology.* 8: 447-453.

- Sherrington, R., Rogaev E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J.F., Bruni, A.C., Montes, M.P., Sorbi, S., Rainero, I., Piness, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R.J., Wasco, W., Da Silva, H.A.R., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Tanzi, R.E., Roses, A.D., Fraser, P.E., Rommens, J.M. and St George-Hyslop, P.H.** (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 375: 754-760.
- Smith, G.E., Bohac, D.L., Waring, S.C., Kokmen, E., Tangalos, E.G., Ivnik, R.J. and Petersen, R.C.** (1998). Apolipoproteina E genotype influences cognitive "phenotype" in patients with Alzheimer's disease but not in healthy control subjects. *American Academy of Neurology*, 50: 355-362.
- Veras, R.P.** (1988). Considerações acerca de um jovem país que envelhece. *Cadernos de Saúde Pública*. 4: 382-397.
- Veras, R.P., Coutinho, E. and Ney Jr., G.** (1990). População idosa no Rio de Janeiro (Brasil): estudo-piloto da confiabilidade e validação do segmento de saúde mental do questionário BOAS. *Rev. Sad. Pública*. 24: 156-163.
- Veras, R.P., Ramos, L.R. and Kalache, A.** (1987). Crescimento da população idosa no Brasil: transformações e conseqüências na sociedade. *Rev. Sad. Pública*. 21: 225-233.

ANEXO I

Termo de Consentimento

O Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia está realizando estudo genético relacionado à Doença de Alzheimer. Este estudo está sendo dirigido pelo Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho e o Prof. Carlos Henrique Alves de Rezende, juntamente com a equipe técnica composta pelos acadêmicos Emerson Nunes Costa e Frederico Rogério Ferreira.

O projeto de pesquisa é composto por duas etapas. A primeira consiste em diagnosticar pacientes com idades acima de 65 anos que apresentam a doença e pacientes que não apresentam os sintomas da doença. Nestas pessoas serão realizadas exames laboratoriais com: hemograma, VHS, glicemia e creatinina, TSH, B₁₂ e ácido fólico, VDRL. Para a realização desses exames, é necessário colher 15 ml de sangue periférico de cada paciente. A coleta será realizada por Emerson Nunes Costa, que utilizará seringa coletora descartável, evitando qualquer risco de contaminação por doença transmitida pelo sangue (AIDS, sífilis, hepatite, chagas, entre outras).

Parte do sangue coletado será enviado ao laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, onde serão realizados os exames de DNA. Este exame consiste na detecção do fator $\epsilon 4$ no DNA do paciente, considerado como fator de risco para a Doença de Alzheimer. O resultado do exame somente será divulgado aos pacientes que já tiverem o diagnóstico para a Doença de Alzheimer, uma vez que a presença do fator $\epsilon 4$ no paciente não é determinante para o desenvolvimento da doença, sendo responsável por 50% dos casos em paciente acima de 65 anos. O conhecimento

de uma predisposição genética em pacientes normais poderia gerar conflitos psicológicos indesejáveis.

Os pacientes que concordarem em participar da pesquisa poderão desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo próprio.

Pelos termos apresentados por este documento, Eu

 concordo colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.

Paciente

Testemunhas

Uberlândia, ___ de _____ de 1999

