



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

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

Luciano Belcavello

Vitória – ES

2014



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

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

Luciano Belcavello

Vitória – ES

2014

Luciano Belcavello

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

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia (ênfase em Saúde).

Orientadora: Dra Flavia de Paula.

Coorientadora: Dra Maria do Carmo P. Batitucci.

Vitória – ES

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

B425e Belcavello, Luciano, 1983-
Estudo genético e de instabilidade genômica da doença
Alzheimer em pacientes de Vitória – ES / Luciano Belcavello. –
2014.
98 f. : il.

Orientador: Flavia de Paula.

Coorientador: Maria do Carmo P. Batitucci.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Doença de Alzheimer. 2. Polimorfismo Genético. 3.
Micronúcleo Germinativo. 4. Malondialdeído. 5. Estresse
Oxidativo. 6. População. I. Paula, Flavia de. II. Batitucci, Maria
do Carmo P. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro
de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Luciano Belcavello

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

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia (ênfase em Saúde).

Aprovada em 20 de fevereiro de 2014

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra Flavia de Paula
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Dra Maria do Carmo Pimentel Batitucci
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientadora

Dr Breno Valentim Nogueira
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro interno

Dra Eldamária de Vargas Wolfgramm dos Santos
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro externo

Dr Renato Lirio Morelato
Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória
Membro externo

Dr João Ricardo Mendes de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco
Membro externo

Velhas Árvores

*Olha estas velhas árvores, mais belas
Do que as árvores moças, mais amigas,
Tanto mais belas quanto mais antigas,
Vencedoras da idade e das procelas...
O homem, a fera e o inseto, à sombra delas
Vivem, livres da fome e de fadigas:
E em seus galhos abrigam-se as cantigas
E os amores das aves tagarelas.
Não choremos, amigo, a mocidade!
Envelheçamos rindo. Envelheçamos
Como as árvores fortes envelhecem,
Na glória de alegria e da bondade,
Agasalhando os pássaros nos ramos,
Dando sombra e consolo aos que padecem!*

Olavo Bilac

AGRADECIMENTOS

Expresso aqui os meus agradecimentos a todos os que, com apoio e incentivo, conduziram-me durante este trabalho:

À minha família, ao Douglas e aos meus amigos;

À Dra. Flavia de Paula e à Dra. Maria do Carmo Pimentel Batitucci, pela orientação, pelo carisma e pelos ensinamentos valiosos que me passaram desde a graduação em Ciências Biológicas na Ufes;

Ao Dr. Renato Lirio Morelato, por conduzir o processo de seleção de pacientes e controles, pelas sugestões propostas e por compor a banca de avaliação desta tese;

Aos amigos do Laboratório de Genética Toxicológica e do Núcleo de Genética Humana e Molecular, em especial à Daniela Camporez, pelo apoio, sugestões e auxílio durante as coletas, à Gillian Silva-Sena, pelo auxílio no teste MDA e ao Jean C. V. Dutra, pela amizade e apoio durante os experimentos;

À Dra. Suelly Gomes de Figueiredo por permitir o uso de equipamentos do Laboratório de Bioquímica de Proteínas;

Ao Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Vitória e funcionários, em especial à Amabilis que, sempre prestativa, realizou as coletas de sangue dos participantes da pesquisa;

Aos pacientes com DA, seus cuidadores e aos controles que participaram desta pesquisa;

Aos Professores Dr. Breno Valentim Nogueira, Dra. Eldamária Wolfgramm e Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira, pelas sugestões valiosas e pela gentileza em compor a banca de avaliação desta tese;

Ao PPG Biotecnologia – Renorbio e UFES;

À FAPES, pela bolsa de doutorado;

À FACITEC, pelo apoio financeiro do projeto.

RESUMO

BELCAVELLO, L. Estudo genético e de instabilidade genômica da doença Alzheimer em pacientes de Vitória – ES. 2014. 98 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo, Brasil. Orientadora: Dra Flavia de Paula.

A doença Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa complexa e a forma mais comum de demência em idosos, sendo caracterizada pela perda progressiva da memória e da função cognitiva. Ainda que sua causa seja desconhecida, os fatores genéticos e o estresse oxidativo desempenham um papel importante na patogênese da DA e alguns estudos citogenéticos mostraram que células de pacientes com DA apresentam níveis aumentados de danos aos cromossomos. Neste estudo caso-controle, objetivou-se investigar se polimorfismos nos genes *CLU* (rs11136000) e *CRI* (rs6701713) estão associados com risco para a DA em uma amostra de 243 indivíduos (82 pacientes com DA e 161 controles idosos saudáveis, pareados por idade e gênero). O ensaio do micronúcleo (MN) com bloqueio da citocinese em linfócitos de sangue periférico e o ensaio do MN em células esfoliadas da mucosa bucal foram utilizados para avaliar as frequências de biomarcadores de danos cromossômicos em 10 pacientes com DA e 10 controles. Adicionalmente, realizou-se o ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico para quantificar o nível plasmático de malondialdeído (MDA), um biomarcador de peroxidação lipídica, em uma amostra de 50 indivíduos (25 pacientes com DA e 25 controles). Não foi observada associação dos polimorfismos em *CLU* e *CRI* com risco para DA (Qui-quadrado / Teste exato de Fisher, $p > 0,05$). Pacientes com DA apresentaram frequências significativamente aumentadas de biomarcadores de danos cromossômicos avaliadas em linfócitos (MN, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares) e em células de mucosa bucal (MN, brotos nucleares e células binucleadas) em relação aos controles (Teste t de Student / Teste de Mann Whitney, $p < 0,05$). As frequências de biomarcadores de morte celular avaliadas em células de mucosa bucal (cromatina condensada, cariorrexe e picnose) bem como o nível de MDA plasmático foram encontrados significativamente aumentados em pacientes com DA quando comparados com os controles (Teste t de Student / Teste de Mann Whitney, $p < 0,05$). Esses resultados reforçam as hipóteses de que a instabilidade genômica e o estresse oxidativo estão envolvidos na etiologia da DA, e podem contribuir significativamente para a degeneração observada nos pacientes.

Palavras-chave: Doença Alzheimer • *CLU* • *CRI* • Polimorfismos • Ensaio do micronúcleo • Malondialdeído • Estresse oxidativo • População brasileira.

ABSTRACT

BELCAVELLO, L. Genetic and genomic instability study of Alzheimer's disease patients from Vitória – ES. 2014. 98 s. Thesis (Doctoral in Biotechnology) – Post Graduation Program in Biotechnology, UFES, Espírito Santo, Brazil. Adviser: Dr Flavia de Paula.

Alzheimer's disease (AD) is a complex neurodegenerative disorder that is the commonest form of dementia in elderly and leads to a progressively decrease in memory and cognition. Although its cause is unknown, genetic risk factors and oxidative stress play an important role in the pathogenesis of AD, and some cytogenetic studies indicate that cells of AD patients show increased chromosomal damage. In this case-control study we investigated whether polymorphisms in the *CLU* (rs11136000) and *CRI* (rs6701713) genes are associated with AD in a sample of 243 subjects (82 AD patients and 161 elderly healthy controls, age- and gender-matched). We used the cytokinesis-block micronucleus (MN) assay in peripheral blood lymphocytes and the buccal micronucleus assay in exfoliated buccal cells to assess the chromosomal damage in 10 AD patients and 10 control subjects. Additionally, we performed the thiobarbituric acid reactive substances assay to estimate the plasma level of malondialdehyde (MDA), a biomarker of lipid peroxidation, in a sample of 50 subjects (25 AD patients and 25 controls). We did not observe any association of the *CLU* and the *CRI* polymorphisms with risk to AD (Chi-square / Fisher's exact tests, $p > 0.05$). AD patients showed increased frequencies of chromosomal damage biomarkers in the lymphocytes (MN, buds, and nucleoplasmic bridges), and in the exfoliated buccal cells (MN, buds, and binucleated cells) when compared with controls (Student's *t* test / Mann Whitney U test, $p < 0.05$). Frequencies of the cell death biomarkers evaluated in the exfoliated buccal cells (condensed chromatin, karyorrhexis, and pyknosis), as well as plasma level of MDA were significantly greater in the AD patients compared to the control group (Student's *t* test / Mann Whitney U test, $p < 0.05$). These results support the hypothesis that genomic instability and increased oxidative stress are involved in the etiology of AD, which may contribute in a meaningful way to the neurodegeneration observed in the patients.

Keywords: Alzheimer's disease • *CLU* • *CRI* • Polymorphism • Micronucleus assay • Malondialdehyde • Oxidative stress • Brazilian population.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Fotomicrografia de uma secção do neocórtex de um cérebro com DA | 20 |
| Figura 2. Vias de clivagem amiloidogênica e não-amiloidogênica da APP..... | 22 |
| Figura 3. Hipótese da cascata amiloide | 23 |
| Figura 4. Modelo redox para a patogênese da doença Alzheimer..... | 32 |
| Figura 5. Reação de MDA com TBA e estruturas tautoméricas dos aductos formados | 33 |
| Figura 6. Fotomicrografias de células obtidas no ensaio CBMN..... | 35 |
| Figura 7. Mecanismos de formação de pontes nucleoplasmáticas | 36 |
| Figura 8. Diagrama representando vários tipos celulares analisados no ensaio BMNcyt e os possíveis mecanismos que os originam | 38 |
| Figura 9. Fotomicrografias de diversos tipos celulares analisados no ensaio BMNcyt | 38 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Estudos epidemiológicos e prevalência de demências no Brasil..... | 19 |
| Tabela 2. Novos genes associados à DA divulgados a partir de consórcios GWAS..... | 26 |
| Tabela 3. Fatores de risco modificadores para a doença Alzheimer | 29 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|-----------|---|
| ApoE | Apolipoproteína E |
| APP | Proteína precursora do peptídeo amiloide |
| A β | Peptídeo beta-amiloide |
| BMNcyt | <i>Buccal micronucleus cytome assay</i> |
| CBMN | <i>Cytokinesis-block micronucleus assay</i> |
| CLU | Clusterina |
| CR1 | Receptor 1 do sistema complemento |
| DA | Doença Alzheimer* |
| EOAD | Doença Alzheimer familiar (<i>early-onset Alzheimer's disease</i>) |
| GWAS | <i>Genome-wide association studies</i> |
| HNE | 4-hidroxi-2-nonenal |
| LOAD | Doença Alzheimer de início tardio (<i>late-onset Alzheimer's disease</i>) |
| MDA | Malondialdeído |
| MN | Micronúcleo (s) |
| MTHFR | Metilenoetrahidrofolato redutase |
| NFT | Emaranhados neurofibrilares (<i>neurofibrillary tangles</i>) |
| PICALM | <i>Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein</i> |
| PNP | Ponte (s) nucleoplasmática (s) |
| PS1 | Pré-senilina 1 |
| PS2 | Pré-senilina 2 |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| TBA | Ácido tiobarbitúrico |
| TBARs | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| TDP-43 | <i>Transactive response (TAR) DNA binding protein</i> |

*Segundo o *Online Mendelian Inheritance in Man*, de Victor McKusick, não se coloca mais a preposição “de” nos nomes das síndromes ou doenças. Assim, o termo “doença de Alzheimer”, foi substituído por “doença Alzheimer”. Este critério foi adotado nesta tese.

SUMÁRIO

| | | |
|-----|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 17 |
| 2.1 | Perspectivas históricas sobre a doença Alzheimer..... | 17 |
| 2.2 | Epidemiologia da doença Alzheimer no Brasil e no mundo..... | 18 |
| 2.3 | Características histopatológicas da doença Alzheimer | 19 |
| 2.4 | Genética da doença Alzheimer | 21 |
| 2.5 | Novos genes foram associados com a doença Alzheimer | 25 |
| 2.6 | Diversos fatores de risco ambientais estão associados com a doença Alzheimer | 29 |
| 2.7 | O estresse oxidativo contribui para a patogênese da doença Alzheimer | 30 |
| 2.8 | Danos cromossômicos estão associados a doenças neurodegenerativas | 34 |
| 3 | OBJETIVOS | 39 |
| 3.1 | Objetivos específicos | 39 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 40 |
| 4.1 | CAPÍTULO 1 – Protective effect of the <i>ApoE</i> -e3 allele in Alzheimer's disease..... | 40 |
| 4.2 | CAPÍTULO 2 – Association of <i>MTHFR</i> and <i>PICALM</i> polymorphisms with Alzheimer's disease | 46 |
| 4.3 | CAPÍTULO 3 – Genetic damage in Alzheimer's disease patients: evaluation with the micronucleus assay | 61 |
| 5 | REFERÊNCIAS..... | 78 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 90 |
| | ANEXO – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa..... | 91 |
| | APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido..... | 92 |
| | APÊNDICE B – Questionário de Saúde Pessoal..... | 94 |

1 INTRODUÇÃO

O mito grego de Tithonus, descrito há 3.000 anos, retrata um homem que enganou a morte, mas cuja imortalidade, em vez de ser uma dádiva, foi sua maldição. Eos, a deusa do amanhecer, apaixonou-se por Tithonus e pediu a Zeus que o tornasse imortal. Esquecera, entretanto, de pedir que ele não envelhecesse. Tithonus viveu eternamente, mas se tornou extremamente velho e progressivamente decrepito e demenciado.

A sociedade moderna enfrenta um dilema semelhante ao de Eos, salvo as devidas proporções. A expectativa de vida cresceu consideravelmente nas últimas décadas, mas o envelhecimento da população levou a um aumento da incidência de doenças relacionadas à idade, especialmente as demências. A doença Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência relacionada à idade, sendo considerada uma epidemia global que permanece com causa desconhecida (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2013).

Segundo estimativas do *World Alzheimer's Report 2013*, essa doença afeta atualmente 35 milhões de pessoas no mundo e, sem avanços no tratamento, espera-se um aumento significativo da incidência de DA nas próximas décadas. No Brasil, aproximadamente 1 milhão de pessoas vivem atualmente com a doença, o que equivale a 6% da população idosa, de acordo com a Associação Brasileira de Alzheimer.

A DA é progressiva, incurável e fatal. Ela se caracteriza por uma degeneração das células em regiões cerebrais distintas, um processo que se inicia 10 a 20 anos antes do aparecimento dos sintomas (CARRILLO; THIES; BAIN, 2012). A perda de memória é usualmente o primeiro sintoma de DA, porém, com a progressão da doença, o paciente é gradualmente afetado por outros sintomas, incluindo mudanças de personalidade, um declínio na habilidade de falar e de entender o que outros dizem e dificuldade de tomada de decisões. Nos estágios finais da

doença, os indivíduos afetados perdem a capacidade de interagir com o ambiente e de cuidar de si mesmos. A morte dos pacientes ocorre geralmente entre 3 e 9 anos após o diagnóstico (QUERFURTH; LaFERLA, 2010).

São conhecidos dois tipos da doença, de acordo com a idade de aparecimento dos sintomas: a DA familiar ou de início precoce (EOAD, na sigla em inglês) acomete indivíduos antes dos 65 anos de idade. Essa forma da doença responde por menos de 1% dos casos de DA e tem herança autossômica dominante, com mutações nos genes que codificam a proteína precursora amiloide (APP), a pré-senilina 1 (PS1) e a pré-senilina 2 (PS2) (LAMBERT; AMOUYEL, 2011; CARRILLO; THIES; BAIN, 2012). O segundo tipo tem início tardio (LOAD, na sigla em inglês) e é geralmente diagnosticada em pacientes com mais de 65 anos de idade. É a forma mais comum de demência e apresenta um padrão de herança não mendeliano, mas ainda assim, com um componente claramente herdável (SCHU et al., 2012).

A LOAD não é considerada uma doença genética, pois nenhum gene determina se o indivíduo vai desenvolver a doença. Entretanto, algumas variantes genéticas aumentam o risco de desenvolvê-la, particularmente o alelo $\epsilon 4$ do gene da apolipoproteína E (ApoE), envolvida no transporte de colesterol. Um indivíduo que carrega duas cópias desse alelo tem de 12 a 15 vezes mais risco de desenvolver LOAD e um início dos sintomas mais precoce do que um indivíduo que desenvolve a doença, mas carrega apenas uma ou nenhuma cópia do alelo *ApoE- $\epsilon 4$* (BLACKER et al., 1997).

Outros genes parecem estar relacionados com risco aumentado para LOAD. Dentre eles, os genes que codificam a proteína clusterina (CLU), o receptor 1 do componente complemento (CR1), a proteína de ligação ao fosfatidilinositol semelhante à clatrina (PICALM) (LAMBERT et al., 2009; HAROLD et al., 2009), e a enzima metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR) (HUA et al., 2011; MANSOORI et al., 2012).

Além das variantes genéticas, diversos fatores ambientais parecem influenciar o risco para LOAD, incluindo atividades física e cognitiva, dieta, obesidade, hipertensão, diabetes e tabagismo. Entretanto, a idade é o seu principal fator de risco. Estudos indicam que, ao redor do mundo, a incidência de demência entre as idades de 65 e 90 anos dobra aproximadamente a cada 5 a 6 anos (ZIEGLER-GRAHAM et al., 2008) e continua a crescer exponencialmente após os 90 anos, chegando a 41% de aumento por ano entre os indivíduos centenários (CORRADA et al., 2010). Esse crescimento exponencial no número de pessoas com demência é impulsionado pelo aumento da expectativa de vida da população, especialmente em países em desenvolvimento. O impacto decorrente desse fenômeno é não somente emocional, mas também social e econômico, pois refletirá em um alto custo para os sistemas de saúde, para os pacientes e seus cuidadores.

Nas últimas décadas houve um progresso significativo no entendimento dos mecanismos moleculares e bioquímicos da doença e a aplicação desses conhecimentos em novas tecnologias e tratamentos. Adicionalmente aos estudos moleculares, há um interesse crescente em avaliar a presença de danos cromossômicos em células somáticas de pacientes com doenças neurodegenerativas, na busca de possíveis biomarcadores que possam ser úteis no diagnóstico complementar da doença.

A maioria dos danos cromossômicos pode estar relacionada ao desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e os mecanismos de defesa celular contra os danos provocados por eles, o que caracteriza o estresse oxidativo (MOREIRA et al., 2006). Os radicais livres são constantemente produzidos pelas células vivas, mas o seu acúmulo, relacionado ao envelhecimento, resulta em danos em praticamente todos os componentes celulares, incluindo o material genético. As ROS também reagem com ácidos graxos poliinsaturados para gerar diversos intermediários citotóxicos, dentre eles o malondialdeído,

uma substância que tem sido amplamente utilizada como indicadora de estresse oxidativo em humanos (TORRES et al., 2011; LÓPEZ et al., 2013).

Considerando que o aumento na prevalência da DA tem acompanhado o respectivo crescimento da expectativa de vida da população, é fundamental o desenvolvimento de estudos que melhorem o conhecimento científico sobre as causas da doença para ajudar no estabelecimento de estratégias públicas de prevenção e tratamento mais efetivo de acordo com o perfil genético de cada paciente. Dentre as diversas abordagens de pesquisa, o estudo dos genes de susceptibilidade à doença, a avaliação do nível de dano ao DNA e a validação biomarcadores de risco podem trazer informações importantes sobre a fisiopatologia da DA e indicar novos alvos terapêuticos para o futuro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Perspectivas históricas sobre a doença Alzheimer

A perda das habilidades cognitivas em idosos foi reconhecida pelos antigos egípcios há 4000 anos, porém a descrição clínica do que hoje se considera demência só foi estabelecida no século XVIII (BOLLER; FORBES, 1998). Credita-se a Philippe Pinel, considerado o pai da psiquiatria moderna, a introdução do termo demência. No livro *Des Maladies Mentales*, de 1801, Jean Etienne Esquirol referiu-se à demência como a perda das faculdades mentais, o que levou ao conceito de demência senil. Nos anos 1860, estudos clinicopatológicos reportaram atrofia e redução do peso cerebral na demência senil (SCHNEIDER et al., 2012).

Blocq e Marinesco foram os primeiros a descrever as placas senis em tecido cerebral de pacientes com epilepsia crônica (BUDA et al., 2009). Entretanto, esses cientistas não relacionaram essas lesões com a demência. Utilizando um método de coloração com prata, desenvolvido em 1903 por Bielschowsky, Alois Alzheimer publicou um estudo de caso da paciente Auguste Deter, morta aos 55 anos e que sofria de demência progressiva, e concluiu que sua demência era devido a deposições acentuadas de proteínas, denominadas placas senis e emaranhados neurofibrilares. Em 1910, Emil Kraepelin utilizou o termo “doença de Alzheimer” para se referir à forma de demência de início precoce, distinguindo-a da forma de demência senil (SCHNEIDER et al., 2012; BOLLER; FORBES, 1998).

Até por volta de 1968, a DA era considerada uma forma de demência pré-senil rara, enquanto que a forma senil, muito comum, era atribuída à doença cerebrovascular e ao processo normal de envelhecimento. Entretanto, os trabalhos de Blessed, Tomlinson e Roth (1968) correlacionaram a gravidade da demência na idade avançada e os achados neuropatológicos

característicos da DA (placas senis e emaranhados neurofibrilares). Além disso, foi-se percebendo que a demência senil e a DA pré-senil partilhavam o mesmo quadro clínico e as mesmas características histopatológicas. Assim, os dois conceitos de demência foram reunificados, a partir de 1976, passando-se a utilizar o termo “demência senil do tipo Alzheimer”. Dessa forma, a DA deixou de ser considerada uma doença rara para se transformar em uma epidemia nos dias atuais, atraindo para si quase todos os diagnósticos que se encaixavam em um quadro degenerativo primário a partir de então (CAIXETA, 2012).

2.2 Epidemiologia da doença Alzheimer no Brasil e no mundo

A prevalência da DA varia em diversas regiões do mundo, especialmente nos países orientais. Essa variação pode, segundo alguns pesquisadores, estar relacionada a fatores modificadores como origem étnica e diferenças culturais e socioeconômicas. Segundo dados do *Alzheimer's Association Report* (2013), 35,6 milhões de pessoas no mundo viviam com demência no ano de 2010. O maior número de pessoas com demência (7,0 milhões) vivia no leste europeu, seguido do leste asiático (5,5 milhões), sul asiático (4,5 milhões) e América do Norte (4,4 milhões). O Brasil ocupava o 9º lugar em número de pessoas com demência (~1 milhão). Ainda segundo o relatório, o número de pessoas com demência está projetado para quase dobrar em 20 anos, para 65,7 milhões em 2030 e 115,4 milhões em 2050. Muito desse aumento está atribuído ao crescente número de pessoas com demência em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, devido, sobretudo, ao crescimento populacional e ao aumento da expectativa de vida.

A maioria dos estudos epidemiológicos sobre demência realizados no Brasil ocorreu no estado de São Paulo, com exceção do estudo de Godinho e colaboradores (2010), em Porto Alegre, RS (Tabela 1).

Tabela 1. Estudos epidemiológicos e prevalência de demências no Brasil (adaptado de Vieira e Caixeta, 2012)

| Referência; Estado | <i>n</i> | DA (%) | DV (%) | DA+DV (%) | Outros (%) |
|------------------------------------|----------|-----------|-----------|--------------|---------------|
| Nitrini et al. (1995); SP | 100 | 54 | 20,0 | — | 26,0 |
| Godoy, Tognola e Ferraz (1998); SP | 250 | 55,2 | 27,6 | 12,8 | 4,4 |
| Herrera et al. (2002); SP | 118 | 54,7 | 9,4 | 14,5 | 21,4 |
| Vale e Miranda (2002); SP | 104 | 33,6 | 19,2 | 6,45 | 40,7 |
| Silva e Damasceno (2002); SP | 261 | 23,7 | 24,9 | 5,4 | 46,0 |
| Takada et al. (2003); SP | 275 | 59,6 | 13,4 | — | 27,0 |
| Scazufca et al. (2008); SP | 105 | 32,4 | 32,4 | 27,61 | 7,59 |
| Tascone et al. (2008); SP | 113 | 62,8 | — | 8,8 | 25,7 |
| Botino et al. (2008); SP | 107 | 59,8 | 15,9 | — | 24,3 |
| Godinho et al. (2010); RS | 105 | 60,0 | 18,1 | 9,5 | 12,4 |

n = número de casos estudados; DA = doença Alzheimer; DV = demência vascular; DA + DV = demência mista.

Vários desses estudos mostraram que a DA é o tipo de demência mais frequente no Brasil, seguido de demência vascular. Em idosos brasileiros com demência, a frequência de DA variou de 23.7% (SILVA; DAMASCENO, 2002) a 62.8% (TASCONE et al., 2008). Idade avançada e baixo nível de escolaridade foram apontados como fatores de risco para a DA em estudos brasileiros (HERRERA et al., 2002; BOTINO et al., 2008).

2.3 Características histopatológicas da doença Alzheimer

O evento central na patogenia da maioria das demências neurodegenerativas é a agregação anormal de proteínas. Depósitos extracelulares de peptídeo beta-amiloide (A β) das placas senis e os emaranhados neurofibrilares neuronais (Figura 1) representam marcadores histopatológicos associados à neurodegeneração com deterioração cognitiva em idade avançada. Mais de um século se passou desde sua descoberta e essas características

neuropatológicas ainda são reconhecidas como os marcadores principais da doença (SCHNEIDER et al., 2012; CARRILLO; THIES; BAIN, 2012).

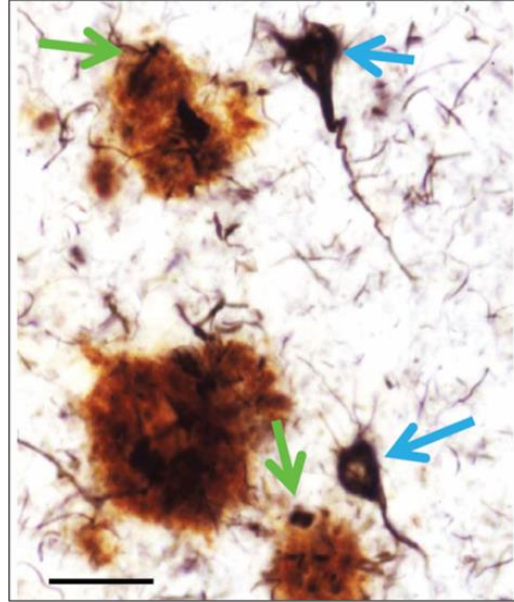


Figura 1. Fotomicrografia de um corte do neocórtex de um cérebro com DA corado usando dupla marcação imunistoquímica para β -amiloide ($A\beta$, marrom avermelhado) e para a proteína tau, associada ao microtúbulo (preto). As placas $A\beta$ (setas verdes) são geralmente esféricas e extracelulares, enquanto que os emaranhados neurofibrilares (NFTs, setas azuis) se formam dentro dos neurônios. Algumas placas $A\beta$ contêm proteína tau aberrante (preto), bioquimicamente idêntica àquela vista nos NFTs intracelulares. Estas placas $A\beta$ são descritas como placas neuríticas. Escala da barra = 50 μ m (Modificado de NELSON et al., 2012).

As placas senis consistem de material amiloide, composto de proteína $A\beta$, gerada a partir da clivagem proteolítica anômala da proteína precursora do amiloide (APP). Os emaranhados neurofibrilares (NFT, *neurofibrillary tangles*, na sigla em inglês), por sua vez, são lesões intraneuronais compostas de filamentos de proteína tau hiperfosforilada. Essa proteína é importante para a manutenção da estabilidade e da homeostase neuronal e sua hiperfosforilação leva a uma cascata de eventos que culmina na morte neuronal. A enzima GSK3 β participa da regulação do estado de fosforilação da proteína tau nos neurônios e a atividade excessiva dessa enzima pode ocasionar hiperfosforilação da tau, aumento na produção de peptídeo $A\beta$, indução de apoptose e redução da neurogênese e da plasticidade sináptica (WANG et al., 2008).

Além dos depósitos de amiloide e tau, alguns estudos mostraram que depósitos anormais da proteína TDP-43 (*transactive response (TAR) DNA binding protein*) foram encontrados em 25–50% dos cérebros de pessoas com DA, especialmente nos pacientes em estágios mais avançados da doença ou com esclerose hipocampal. TDP-43 é uma forma clivada e fosforilada de uma proteína de ligação a DNA e RNA. Entretanto, ainda não está claro se as inclusões de TDP-43 representam um terceiro marcador da DA ou se representa uma doença separada que coexiste com a DA, ou seja, uma patologia mista (KADOKURA et al., 2009; AMADOR-ORTIZ et al., 2007; URYU et al., 2008; SCHNEIDER et al., 2012).

2.4 Genética da doença Alzheimer

A genética da doença Alzheimer é complexa e heterogênea. A maioria dos casos de DA é esporádica de início tardio (LOAD), aparentemente sem recorrência familiar da doença. Entretanto, uma pequena porcentagem dos casos de DA (menos de 1%) tem um início precoce, com sintomas aparecendo antes dos 65 anos de idade. Essa forma rara de DA é conhecida como doença Alzheimer de início precoce (EOAD), é comumente recorrente na família e apresenta um padrão de herança autossômico dominante. Mutações em três genes parecem explicar completamente a patogenia desse tipo de DA familiar: o gene da proteína precursora amiloide (APP), o gene da pré-senilina 1 (PS1) e o gene da pré-senilina 2 (PS2) (GUERREIRO; GUSTAFSON; HARDY, 2012).

O gene *APP* é talvez o mais importante de todos os genes relacionados à EOAD. Está localizado no cromossomo 21 e codifica uma proteína transmembrana que tem sido relacionada a movimento celular e adesão (HOLTZMAN et al., 2011; LaFERLA; GREEN; ODDO, 2007). A importância de *APP* para a etiologia da DA está no fato desse gene codificar uma proteína que é seletivamente degradada em peptídeos beta-amiloide ($A\beta$). Em condições

normais, a proteína APP é clivada pela enzima α -secretase (via não-amiloidogênica) para secretar fragmentos não-amiloidogênicos e há um equilíbrio entre a produção de $A\beta$ e seu *clearance* a partir do cérebro. Atualmente, duas proteínas são consideradas envolvidas na depuração dos peptídeos $A\beta$ a partir do cérebro: a apolipoproteína E (*ApoE*) e a enzima degradante da insulina (CAIXETA, 2012).

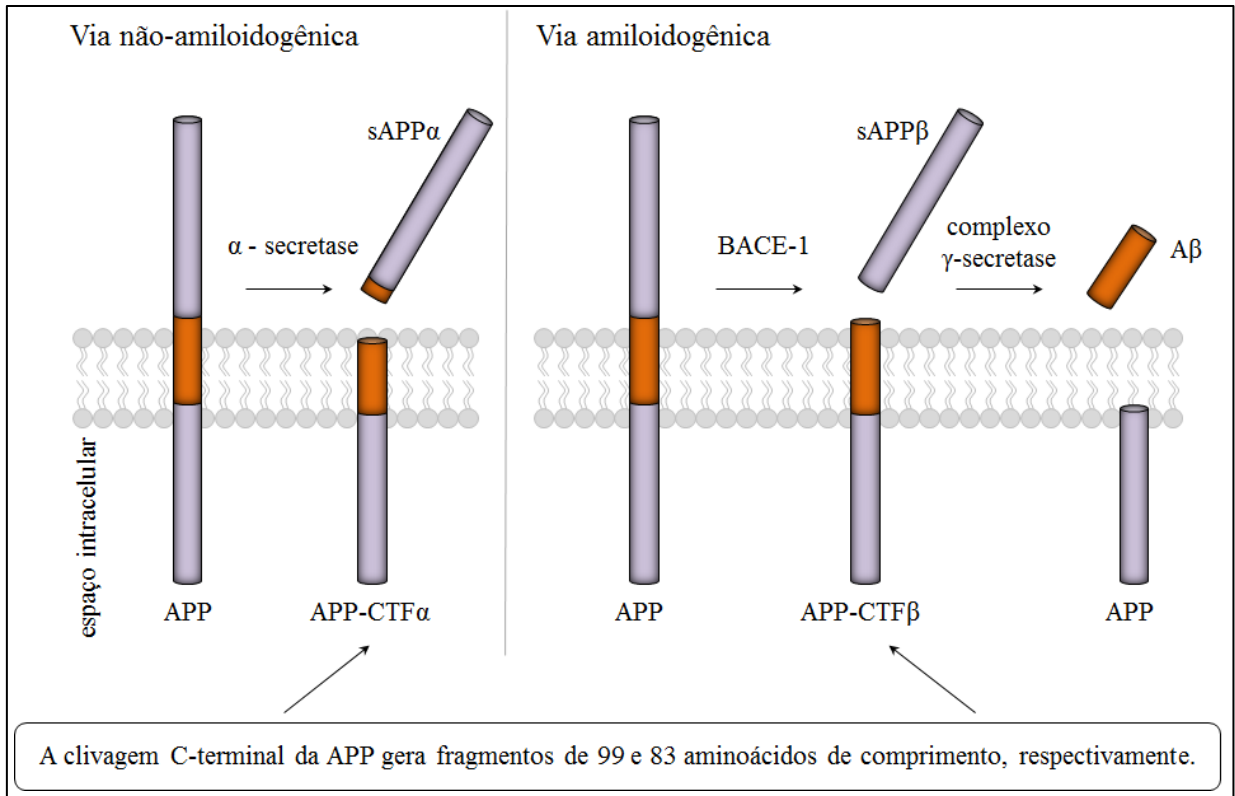


Figura 2. Vias de clivagem amiloidogênica e não-amiloidogênica da APP (adaptado de SCHU et al., 2012). BACE-1 = enzima de clivagem β -secretase.

Na DA, APP é anormalmente clivada por β - e γ -secretases (via amiloidogênica) resultando na produção de peptídeos $A\beta$ com 39–43 aminoácidos de comprimento (Figura 2). As formas insolúveis dessas proteínas são depositadas primeiramente como fibrilas de $A\beta_{40}$ ou $A\beta_{42}$, sendo que $A\beta_{42}$ é considerada a forma mais fibrilogênica e tóxica (SCHNEIDER et al., 2012; SCHMITT, 2006; LaFERLA; GREEN; ODDO, 2007). Esses peptídeos interagem com neurônios e células gliais, levando à ativação de cascatas pró-inflamatórias, disfunção

mitocondrial, aumento do estresse oxidativo (RHEIN; ECKERT, 2007), aumento da fosforilação da proteína tau, indução de apoptose e morte celular (RECUERO et al., 2004).

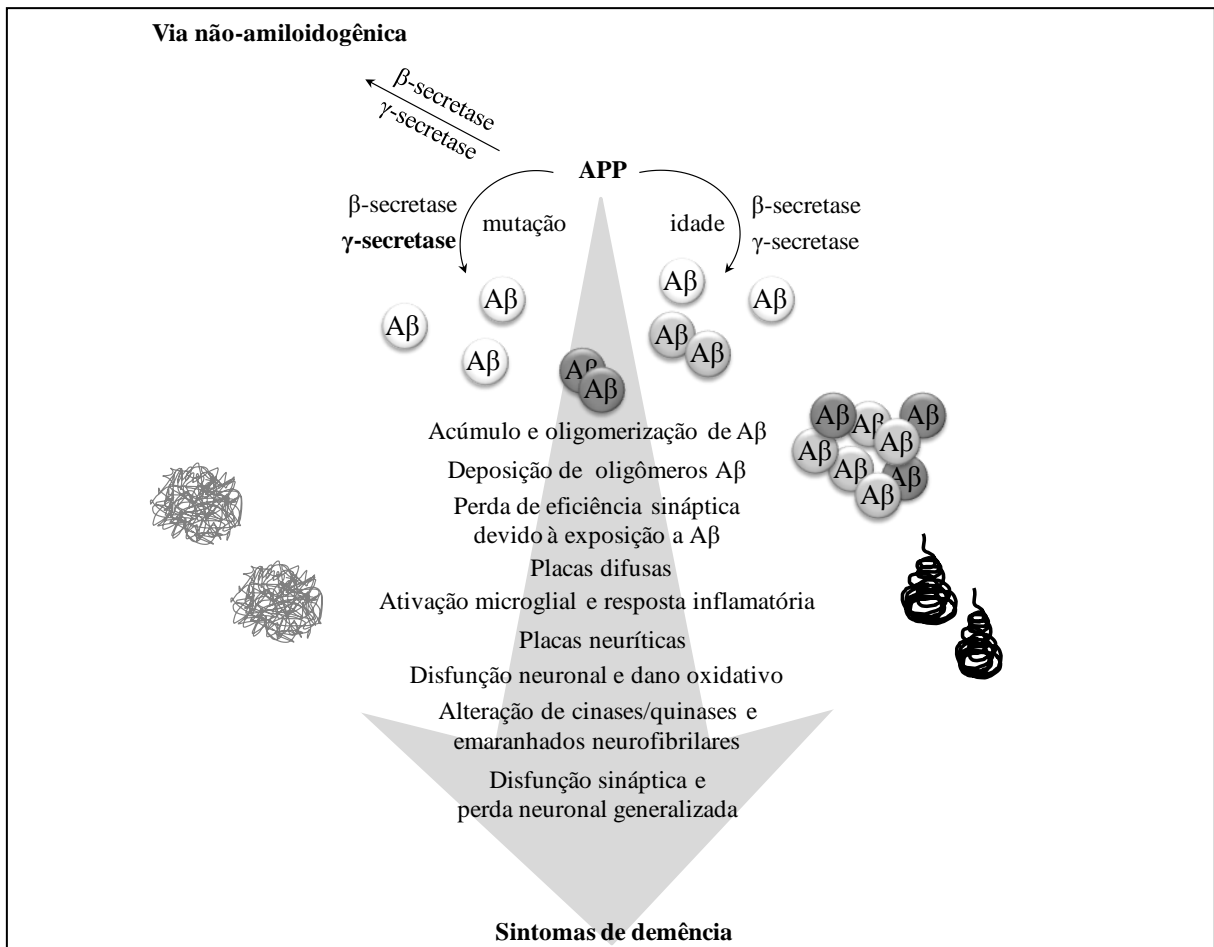


Figura 3. Hipótese da cascata amiloide (adaptado de HERRUP, 2012).

Mutações nos genes *PS1* (cromossomo 14) e *PS2* (cromossomo1) também aumentam a razão $A\beta_{42}:A\beta_{40}$ no cérebro. As pré-senilinas 1 e 2 são proteínas altamente homólogas e estima-se que de todos os casos de EOAD, cerca de 50% sejam causados por mutações em *PS1* e menos de 0,5% sejam por mutações em *PS2* (SHERRINGTON et al., 1995; LEVY-LAHAD et al., 1995). A hipótese da cascata amiloide (Figura 3) propõe que a deposição de beta-amiloide e a fosforilação de tau são eventos-chave que levam à morte neuronal em pacientes com DA.

Apesar das fortes evidências que suportam o papel principal de peptídeos Aβ ou proteínas tau hiperfosforiladas na etiopatogenia da DA, não existe nenhuma hipótese que abranja de forma

exclusiva toda a gama de processos patológicos associados à doença. Algumas hipóteses alternativas e complementares têm sido propostas nos últimos anos para explicar a fisiopatologia da doença. A maioria delas implica a atividade das proteínas e enzimas envolvidas na regulação da APP-A β e no metabolismo da tau (CAIXETA, 2012).

A DA esporádica de início tardio (LOAD) é caracterizada pelo aparecimento dos sintomas após os 65 anos de idade e é a forma mais comum de DA, representando cerca de 90% dos casos (LAMBERT; AMOUYEL, 2011). Ainda que não seja considerada uma doença genética, uma vez que nenhum gene determina se um indivíduo portador vai desenvolvê-la, sabe-se que variantes genéticas têm um importante papel em sua etiologia. Isso decorre do fato de que indivíduos que possuem parentes de primeiro grau com LOAD também apresentam risco aumentado de desenvolver a doença. Até recentemente, o único fator genético de risco bem estabelecido para a LOAD era o gene da apolipoproteína E (ApoE).

O gene *ApoE*, localizado no cromossomo 19, codifica uma glicoproteína importante na mobilização e redistribuição de colesterol, imunorregulação e ativação de várias enzimas lipolíticas. ApoE é sintetizada principalmente no fígado, cérebro (primariamente por neurônios e astrócitos) e também por outras células, tais como macrófagos e monócitos (MAHLEY; RALL, 2000; SIEST et al., 1995; LEONI, 2011; KIM; BASAK; HOLTZMAN, 2009). O gene *ApoE* apresenta três isoformas principais: *ApoE- ϵ 2*, *ApoE- ϵ 3* e *ApoE- ϵ 4*. Esta última é o fator de risco genético mais importante para o desenvolvimento de DA, tanto familiar quanto esporádica e têm uma ação dose dependente. Uma pessoa homozigota para o alelo *ApoE- ϵ 4* tem um aumento de 12 a 15 vezes no risco de desenvolver LOAD e apresenta uma idade de início dos sintomas mais cedo do que as pessoas que desenvolvem a doença mas que portam apenas uma ou nenhuma cópia dessa variante (CORDER et al., 1993; STRITTMATTER et al., 1993). O alelo *ApoE- ϵ 2*, entretanto, parece conferir proteção contra

a DA (CORDER et al., 1994). Adicionalmente, a variante *ApoE-ε3* possui alta afinidade com o peptídeo Aβ em relação à forma *ApoE-ε4*, sugerindo que *ApoE-ε3* facilita a remoção de Aβ do espaço extracelular, ao passo que *ApoE-ε4*, intensifica a sua deposição (LaDU et al., 1995; CANEVARI; CLARK, 2007). As isoformas de *ApoE* também podem atuar sobre outros mecanismos que contribuem para o desenvolvimento de DA, tais como função sináptica, neurotoxicidade, hiperfosforilação de tau e neuroinflamação (KIM et al., 2009). De acordo com as estimativas atuais, a genética é responsável por 70% do risco de desenvolver a DA, sendo que o gene *ApoE* pode explicar cerca de 20% desse risco (ALONSO-VILATELA; LÓPEZ-LÓPEZ; YESCAS-GÓMEZ, 2012; LAMBERT; AMOUYEL, 2011).

2.5 Novos genes foram associados com a doença Alzheimer

O desenvolvimento de métodos genômicos avançados, como a tecnologia GWAS (*genome-wide association studies*), tem permitido a identificação de novos genes associados com risco potencial para DA. Atualmente, as plataformas de microarray podem testar milhões de variantes genéticas em cada indivíduo, comparando milhares de casos e controles. Ainda que essa nova tecnologia não forneça a informação funcional detalhada de um gene, um resultado positivo gerado a partir de GWAS permite identificar uma variante que ocorra numa frequência alélica significativamente diferente entre casos e controles e apontar os genes que contém ou circundam essa variante. Dezenas de GWAS foram realizados nos últimos anos para identificar genes de risco potencial para DA (Tabela 2). Entretanto, nem todos os resultados puderam ser replicados devido a peculiaridades referentes à técnica, como tamanho da amostra, fator que influencia no poder do teste estatístico, e diferenças étnicas de cada grupo populacional estudado. Como esperado, a variante *ApoE-ε4* mostrou-se significativamente associada com a doença nesses estudos.

Tabela 2. Novos genes associados à DA divulgados a partir de consórcios GWAS

| Gene | Cromossomo | Referências |
|---|------------|--|
| <i>CLU</i> <i>Clusterin</i> | 8 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Harold et al. (2009) ▪ Seshadri et al. (2010) ▪ Hollingworth et al. (2011) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Lambert et al. (2009) ▪ Naj et al. (2011) ▪ Jun et al. (2010) |
| <i>CR1</i> <i>receptor 1 do componente complemento</i> | 1 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Harold et al. (2009) ▪ Seshadri et al. (2010) ▪ Hollingworth et al. (2011) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Naj et al. (2011) ▪ Jun et al. (2010) |
| <i>PICALM</i> <i>phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein</i> | 11 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Lambert et al. (2009) ▪ Hollingworth et al. (2011) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Naj et al. (2011) ▪ Jun et al. (2010) |
| <i>BIN1</i> <i>bridging integrator 1</i> | 2 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hollingworth et al. (2011) ▪ Seshadri et al. (2010) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Naj et al. (2011) |
| <i>MS4A4A/MS4A4E6</i> <i>membrane-spanning 4-domains subfamily A members 4A and E6</i> | 11 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hollingworth et al. (2011) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Naj et al. (2011) |
| <i>EPHA1</i> <i>ephrin type-A receptor 1</i> | 7 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Naj et al. (2011) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Seshadri et al. (2010) |
| <i>CD33*</i> <i>myeloid cell surface antigen CD33</i> | 19 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Naj et al. (2011) |
| <i>CD2AP</i> <i>CD2-associated protein</i> | 6 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Naj et al. (2011) |
| <i>ABCA7</i> <i>ATP-binding cassette transporter-A7</i> | 19 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hollingworth et al. (2011) |
| <i>TREM2</i> <i>triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i> | 6 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Jonsson et al. (2013) |
| <i>HLA-DRB5-HLA-DRB1</i> <i>major histocompatibility complex, class II, DRβ5 and DRβ1</i> | 6 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Lambert et al. (2013) |
| <i>PTK2B</i> <i>protein tyrosine kinase 2β</i> | 8 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Lambert et al. (2013) |
| <i>SORL1</i> <i>sortilin-related receptor, L(DLR class) 1</i> | 11 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Lambert et al. (2013) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Miyashita et al. (2013) |
| <i>SLC24A4-RIN3</i> <i>solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 4</i> | 14 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Lambert et al. (2013) |
| <i>INPP5D</i> <i>inositol polyphosphate-5-phosphatase</i> | 2 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Lambert et al. (2013) |
| <i>MEF2C</i> <i>myocyte enhancer factor 2</i> | 5 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Lambert et al. (2013) |
| <i>NME8</i> <i>NME/NM23 family member 8</i> | 7 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Lambert et al. (2013) |
| <i>ZCWPW1</i> <i>zinc finger, CW type with PWWP domain 1</i> | 7 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Lambert et al. (2013) |
| <i>CELF1</i> <i>CUGBP, Elav-like family member 1</i> | 11 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Lambert et al. (2013) |
| <i>FERMT2</i> <i>fermitin family member 2</i> | 14 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Lambert et al. (2013) |
| <i>CASS4</i> <i>Cas scaffolding protein family member 4</i> | 20 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Lambert et al. (2013) |

*Resultados não replicados em GWAS recente (LAMBERT et al., 2013).

Alguns desses novos genes reforçam hipóteses previamente estabelecidas para a DA, como a hipótese da cascata amiloide. Outros genes revelaram que vias de inflamação, dano oxidativo, processamento de beta-amiloide e tráfego de proteínas estão implicados na progressão da doença.

O gene *CLU* codifica a proteína clusterina (ou apolipoproteína J), expressa no cérebro. Experimentos em ratos modelo revelaram que a clusterina está colocalizada em placas neuríticas e outros estudos funcionais evidenciaram que *CLU* pode proteger contra estresse oxidativo e danos às membranas celulares resultantes de resposta inflamatória, apoptose e agregação de proteínas hidrofóbicas, como $A\beta_{42}$ (CALERO et al., 2000).

A identificação dos genes *CRI1*, *CD33*, *TREM2* e *HLA-DRB5-DRB1* suporta a evidência de envolvimento do sistema imune e inflamação na progressão da DA. Estudos em camundongos modelo mostraram que o receptor 1 do componente complemento (CR1) participa do clearance de $A\beta$ e células apoptóticas, via sistema complemento (WYSS-CORAY et al., 2002). O antígeno de superfície de célula mieloide CD33 está envolvido em apoptose induzida por resposta imune (VITALE et al., 2001); *TREM2* está envolvido em resposta inflamatória (JONSSON et al., 2013) e *HLA-DRB5-DRB1* está associado com imunocompetência e histocompatibilidade (LAMBERT et al., 2013).

A função da proteína codificada por *CASS4* não é totalmente compreendida, mas há evidências de que esteja envolvida no metabolismo de APP, assim como o gene *SORL1*. A associação de *ABCA7* com a DA também suporta a hipótese amiloide uma vez que a proteína transportadora transmembrana *ABCA7* é expressa no cérebro e está envolvida com tráfego de APP, inibição da produção de $A\beta$, clearance de lipídios da célula, além de ter sido sugerida interagir com *CLU* e ApoE (HOLLINGWORTH et al., 2011). Os genes *CASS4* e *FERMT2*

parecem estar envolvidos no metabolismo de tau. A proteína codificada por *PTK2B*, por sua vez, parece influenciar a migração celular (LAMBERT et al., 2013).

A endocitose é um processo crucial para transmissão sináptica e para a resposta a danos neuronais e tem sido sugerida como uma via importante na patogênese da DA, uma vez que a desregulação desse processo está ligada a diversas doenças neurodegenerativas (NAJ et al., 2011). Três dos novos loci associados à DA estão envolvidos com o processo de endocitose: *PICALM*, *CD2AP* e *SORLI*. A proteína *PICALM* está envolvida na endocitose mediada por clatrina, processo responsável pelo endereçamento de várias moléculas, incluindo lipídios, fatores de crescimento e neurotransmissores, para diversos destinos celulares para posterior processamento, secreção e degradação. A proteína adaptadora *CD2AP* auxilia a regulação da endocitose mediada por receptor (HOLLINGWORTH et al., 2011). O gene *SORLI* está associado com as formas familiar e esporádica de DA (ROGAEVA et al., 2007; POTTIER et al., 2012) e representa o primeiro gene que conecta dois mecanismos relacionados à LOAD: tráfego aberrante e metabolismo da APP (ROGAEVA et al., 2007).

Segundo Lambert e colaboradores (2013) esses novos loci implicam a existência de novas vias envolvidas com a patogênese da DA, tais como: função sináptica hipocampal (*MEF2C* e *PTK2B*), função do citoesqueleto e transporte axonal (*CELF1*, *NME8* e *CASS4*), regulação da expressão gênica e da modificação pós-traducional de proteínas e função microglial e da célula mieloide (*INPP5D*). A descoberta desses e de futuros loci de risco poderá resultar no desenvolvimento de testes diagnósticos mais acurados e de novas estratégias de tratamentos por meio da identificação de novos alvos terapêuticos. Entretanto, isso só será possível após a elucidação dos mecanismos patofisiológicos exercidos por essas novas variantes genéticas.

2.6 Diversos fatores de risco ambientais estão associados com a doença Alzheimer

Uma das abordagens que ajudam a elucidar os mecanismos envolvidos em doenças complexas como a DA é examinar os seus fatores de risco. A idade é o fator de risco mais importante para a demência, porém, a DA esporádica deriva, provavelmente, de um conjunto complexo de fatores genéticos e ambientais adicionais que representam um desafio para a prevenção da demência. O desenvolvimento de novos tratamentos e/ou novas estratégias de prevenção à doença dependem, em grande parte, do entendimento desses fatores.

Em um estudo de metanálise, Barnes e Yaffe (2011) calcularam o risco para DA atribuído aos seguintes fatores de risco: diabetes melito, hipertensão, obesidade, depressão, sedentarismo, tabagismo e baixa escolaridade. Os resultados mostraram que a baixa escolaridade contribui globalmente para a maior proporção de casos de DA, seguido do tabagismo, do sedentarismo, da depressão, da obesidade na meia vida, da hipertensão e do diabetes (Tabela 3).

Tabela 3. Fatores de risco modificadores para a doença Alzheimer (modificado de Barnes e Yaffe, 2011)

| Fatores de risco | Prevalência populacional, % | Risco relativo, OR (95% IC) |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Baixa escolaridade | 40.0 | 1.59 (1.35–1.86) |
| Tabagismo | 27.4 | 1.59 (1.15–2.20) |
| Sedentarismo | 17.7 | 1.82 (1.19–2.78) |
| Depressão | 13.2 | 1.90 (1.55–2.33) |
| Obesidade na meia vida | 3.4 | 1.60 (1.34–1.92) |
| Hipertensão na meia vida | 8.9 | 1.61 (1.16–2.24) |
| Diabetes melito | 6.4 | 1.39 (1.17–1.66) |

OR = Odds ratio, IC = intervalo de confiança.

Juntos, esses fatores podem responder por cerca de 50% dos casos de DA no mundo. Dessa forma, a melhor estratégia de prevenção, segundo os autores, seria a eliminação da baixa escolaridade (19.1% prevenidos), do tabagismo (13.9% prevenidos) e do sedentarismo (12.7% de casos de DA prevenidos). Se todos os sete fatores de risco fossem eliminados, cerca de 50% dos casos de DA poderiam ser prevenidos. Entretanto, considerando a impossibilidade

de atingir tal objetivo, os autores calcularam a redução na prevalência da DA, considerando uma redução na exposição aos fatores de risco em 10 e 25%. Usando uma estimativa de 7.7 milhões de novos casos de DA por ano no mundo, os autores reportaram que uma redução dos fatores de risco em 10% preveniria em 3.3% ao ano os novos casos de DA enquanto que uma redução em 25% preveniria 680 mil novos casos (8.8%) anualmente.

2.7 O estresse oxidativo contribui para a patogênese da doença Alzheimer

O estresse oxidativo é uma condição que representa um desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a habilidade do corpo de detoxificar os intermediários reativos ou de reparar os danos resultantes desse processo (MUNIZ et al., 2008). Essa condição é considerada um dos principais fatores que contribuem para a patogênese de várias doenças neurodegenerativas, incluindo a DA, e evidências crescentes apontam para o envolvimento dos radicais livres em mediar a morte neuronal nessas doenças. A mitocôndria é o sítio chave para a geração de ROS, o que leva às reações oxidativas. A disfunção mitocondrial e danos oxidativos são processos inerentes ao envelhecimento, o que reforça a hipótese de que contribuem para o desenvolvimento da DA. Os danos causados pelo estresse oxidativo afeta virtualmente todos os componentes celulares e macromoléculas biológicas, tais como DNA, proteínas, lipídios e carboidratos (HERRUP, 2012; MECOCCI et al., 2002).

O cérebro é altamente susceptível ao ataque de radicais livres e é o maior alvo da peroxidação de lipídios. Isso ocorre porque ele consome cerca de 1/5 do oxigênio inspirado e contém altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados. Além disso, o cérebro é particularmente deficiente em antioxidantes (CHRISTEN, 2000; BEAL, 1995). Em geral, cerca de 2% do oxigênio consumido pelas células durante a fosforilação oxidativa é convertido em ROS, mas essa taxa

pode ser maior em indivíduos com fosforilação oxidativa comprometida, como na DA (CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979). Apesar de o cérebro ser o órgão mais afetado na DA, muitos estudos mostraram que alterações estruturais e funcionais podem ser detectadas em tecidos periféricos. Em pacientes com DA, alterações do metabolismo de A β foram detectadas em plaquetas (Di LUCA et al., 1998) e níveis aumentados de dano oxidativo ao DNA e expressão reduzida de heme-oxidase de RNA mensageiro foram detectados em linfócitos (MECOCCI et al., 1998; SCHIPPER et al., 2000).

As espécies reativas intermediárias produzidas sob condições de estresse oxidativo também causam oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados da bicamada lipídica da membrana celular, levando à formação de aldeídos que propagam e amplificam os danos oxidativos (Figura 4). Entre eles, os mais abundantes são 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) e malondialdeído (MDA), enquanto que a acroleína é o aldeído mais raro e o mais reativo (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991; PIZZIMENTI et al., 2013). Esses compostos podem alterar várias funções celulares, macromoléculas citoplasmáticas e nucleares, mesmo longe do sítio de origem (NEGRE-SALVAYRE et al., 2008).

A peroxidação lipídica tem um papel importante na patogênese de muitos tipos de injúrias aos tecidos, especialmente em danos teciduais induzidos por substâncias tóxicas (UCHIDA, 2013). Estudos de danos oxidativos mostraram um aumento significativo de peroxidação lipídica em várias regiões cerebrais de pacientes com EOAD (LOVELL; MARKESBERY, 2007; BUTTERFIELD; BADER-LANGE; SULTANA, 2010).

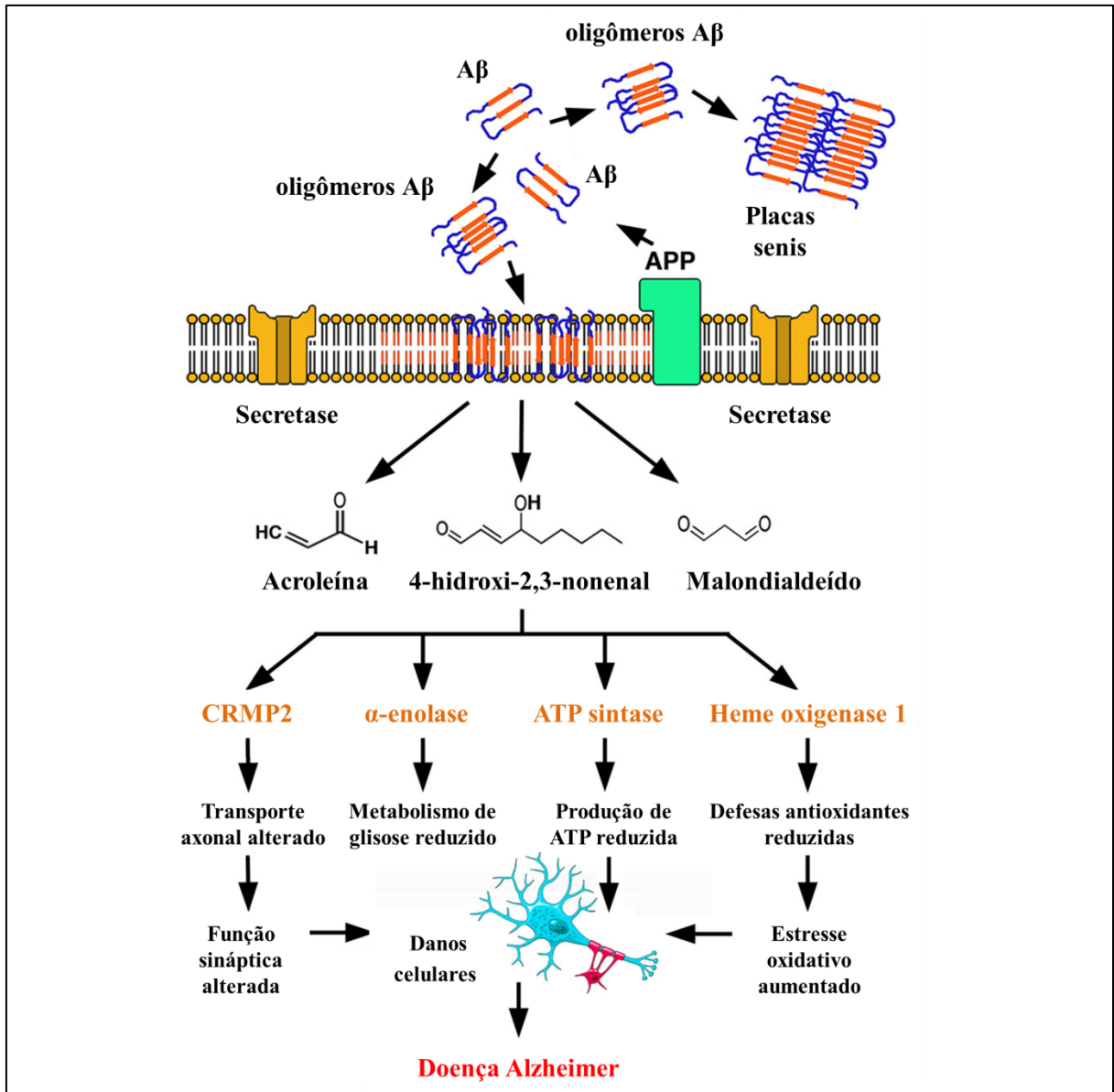


Figura 4. Modelo redox para a patogênese da doença Alzheimer (adaptado de SULTANA; PERLUIGI; BUTTERFIELD, 2012). O peptídeo β -amiloide é gerado por clivagem proteolítica sequencial da proteína precursora do amiloide (APP) por secretases. A β sofre agregação, com formação de oligômeros, que sofrem transição conformacional para oligômeros β -estruturados difusíveis e eventualmente se depositam na forma de placas amiloides. Os oligômeros A β se inserem na membrana plasmática, onde iniciam a peroxidação lipídica, levando à produção de aldeídos reativos, tais como acroleína, HNE e MDA. A formação dos adutos compromete a função de proteínas críticas envolvidas em neurotransmissão, metabolismo energético, função mitocondrial, defesa antioxidante – aqui representada por CRMP2 (collapsin response mediated protein 2), α -enolase, ATP sintase subunidade α e heme oxigenase 1. Tais processos são autoalimentados e estão envolvidos na doença Alzheimer (PIZIMENTI et al., 2013).

O malondialdeído é amplamente utilizado como biomarcador para a peroxidação lipídica.

MDA pode existir livre ou conjugado a vários constituintes teciduais e é reconhecidamente

mutagênico e carcinogênico uma vez que reage com bases de ácidos nucleicos para formar diversos aductos (MARNETT, 1999). MDA pode ser quantificado em espectrofotômetro ou HPLC por meio do teste TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (NEGRE-SALVAYRE et al., 2010).

O ensaio TBARS se baseia na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) com uma molécula de MDA para formar um pigmento rósea com máxima absorção em solução ácida nos comprimentos de onda de 532 a 535 nm (Figura 5). O coeficiente de extinção molar desse pigmento a 535 nm e pH = 1 é $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (SINNHUBER; YU; YU, 1958) e pode ser utilizado para determinar diretamente a concentração de MDA a partir do sobrenadante (VALENZUELA, 1991). Níveis aumentados de MDA foram detectados em plasma e em eritrócitos de pacientes com DA (MARCHASSON-BOURDEL et al., 2001; DELIBAS; OZCANKAYA; ALTUNTAS, 2002).

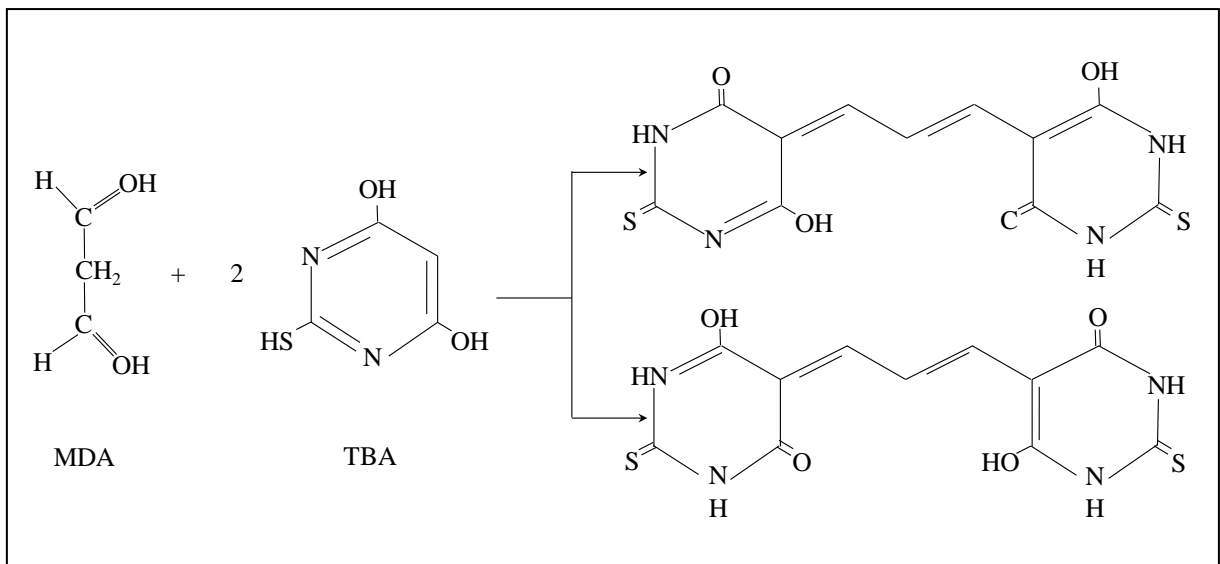


Figura 5. Reação de MDA com TBA e estruturas tautoméricas dos aductos formados (desenhado a partir de VELANZUELA, 1991).

2.8 Danos cromossômicos estão associados a doenças neurodegenerativas

As pesquisas em genética e biologia molecular forneceram informações valiosas acerca dos genes e dos mecanismos envolvidos na DA. Atualmente, há um interesse crescente em avaliar a presença de danos cromossômicos em células somáticas de sangue periférico de pacientes com doenças neurodegenerativas. Os danos ao genoma podem alterar a dosagem e a expressão gênica e contribuir para o risco de morte celular acelerada em tecidos neuronais. Atualmente, diversos ensaios citogenéticos permitem avaliar eventos de instabilidade genômica. Dentre eles, o teste do micronúcleo é considerado uma das melhores técnicas citogenéticas para avaliação de danos cromossômicos em seres humanos.

Os micronúcleos (MN) aparecem nas células-filhas em decorrência de danos induzidos nas células parentais. Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebras podem não ser incorporados ao núcleo principal das células-filhas após a mitose e uma membrana se formará ao redor do fragmento, gerando um pequeno núcleo separado do núcleo principal. A origem do micronúcleo também pode decorrer de perda de um cromossomo inteiro, quando ocorre dano ao aparelho mitótico da célula, ou no próprio cromossomo (FENECH, 2000).

O ensaio do micronúcleo com o bloqueio da citocinese (CBMN) em linfócitos humanos foi desenvolvido por Fenech e Morley (1985) e usa citocalasina-B, um inibidor da polimerização da actina, necessária para a formação do anel de microfilamentos que contrai o citoplasma entre as células-filhas, o que impede a citocinese, embora permita a divisão nuclear (CARTER, 1967). Como resultado, são produzidas células binucleadas (Figura 6), que são contadas para a presença de MN, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares (FENECH et al., 2003). O ensaio CBMN é o método mais frequente de biomonitoramento de populações humanas e é utilizado para avaliar exposição a agentes genotóxicos, deficiência ou excesso de micronutrientes e instabilidade genética (BOLOGNESI; FENECH, 2013).

Os critérios para seleção das células binucleadas durante a análise microscópica são bem estabelecidos e estão descritos a seguir: Os MNs devem ser computados em células binucleadas com membrana celular e citoplasma intactos. Os dois núcleos devem apresentar tamanhos semelhantes e não podem estar sobrepostos. Os MNs possuem formato oval ou arredondado, com 1/16 a 1/3 do diâmetro do núcleo principal, não ligados nem sobrepostos ao núcleo e apresentam coloração semelhante à coloração nuclear (FENECH, 2000).

As pontes nucleoplasmáticas (Figuras 6 e 7) também são computadas em células binucleadas e são ligações contínuas entre os dois núcleos. Segundo Fenech e colaboradores (2003), sua origem está relacionada a cromossomos dicêntricos que tiveram seus centrômeros puxados para polos opostos durante a anáfase. Outro marcador de danos citogenéticos que pode ser avaliado pelo ensaio CBMN são os brotos nucleares (Figura 6), estruturas que se assemelham ao micronúcleo, porém permanecem ligados ao núcleo principal. Acredita-se que essa estrutura seja DNA amplificado eliminado do núcleo durante a fase S do ciclo celular (SHIMIZU et al., 1998; SHIMIZU; SHIMUARA; TANAKA, 2000).

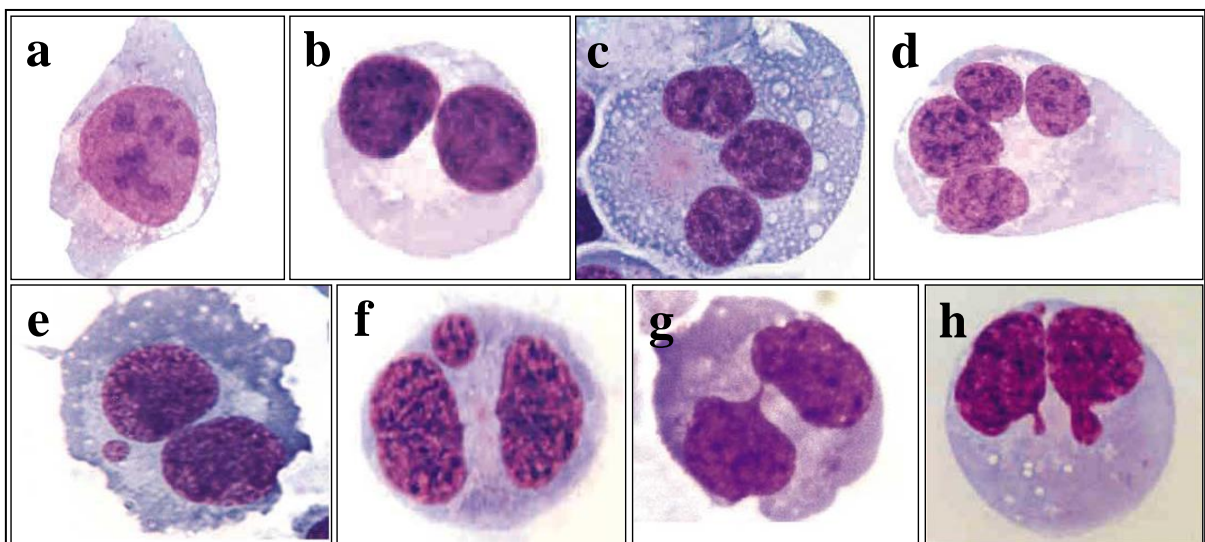


Figura 6. Fotomicrografias de células obtidas no ensaio CBMN. Célula mononucleada (A), binucleada (B), trinucleada (C) e tetranucleada (D). Célula binucleada com micronúcleo (E), célula trinucleada com um núcleo menor (F), célula binucleada com ponte nucleoplasmática (G) e célula binucleada com brotos nucleares (H) (reproduzido a partir de FENECH et al., 2003).

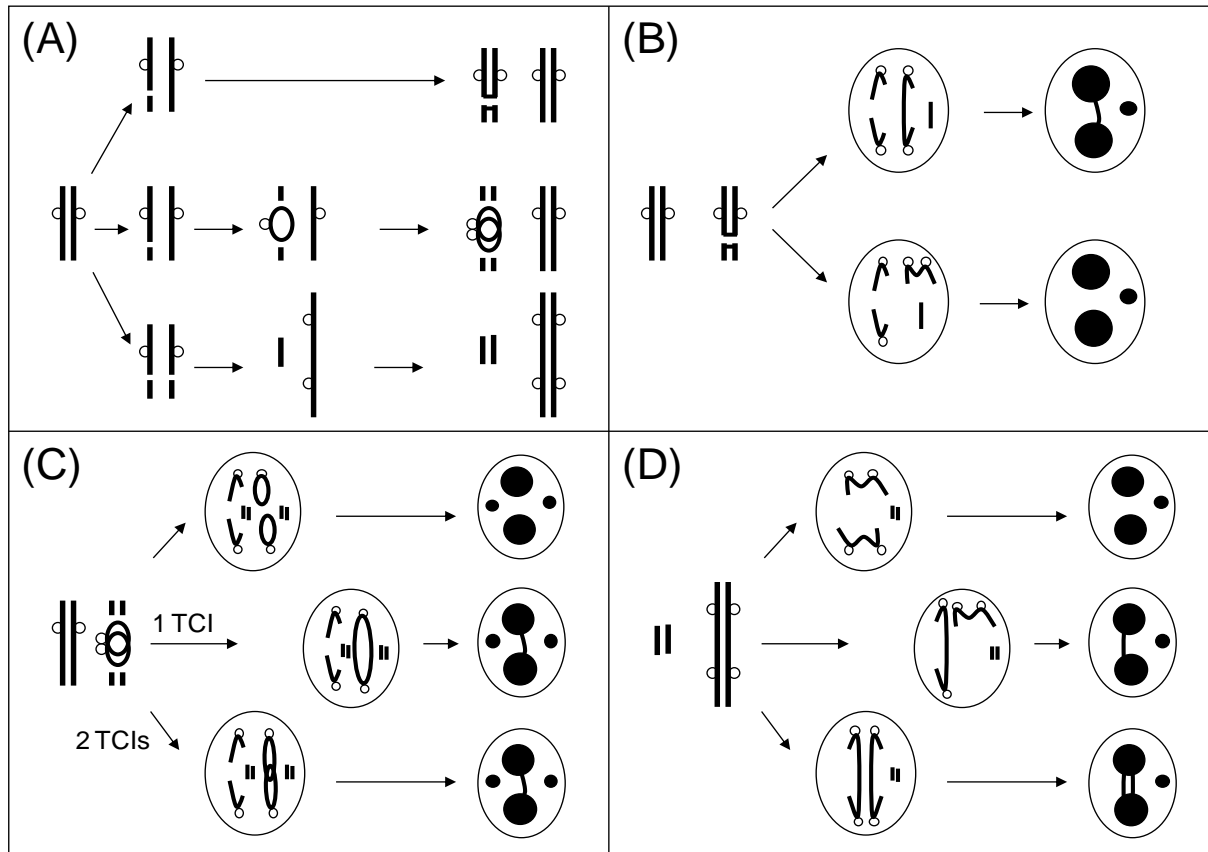


Figura 7. Mecanismos de formação de pontes nucleoplasmáticas. (A) Eventos iniciais na formação de pontes nucleoplasmáticas (PNP). (Acima) Quebra de dupla fita de DNA é induzida em um cromossomo, mas permanece sem reparo até após a replicação. A ligação incorreta das extremidades quebradas após a replicação leva à formação de uma cromátide dicêntrica e um fragmento acêntrico. (Meio) Duas quebras de fita dupla em ambos os lados do centrômero de um cromossomo são induzidas. As extremidades quebradas são mal reparadas produzindo uma cromátide em anel e dois fragmentos acêntricos que são subsequentemente replicados. (Abaixo) As quebras de fita dupla são induzidas em dois cromossomos homólogos ou não homólogos. A má ligação das extremidades quebradas leva à formação de uma cromátide dicêntrica e de um fragmento acêntrico que são subsequentemente replicados. (B) (Acima) Os centrômeros de cromátides dicênticas são puxados para polos opostos da célula durante a anáfase para formar uma PNP e o fragmento cromatídico acêntrico atrasado forma um MN. (Abaixo) Os centrômeros de uma cromátide dicêntrica são puxados para o mesmo polo da célula e nenhuma PNP é formada. Entretanto, o fragmento cromatídico acêntrico atrasado resulta na formação de um MN. (C) (Acima) As cromátides em anel são segregadas normalmente, mas os fragmentos acêntricos atrasados na anáfase formarão dois MN. (Meio) As duas cromátides em anel, após completarem uma troca de cromátides irmãs (TCI) se transformam em um grande anel cromatídico dicêntrico que leva à formação de uma PNP quando os centrômeros são puxados para polos opostos da célula na anáfase. Os fragmentos acêntricos em atraso na anáfase formarão dois MN. (Abaixo) As duas cromátides em anel após completarem duas TCIs, tornam-se concatenadas, levando à formação de uma PNP quando os centrômeros são puxados para os polos opostos da célula na anáfase. Os fragmentos acêntricos em atraso na anáfase formarão dois MN. (D) (Acima) Os centrômeros das cromátides dicênticas são puxados para o mesmo polo da célula e nenhuma PNP é formada. (Meio) Os centrômeros de uma das cromátides dicênticas são puxados para o mesmo polo da célula levando à formação de uma PNP. (Abaixo) Os centrômeros de ambas as cromátides dicênticas são puxados para polos opostos da célula e duas PNP são formadas. Em cada caso acima, um MN é formado a partir de um fragmento cromossômico acêntrico que acompanha o cromossomo dicêntrico (adaptado de THOMAS; UMEGAKI; FENECH, 2003).

Migliore e colaboradores (1997) relataram elevados níveis de micronúcleos (MN) em linfócitos de sangue periférico de pacientes com DA. Nessa mesma linha, Petrozzi e colaboradores (2002) mostraram que pacientes com doença de Parkinson apresentam frequência significativa de MN em linfócitos de sangue periférico, quando comparado com controles. Os prováveis mecanismos envolvidos nesses danos são alterações na estrutura dos microtúbulos, quebras cromossômicas e cromatídicas. Os autores relacionaram a alta frequência dessas quebras com o estresse oxidativo elevado.

O ensaio do MN aplicado a células esfoliadas de mucosa bucal (BMNcyt) permite para mensurar danos ao DNA em tecidos facilmente acessíveis e não requer cultura *in vitro* (BOLOGNESI; FENECH, 2013). As células da mucosa bucal são facilmente coletadas usando um *swab* ou espátula de madeira para exfoliação suave da mucosa bucal do paciente. Esse método é minimamente invasivo e não causa estresse aos indivíduos.

Os critérios de análise dos diversos tipos celulares usualmente utilizados foram descritos por Tolbert, Shy e Allen (1992), que classificam as células bucais em categorias que distinguem células normais de anormais com base em características citológicas e nucleares. Assim, o ensaio BMNcyt vem sendo utilizado para mensurar a frequência de biomarcadores de danos ao DNA (micronúcleo e/ou brotos nucleares), defeitos na citocinese (células binucleadas), morte celular (células com cromatina condensada, cariorréticas, picnóticas ou cariolíticas) além do potencial proliferativo (células basais) (THOMAS et al., 2009). Os critérios para análise desses tipos celulares são descritos detalhadamente no protocolo publicado por Thomas e colaboradores (2009), que recomenda a contagem de 1000 células (basais e diferenciadas) para computar a frequência de células picnóticas, cariorréticas, cariolíticas, binucleadas e com cromatina condensada. A frequência de MN e brotos nucleares é realizada a partir da análise de no mínimo 2000 células. A Figura 8 esquematiza os diversos tipos

celulares analisados no ensaio e os mecanismos atualmente aceitos para explicar a origem de cada evento. Na Figura 9 são mostradas fotomicrografias obtidas no ensaio BMNcyt.

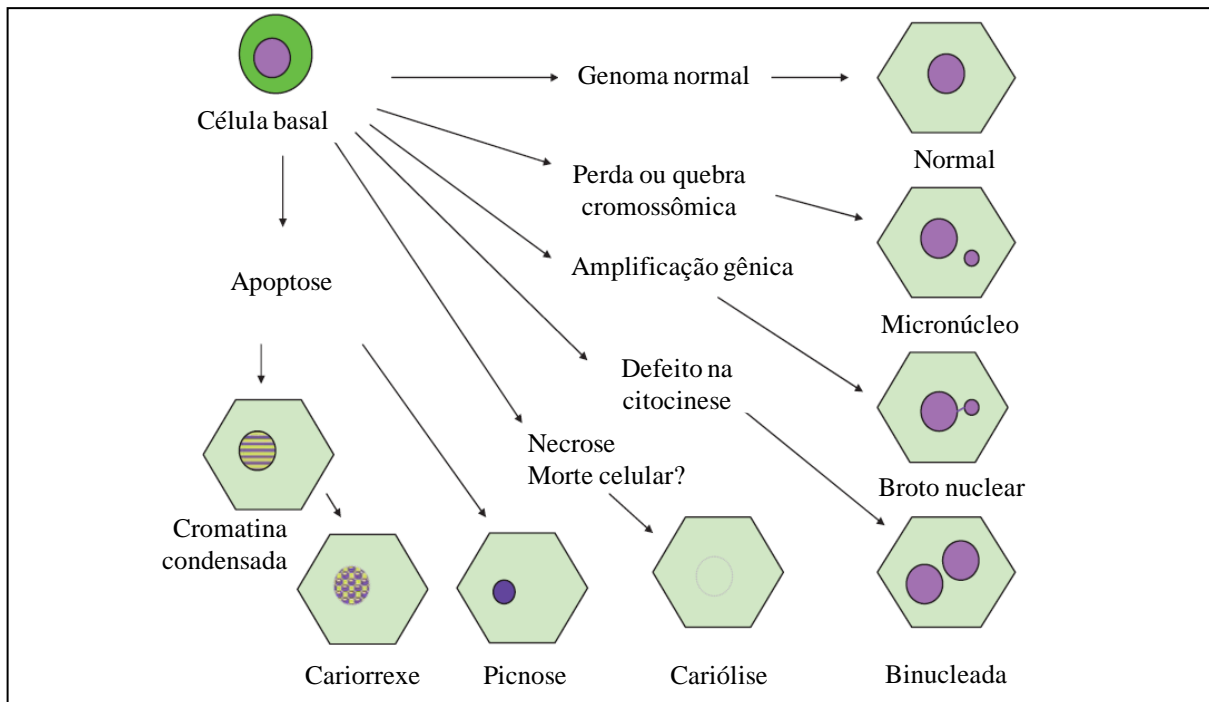


Figura 8. Diagrama representando vários tipos celulares analisados no ensaio BMNcyt e os possíveis mecanismos que os originam (adaptado de THOMAS et al., 2009).

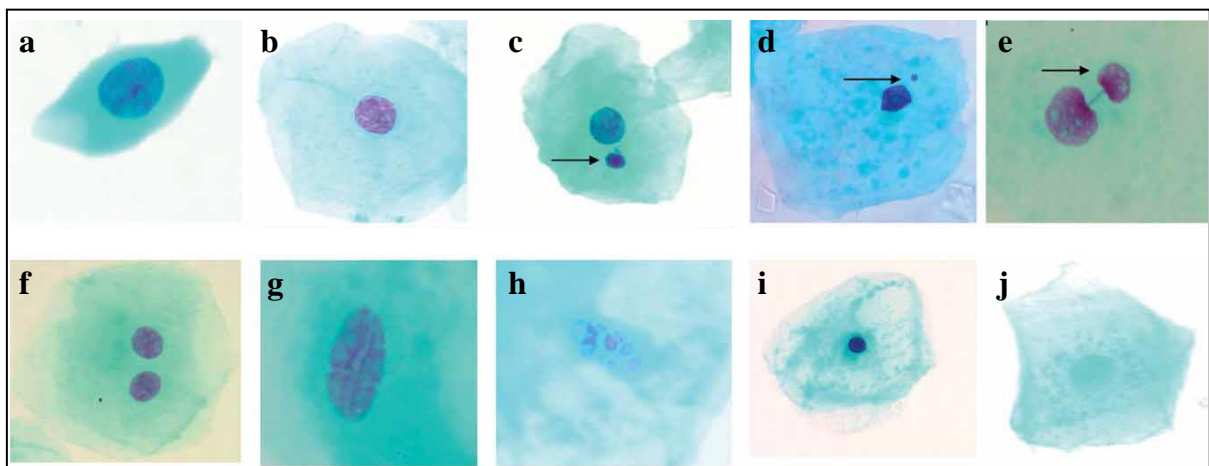


Figura 9. Fotomicrografias de diversos tipos celulares analisados no ensaio BMNcyt. Célula basal (a), célula diferenciada (b), célula diferenciada jovem e com micronúcleo (c), célula diferenciada tardia com micronúcleo (seta, d), célula diferenciada com broto nuclear (seta, e), célula binucleada (f), célula com cromatina condensada (g), célula cariorrética (h), célula picnótica (i), célula cariolítica (j). Reproduzido de Thomas et al. (2009).

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram avaliar as frequências de polimorfismos genéticos e a frequência de danos genômicos em células somáticas de pacientes com doença Alzheimer e controles.

3.1 Objetivos específicos

- (i) Avaliar as frequências dos polimorfismos rs11136000 do gene *CLU* e rs6701713 do gene *CRI* em pacientes com DA e controles pareados para verificar a possível associação desses polimorfismos com a doença, isoladamente ou em associação com *APOE-ε4*.
- (ii) Avaliar a frequência de danos genômicos em linfócitos de sangue periférico e em células de mucosa bucal de pacientes com DA e controles por meio do ensaio do micronúcleo.
- (iii) Quantificar o produto de peroxidação lipídica malondialdeído em plasma de pacientes com DA e controles por meio do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico para estimar o nível de estresse oxidativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão serão mostrados na forma de artigos científicos resultantes de dados obtidos com o desenvolvimento do trabalho de Tese.

4.1 CAPÍTULO 1 – Protective effect of the *ApoE*-e3 allele in Alzheimer's disease*

Almada BVP, Almeida LD, Camporez D, Moraes MVD, Morelato RL, Perrone AMS, Belcavello L, Louro ID and Paula F. **Braz J Med Biol Res**, January 2012, Volume 45(1) p. 8–12.

* Este manuscrito resultou de um estudo de colaboração com o Biol. Bruno Almada, que estudou polimorfismos no gene *APOE*. Assim, optamos por não apresentar os resultados referentes a esses polimorfismos nas seções Resumo e Objetivos.

4.2 CAPÍTULO 2

Este manuscrito resultou de um estudo de colaboração com a Biol. Daniela Camporez, que estudou polimorfismos nos genes *MTHFR* e *PICALM*. Assim, optamos por não apresentar os resultados referentes a esses polimorfismos nas seções Resumo e Objetivos. Manuscrito submetido ao periódico *Molecular Biology Reports*.

Association of *MTHFR* and *PICALM* polymorphisms with Alzheimer's disease*

Luciano Belcavello^{a*}, Daniela Camporez^a, Leila D. Almeida^a, Renato L. Morelato^b, Maria C. P. Batitucci^a, Flavia de Paula^a

^aHuman Molecular Genetics Center, Department of Biological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil. ^bSchool of Health Sciences of the Santa Casa of Vitória, EMESCAM, Vitória, ES, Brazil. (L. Belcavello and D. Camporez contributed equally to this study)

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a complex neurodegenerative disorder and the primary cause of dementia in the elderly and causes a decrease in cognition, functionality, and behaviour. Genetic risk factors play an important role in the pathogenesis of AD. In this case-control study, we aimed to investigate whether single nucleotide polymorphisms in *MTHFR* (rs1801133), *PICALM* (3851719), *CLU* (rs11136000), and *CRI* (rs6701713) are associated with AD. Genotype frequencies were evaluated in 82 late-onset AD patients and 161 elderly healthy controls matched by age and gender. We detected a significant association of the *MTHFR* rs1801133 and *PICALM* rs3851179 polymorphisms with AD. The results of this study support the hypothesis that several genes are involved in the aetiology of AD.

Keywords: Alzheimer's disease; Case-control study; *MTHFR*; *PICALM*; *CLU*; *CRI*; Polymorphisms; Brazilian population.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a complex and progressive neurodegeneration characterised by large numbers of senile plaques and neurofibrillary tangles in the brain [1]. This disease is the primary cause of dementia among elderly persons and is commonly classified into two types according to age at onset: early onset forms (EOAD), which begin before 65 years of age, and late-onset forms (LOAD), which begin after this age [2]. EOAD represents approximately 1% of cases and is associated with autosomal dominant inheritance and mutations in genes encoding the amyloid precursor protein, presenilin 1, and presenilin 2 [3]. LOAD, which is the more common form of the disease, has not yet been fully defined genetically; in fact, until recently, the only reliable risk factor was the $\epsilon 4$ allele of apolipoprotein E (*APOE*). In the last few years, genome-wide association studies identified variants in the genes encoding clusterin (*CLU*), complement receptor 1 (*CRI*), and phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein (*PICALM*) [4–9]. After *APOE*, these are the most relevant genes involved in AD. However, although one *APOE- $\epsilon 4$* allele increases the AD risk by up to 4-fold, these loci confer only 0.10- to 0.15-fold increases in the AD risk [10]. Some studies have reported that variants in the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) are also involved with an increased risk to develop AD, but the influences of *MTHFR* in the aetiology of AD are controversial [11]. The search for risk-associated alleles may provide specific pathways that will help clarify our understanding of the aetiology of AD. Furthermore, the identification of a set of polymorphisms associated with susceptibility to AD may be useful for the complementary diagnosis of the disease. Because genetic associations should be validated in different populations, we investigated whether genetic polymorphisms in *MTHFR*, *PICALM*, *CLU*, and *CRI* are associated with AD in a cohort of the Brazilian population.

Materials and Methods

Study subjects

Peripheral blood samples were collected from 243 non-consanguineous individuals from Vitória, Espírito Santo State, Brazil. Among them, 82 were AD patients, and 161 were healthy elderly controls. The sample of AD patients was composed of 61.04% subjects of European origin and 38.96% of African origin, whereas the sample of controls was composed of 56.33% subjects of European origin and 43.67% of African origin. A total of 60.27% of the AD patients had formal education, and 39.73% were illiterate, whereas 67.55% and 32.45% of the subjects of the control sample had formal education and were illiterate, respectively. The mean age of the samples was 81.16 ± 7.47 in the AD group, which was composed of 54 females and 28 males, and 79.36 ± 7.86 in the control group, which was composed of 118 females and 43 males. All of the cases fulfilled the clinical criteria for probable AD [12] and had a complete diagnostic evaluation for dementia, including CT scan, standard laboratory tests performed at the time of diagnosis and repeated after two years (complete blood count, serum electrolytes, serum glucose, blood urea nitrogen, vitamin B12, folate, thyroid function, and syphilis serology), Mini-Mental State Examination (MMSE) [13], and Clinical Dementia Rating Scale (CDR) [14]. All of the patients received treatment with cholinesterase inhibitors at the time of enrolment in the study. The control sample consisted of volunteers who presented a score greater than 28 on the MMSE and who did not have a cognitive deficit or known relatives with AD. The study was approved by the Emescam (School of Health Sciences of the Santa Casa de Misericórdia de Vitória) Ethics Committee, and written informed consent was obtained from all of the subjects enrolled in the study. This protocol was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Genotyping

The genomic DNA from the blood samples was extracted according to the methodology described by Miller et al. [15]. The samples were genotyped by PCR - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for the following SNPs: rs1801133 (*MTHFR*), rs3851179 (*PICALM*), rs11136000 (*CLU*), and rs6701713 (*CRI*).

MTHFR rs1801133 genotyping

For detection of the presence or absence of the *MTHFR* rs1801133 polymorphism, we used the oligonucleotides described by Skibola et al. [16]. The PCR conditions involved an initial denaturation step of 94 °C for 10 min, 35 cycles of 94 °C for 35 s, 60 °C for 35 s, and 72 °C for 30 s, and a final extension phase of 72 °C for 10 min. The amplified products were digested with the HinfI restriction enzyme (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), electrophoresed on a 7% polyacrylamide gel, and stained with silver nitrate.

PICALM rs3851179 genotyping

A 226-bp fragment was amplified from the genomic DNA using the forward and reverse oligonucleotides 5'-CCC TGC GGT AAA TCT GAA T-3' and 5'-ACT ATT AAC CCG CTT CAT AGG G-3', respectively. The PCR conditions involved an initial denaturation step of 94 °C for 3 min, 30 cycles of 94 °C for 30 s, 62 °C for 25 s, and 72 °C for 30 s, and a final extension phase at 72 °C for 10 min. The amplified products were digested with SspI (NEB, USA), electrophoresed, and analysed as described above.

CLU rs11136000 genotyping

A 174-bp fragment was amplified from the genomic DNA using the forward and reverse oligonucleotides 5'-CTA TTG CAA CCA TGC CTC CT-3' and 5'-CTC CCA AAG TGC

TGG GAT TA-3', respectively, under the following amplification conditions: an initial denaturation step of 94 °C for 5 min, 32 cycles of 94 °C for 30 s, 63 °C for 25 s, and 72 °C for 30 s, and a final extension step at 72 °C for 10 min. The PCR products were cleaved by *ApoI* (NEB, USA) at 50 °C for 15 h, electrophoresed, and analysed as described above.

CRI rs6701713 genotyping

A 243-bp fragment was amplified from the genomic DNA using the forward and reverse oligonucleotides 5'-GCC CAG AGG AGG TGT TAC AG-3' and reverse 5'-ACA ACT CAG GAC CCA CCA AA-3', respectively. The PCR conditions involved an initial denaturation step of 94 °C for 5 min followed by 30 cycles of 94 °C for 30 s, 65 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s and a final extension step at 72 °C for 10 min. The PCR products were cleaved by *BtsI* (NEB, USA) at 55 °C for 18 h, and the restriction products were analysed as described above.

APOE genotyping

The *APOE*- ϵ 4 genotypes of all of the cases and controls were previously determined through restriction enzyme approach using the standard protocol procedure described by Almada et al. [17].

Statistical analysis

Chi-square and Fisher's exact tests were used to compare categorical variables and to test the deviation of each polymorphism from the Hardy-Weinberg equilibrium. Logistic regression was used to investigate the association of polymorphisms with AD and to obtain the crude and adjusted odds ratio (OR), confidence interval (95% CI), and *p* values. The crude OR was calculated considering genotypes of the AD group compared with the genotypes of the control group using age, gender, and educational attainment as co-variables. The adjusted OR by

APOE status considered two groups of *APOE* genotypes (presence of one or two $\epsilon 4$ alleles vs. absence of $\epsilon 4$ allele) as well as age, gender and educational attainment as co-variables. Our study groups are a mixed composition of two different population backgrounds (African and European). Because the Brazilian population is characterised by a deeply and peculiar miscegenation and to avoid confounding by population stratification, the analyses did not take this into account. A two-tailed probability value of less than 0.05 was considered to be statistically significant. The statistical analyses were performed using the SPSS 19.0 package.

Results

With the exception of *CRI* rs6701713, the distributions of the polymorphisms did not deviate from those predicted by the Hardy–Weinberg equilibrium in both the cases and the controls ($p < 0.05$). Therefore, we excluded the *CRI* polymorphism from the posterior analyses.

Table 1 summarises the genotype distribution of the *MTHFR*, *PICALM*, *CLU*, and *CRI* genotypes in the AD patients and control group. No statistically significant differences in age ($p = 0.877$), gender ($p = 0.236$), educational attainment ($p = 0.298$), and ethnic distribution ($p = 0.573$) were observed between the groups. The comparison of the genotype frequency distribution in the AD patients and control group showed a statistically significant difference in the *MTHFR* CT genotype ($p = 0.030$) and the *PICALM* GG genotype ($p = 0.033$). However, we did not detect any statistically significant differences between the groups in the distributions of the *CRI* and *CLU* genotypes through a simple association analysis. As expected, the *APOE*- $\epsilon 4$ allele was highly associated with AD in our dataset (OR = 3.069; 95% CI = 1.768–5.329, $p < 0.0001$).

After adjustment for age, gender, educational attainment, and *APOE*- $\epsilon 4$ status, the logistic regression analysis showed that AD remained statistically associated with *MTHFR* CT (OR =

2.446, 95% CI = 1.207–4.958, $p = 0.013$) and *PICALM* GG (OR = 14.276, 95% CI = 2.049–99.440, $p = 0.007$; Table 2).

Discussion

The AlzGene (<http://www.alzgene.org>) meta-analyses of all available LOAD association studies have demonstrated significant genetic association for *PICALM* (OR = 0.88, 95% CI = 0.86–0.90) *CLU* (OR = 0.88, 95% CI = 0.86–0.90) and *CRI* (OR = 1.17, 95% CI = 1.12–1.23) variants in Caucasians. However, meta-analyses of *MTHFR* rs1801133 have revealed that this variant is not associated with LOAD [18]. In this study, we demonstrate that *MTHFR* rs1801133 and *PICALM* rs3851179 act as independent risk factors for AD.

Because educational attainment is related to dementia [19], we considered this co-variable in the logistic regression analysis. The mechanism through which education modifies the expression of dementia is currently unknown. However, it is hypothesised that education and mental stimulation may create a cognitive reserve that reduces the effects of dementia in individuals who are experiencing neurodegenerative changes [20].

The enzyme 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) catalyses the conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate, which is the major form of folate in plasma and an important component for the functioning of the central nervous system [21, 22]. The common genetic polymorphism *MTHFR* rs1801133 replaces a cytosine by a thymine (C>T) at base position 677 and reduces the enzyme activity, which in turn alters the normal level of folate in the organism [21]. Nevertheless, the involvement of *MTHFR* rs1801133 with AD is not consensual. Some studies have reported an association of this polymorphism with increased risk of AD in the Asian population but not in Caucasians [11, 22]. In contrast, Da Silva et al. [23], Mansoori et al. [24], and Mansouri et al. [25] did not find similar results in

their studies. Interestingly, our results show that the CT genotype increases the odds to develop the disease by 2.4-fold in our sample, which was composed of 61.04% Caucasians. However, we failed to detect an association of the TT genotype with the disease. This lack of association may be partly explained by the small number of patients with the homozygous variant (TT) in our study (4.88%).

PICALM encodes phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein, which is involved in clathrin-mediated endocytosis and appears to participate in amyloid precursor protein processing [2, 26]. In recent years, genome-wide association studies (GWAS) revealed an association of *PICALM* rs3851179 with reduced risk of AD [1, 4, 7–9]. In our study, this polymorphism appears to act as a risk factor for AD, which is the opposite of the effect observed in the original publication. However, some variants may show association with AD risk with effects in one or the other direction, as reported by Cousin et al. [27]. Additionally, due to the limited sample size, these results should be confirmed with larger cohorts.

CRI encodes complement receptor 1, which is involved in complement activation and appears to protect against neurotoxicity by participating in the clearance of peripheral A β peptides [5, 28], an important AD-related peptide. This mechanism appears to be deficient in AD [29]. *CRI* was reported to be associated with AD [4], but the literature on the *CRI* rs6701713 polymorphism is currently scarce.

CLU encodes clusterin, which interacts with β -amyloid and influences the aggregation and toxicity of this peptide [30]. It has been proposed that, similarly to *APOE*, *CLU* may participate in the clearance of A β 42 from the brain [31]. However, the biological function of the *CLU* markers associated with Alzheimer's disease is currently unknown. Harold et al. and Lambert et al. [4, 5] also reported an association of *CLU* rs11136000 with reduced risk of AD. These results were replicated by other research groups [1, 32]. Contrary to these studies

that used large case-control datasets, we performed our study with a smaller sample, which may partially explain the lack of association found for *CLU* rs11136000 with AD in our cohort. Similarly to our study, Yu et al. [3] did not associate this polymorphism with AD in the Chinese population. Moreover, the high ethnical variability in the Brazilian population may mask the relevance of some genetic markers and/or other susceptibility genes may operate as risk factors in this population [33], and these facts may be at least partly responsible for the controversial results. In conclusion, our data provide the first demonstration that genetic variants in *MTHFR* and *PICALM* may be associated with late-onset Alzheimer disease in Brazilians.

Acknowledgments

The authors thank the participating AD patients, their families, and the control subjects. The authors acknowledge the funding support provided by FACITEC (Fundo de Apoio à Ciência e Tecnologia de Vitória), FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo), and MCTI/CNPQ/MEC/CAPES.

Disclosure statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. Carrasquillo MM, Belbin O, Hunter TA, Ma L, Bisceglia GD, Zou F et al (2010) Replication of *CLU*, *CR1*, and *PICALM* associations with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 67:961–964
2. Lambert JC, Amouyel P (2011) Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis? *Curr Opin Genet Dev* 21:295–301

3. Yu JT, Li L, Zhu QX, Zhang Q, Zhang W, Wu ZC et al (2010) Implication of CLU gene polymorphisms in Chinese patients with Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta* 411:1516–1519
4. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML et al (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41:1088–1093
5. Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M et al (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41:1094–1099
6. Seshadri S, Fitzpatrick AL, Ikram MA, DeStefano AL, Gudnason V, Boada M et al (2010) Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA* 303:1832–1840
7. Jun G, Naj AC, Beecham GW, Wang LS, Buross J, Gallins PJ et al (2010) Meta-analysis confirms CR1, CLU, and PICALM as Alzheimer disease risk loci and reveals interactions with APOE genotypes. *Arch Neurol* 67:1473–1484
8. Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert JC, Carrasquillo MM et al (2011) Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 43:429–435
9. Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang LS, Vardarajan BN, Buross J et al (2011) Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet* 43:436–441
10. Ferrari R, Moreno JH, Minhajuddin AT, O'Bryant SE, Reisch JS, Barber RC, Momeni, P (2012) Implication of common and disease specific variants in CLU, CR1, and PICALM. *Neurobiol Aging*. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.01.110

11. Hua Y, Zhao H, Kong Y, Ye M (2011) Association between the MTHFR gene and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Int J Neurosci* 121:462–471
12. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34:939–944
13. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975) "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12:189–198
14. Morris JC (1993) The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology* 43: 2412–2414
15. Miller SA, Dykes DD, Polesky HS (1998) Simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215
16. Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, Morgan G (1999) Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12810–12815
17. Almada BV, Almeida LD, Camporez D, Moraes MV, Morelato RL, Perrone AM, Belcavello L, Louro ID, Paula F (2012) Protective effect of the APOE-ε3 allele in Alzheimer's disease. *Braz J Med Biol Res* 45:8–12
18. Bertram L, McQueen M, Mullin K, Blacker D, Tanzi R (2006) The AlzGene database. Available at <http://www.alzgene.org>. Accessed March 2014
19. Barnes DE, Yaffe K (2011) The projected impact of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol* 10:819–828
20. Stern Y (2002) What is cognitive reserve? Theory and research application of the reserve concept. *J Int Neuropsychol Soc* 8:448–460

21. Ford AH, Flicker L, Hankey GJ, Norman P, van Bockxmeer FM, Almeida OP (2012) Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and cognitive impairment: the health in men study. *Mol Psychiatry* 17:559–566
22. Zhang MY, Miao L, Li YS, Hu GY (2010) Meta-analysis of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and susceptibility to Alzheimer's disease. *Neurosci Res* 68:142–150
23. Da Silva VC, Ramos FJ, Freitas EM, de Brito-Marques PR, Cavalcanti MN, D'Almeida V et al (2006) Alzheimer's disease in Brazilian elderly has a relation with homocysteine but not with MTHFR polymorphisms. *Arq Neuro Psiquiatr* 64:941–945
24. Mansoori N, Tripathi M, Luthra K, Alam R, Lakshmy R, Sharma S et al (2012) MTHFR (677 and 1298) and IL-6-174 G/C genes in pathogenesis of Alzheimer's and vascular dementia and their epistatic interaction. *Neurobiol Aging*. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.018
25. Mansouri L, Fekih-Mrissa N, Klai S, Mansour M, Gritli N, Mrissa R (2013) Association of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms with susceptibility to Alzheimer's disease. *Clin Neurol Neurosurg* 115:1693–1696
26. Carey RM, Balcz BA, Lopez-Coviella I, Slack BE (2005) Inhibition of dynamin-dependent endocytosis increases shedding of the amyloid precursor protein ectodomain and reduces generation of amyloid beta protein. *BMC Cell Biol* 6:30
27. Cousin E, Macé S, Rocher C, Dib C, Muzard G, Hannequin D, Pradier L et al (2011) No replication of genetic association between candidate polymorphisms and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 32:1443–1451
28. Rogers J, Li R, Mastroeni D, Grover A, Leonard B, Ahern G et al (2006) Peripheral clearance of amyloid beta peptide by complement C3-dependent adherence to erythrocytes. *Neurobiol Aging* 27:1733–1739

29. Kuo YM, Kokjohn TA, Kalback W, Luehrs D, Galasko DR, Chevallier N et al (2000) Amyloid-beta peptides interact with plasma proteins and erythrocytes: implications for their quantitation in plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 268:750–756
30. Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, Bedi GS, Holtzman DM, Deane R, Zlokovic BV (2007) Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:909–918
31. DeMattos RB, Cirrito JR, Parsadanian M, May PC, O'Dell MA, Taylor JW et al (2004) APOE and clusterin cooperatively suppress A β levels and deposition: evidence that APOE regulates extracellular A β metabolism in vivo. *Neuron* 41:193–202
32. Chen LH, Kao PY, Fan YH, Ho DT, Chan CS, Yik PY et al (2012) Polymorphisms of CR1, CLU and PICALM confer susceptibility of Alzheimer's disease in a southern Chinese population. *Neurobiol Aging*. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.016
33. Oliveira JRM, Nishimura AL, Lemos RR, Zatz M (2009) The genetics of Alzheimer's disease in Brazil: 10 years of analysis in a unique population. *J Mol Neurosci* 37:74–79

Table 1

Absolute and relative genotype frequencies of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *MTHFR*, *PICALM*, *CRI*, and *CLU* genes and *APOE* status in Alzheimer's disease (AD) patients and healthy elderly controls.

| Gene (SNPs) | Genotypes | AD | | Controls | | <i>P</i> |
|------------------------------|---------------------------|----------|-------|----------|-------|----------|
| | | <i>n</i> | % | <i>n</i> | % | |
| <i>MTHFR</i> (rs1801133) | CC | 26 | 31.71 | 70 | 43.48 | – |
| | CT | 52 | 63.41 | 78 | 48.45 | 0.030 |
| | TT | 4 | 4.88 | 13 | 8.07 | 0.434 |
| <i>PICALM</i> (rs3851179) | AA | 33 | 40.24 | 77 | 47.83 | – |
| | AG | 42 | 51.22 | 81 | 50.31 | 1.000 |
| | GG | 7 | 8.54 | 3 | 1.86 | 0.033 |
| <i>CRI</i> (rs6701713) | GG | 43 | 53.09 | 96 | 60.00 | – |
| | GA | 14 | 17.28 | 31 | 19.38 | 0.730 |
| | AA | 24 | 29.63 | 33 | 20.62 | 0.148 |
| <i>CLU</i> (rs11136000) | CC | 27 | 33.33 | 60 | 37.27 | – |
| | CT | 39 | 48.15 | 69 | 42.86 | 0.493 |
| | TT | 15 | 18.52 | 32 | 19.87 | 0.864 |
| <i>APOE</i> status | $\epsilon 4$ carriers | 35 | 42.68 | 112 | 69.57 | – |
| | $\epsilon 4$ non-carriers | 47 | 57.32 | 49 | 30.43 | < 0.0001 |

n = number of subjects.

Table 2

Logistic regression analysis for association of Alzheimer's disease (AD) with single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *MTHFR*, *PICALM*, and *CLU* genes.

| Gene (SNPs) | Genotypes | AD (%) | Controls (%) | OR (95% CI) | <i>p</i> * | OR (95% CI) | <i>p</i> ** |
|------------------------------|-----------|--------|--------------|----------------------|------------|-----------------------|-------------|
| <i>MTHFR</i> (rs1801133) | CC | 31.71 | 43.48 | 1 (reference) | – | 1 (reference) | – |
| | CT | 63.41 | 48.45 | 1.795 (1.014-3.176) | 0.045 | 2.446 (1.207-4.958) | 0.013 |
| | TT | 4.88 | 8.07 | 0.828 (0.248-2.772) | 0.760 | 0.69 (0.155-3.069) | 0.626 |
| <i>PICALM</i> (rs3851179) | AA | 40.24 | 47.83 | 1 (reference) | – | 1 (reference) | – |
| | AG | 51.22 | 50.31 | 1.21 (0.696-2.102) | 0.499 | 1.297 (0.659-2.551) | 0.451 |
| | GG | 8.54 | 1.86 | 5.444 (1.326-22.539) | 0.019 | 14.276 (2.049-99.440) | 0.007 |
| <i>CLU</i> (rs11136000) | CC | 33.33 | 37.27 | 1 (reference) | – | 1 (reference) | – |
| | CT | 48.15 | 42.86 | 1.256 (0.689-2.290) | 0.457 | 1.319 (0.626-2.782) | 0.466 |
| | TT | 18.52 | 19.87 | 1.042 (0.486-2.234) | 0.917 | 0.593 (0.226-1.555) | 0.288 |

*Crude *p* value. ***p* value adjusted for age, gender, educational attainment, and *APOE-ε4* status. OR = odds ratio, CI = confidence interval.

4.3 CAPÍTULO 3

Manuscrito submetido ao periódico *DNA and Cell Biology*

Genetic damage in Alzheimer's disease patients: evaluation with the micronucleus assay

Luciano Belcavello^a, Daniela Camporez^a, Geralda Gillian Silva-Sena^b, Renato Lírio Morelato^c, Flavia de Paula^a, Maria do Carmo Pimentel Batitucci^a

^a*Department of Biological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Av Marechal Campos, 1468, Maruípe, 29.043-900, ES, Brazil.* ^b*Department of Integrated Education in Health, Federal University of Espírito Santo, ES, Brazil.* ^c*School of Health Sciences of the Santa Casa de Vitória, EMESCAM, ES, Brazil*

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a complex neurodegenerative pathology and the commonest type of dementia in the elderly. Although its cause is unknown, several studies suggests that oxidative stress plays an important role in the aetiology of the disease and some cytogenetic studies indicate that cells of AD patients show increased chromosomal damage. In this case-control study, we used the cytokinesis-block micronucleus assay in peripheral blood lymphocytes and the buccal micronucleus cytome assay in exfoliated buccal cells to assess the cytogenetic damage in AD patients. Additionally, we performed the thiobarbituric acid reactive substances assay to estimate the plasma level of malondialdehyde (MDA), a biomarker of lipid peroxidation. The AD patients showed increased frequencies of chromosomal damage biomarkers in lymphocytes (MN, buds, and nucleoplasmic bridges) and in exfoliated buccal cells (MN, buds, and binucleated cells) compared to controls ($p <$

0.05). Frequencies of cell death biomarkers evaluated in exfoliated buccal cells (condensed chromatin, karyorrhexis, and pyknosis), as well as plasma level of MDA were significantly greater in the AD patients compared to controls ($p < 0.05$). These results suggest that AD is a condition with increased oxidative stress and genomic instability that may contribute in a meaningful way to the neurodegeneration observed in the AD patients.

Keywords: Alzheimer's disease; Micronucleus; CBMN assay; BMNcyt assay; Malondialdehyde; Oxidative stress.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the commonest cause of dementia in elderly, accounting for approximately 60–70% of all dementias, which currently affect nearly 35 million people worldwide (Alzheimer's Disease International 2013). This devastating disease is characterised by a progressive neurodegeneration that begins with memory loss and, by the final stages of AD, the affected individuals experience changes in personality, decline in the ability to interact with their surroundings, and an inability to care for oneself (Querfurth and LaFerla 2010). Although the pathogenesis of the disease is still not completely understood, its aetiology is considered to be multifactorial, involving many environmental and genetic factors. Examples of mechanisms implicated in nerve cell death and dysfunction include calcium dysregulation, proteolysis failure, altered cell signaling, mitochondrial dysfunction and oxidative stress, and inflammation that lead to synaptic dysfunction and neurodegeneration (Pimplikar et al. 2010).

Oxidative stress is accepted as playing a key role in the pathology of AD (Lovell and Markesbery 2007; Jomova et al. 2010; Hardas et al. 2013). This process results from an

imbalance between the elevated free radical production and the decrease in either free radical scavenging or the mechanisms used to repair the oxidized macromolecules. The overproduction of reactive oxygen species (ROS), such as O_2^- , OH^\bullet , and H_2O_2 , is capable of damaging proteins, lipids and DNA leading to cellular instability events such chromosomal damage and cell death (Lovell et al. 1995; Thomas and Fenech 2007). Lipid peroxidation is one of the most important expressions of oxidative stress induced by ROS and results in the production of toxic aldehydes. Among these, the most abundant aldehyde is malondialdehyde (MDA), a mutagenic compound measured through the chemical determination of thiobarbituric acid reactive substances – TBARs (Marnett 1999; Pizzimenti et al. 2013; Uchida 2013).

Searching for biomarkers of genomic instability is fundamental to improve the implementation of biomonitoring, diagnosis, and treatment of diseases caused by, or associated with genetic damage. In this context, micronucleus (MN) assay is considered a reliable biomarker of genetic instability in numerous applications (Benedetti et al. 2013; Çelik et al. 2010; Holland et al. 2011; Migliore et al. 2011). MN originate from chromosome fragments or whole chromosomes that lag behind at anaphase during nuclear division. This may occur due to excessive exposure to chromosome-damaging agents, defects in mitosis, and/or DNA misrepair (Holland et al. 2008). MN can be easily assessed in lymphocytes and exfoliated cells to obtain a measure of genome damage induced *in vivo* (Ceppi et al. 2010).

The aim of this study was to use the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay in peripheral blood lymphocytes and the buccal micronucleus cytome (BMNcyt) assay in exfoliated buccal cells to assess whether AD patients could show an increase in cytogenetic damage. Additionally, we performed the TBARs assay to estimate the level of lipid peroxidation in these patients.

Materials and Methods

Subjects

Non-consanguineous subjects, comprising late-onset AD patients and nondemented healthy controls were recruited by invitation to participate in this study while awaiting care in the Geriatric Unit of the Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Espírito Santo State, Brazil. During a face-to-face interview, the volunteers or their caregivers were asked to answer an adapted questionnaire from the International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (Carrano and Natarajan 1988), which provided information about demographic data (age, sex, ethnicity etc), lifestyle (smoking, coffee, tea and alcohol consumption, diet etc), and medical issues (exposure to X-rays, vaccinations, medication, chronic diseases, recent surgery etc). The patient evaluation was performed by an experienced clinician. All of the cases fulfilled the clinical criteria for probable AD (McKhann et al. 2011) and had a complete diagnostic evaluation for dementia, including CT scan, standard laboratory tests performed at the time of diagnosis and repeated after 2 years (complete blood count, serum electrolytes, serum glucose, blood urea nitrogen, vitamin B12, folate, thyroid function, and syphilis serology), Mini-Mental State Examination (MMSE) (Folstein et al. 1975), and Clinical Dementia Rating Scale (CDR) (Morris 1993). The control sample was matched by age and gender and consisted of volunteers who presented a score greater than 28 on the MMSE and who did not have cognitive deficit or known relatives with AD. To minimize confounding factors, all subjects in this protocol were purposely selected to be non-smokers, non-alcoholic and did not have recent X-ray exposition.

Blood samples were collected through venipuncture with EDTA from 50 subjects (for TBARS assay), and with heparin from 20 subjects (for CBMN assay). Buccal cells were collected by gently rubbing the inside of the cheeks of 20 subjects using a cytobrush. For both CBMN and

BMNcyt assays, the AD patients and the control group consisted of 7 females and 3 males each (mean age: 81.0 ± 7.3 and 82.0 ± 8.7 , respectively, $p = 0.909$), with patients presenting the disease for a mean duration of 3.8 ± 3.0 years (range: 1–10 years). For the TBARs assay, both the AD patients and the control group consisted of 20 females and 5 males each (mean age: 80.0 ± 5.5 and 80.5 ± 10.7 , respectively, $p = 0.884$), with patients presenting the disease for a mean duration of 4.3 ± 3.0 years (range: 1–10 years). All of the patients were on cholinergic therapy at the time of enrolment in the study. This study was approved by the Research Ethics Committee of Emescam (School of Health Sciences of Santa Casa de Vitória) and written informed consent was obtained from each subject or from their surrogates prior to their inclusion in the study. All experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Cytokinesis-block Micronucleus Assay in Human Peripheral Blood Lymphocytes

The lymphocytes were cultured according to the methodology developed by Fenech and Morley (1985), with minor modifications. Briefly, 0.5 ml of whole peripheral blood was added to 5 ml of RPMI 1640 (Gibco) supplemented with L-glutamine (0.5 mg/ml) and antibiotics (100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin), 20% fetal calf serum (Gibco), and 200 µL of phytohemagglutinin (Gibco) to stimulate lymphocytes division. The cultures were incubated in duplicate at 37 °C for 72 h in an atmosphere of 5% CO₂. Cytochalasin B (Sigma) was added at 44 h, at a concentration of 6 µg/ml to block the cytokinesis, thus ensuring the accumulation of binucleated cells. Cells were harvested by centrifugation (800 rpm, 6 min) 72 h after stimulation with phytohemagglutinin, hypotonically treated with 0.075 M KCl to lyse red blood cells, fixed with cold fresh solution of 3:1 methanol: glacial acetic acid, and stained with Giemsa 5% (diluted in Sorensen buffer) for 6 min. For each subject, 2000 binucleated cells with well-preserved cytoplasm (1000 cells from each of two replicate cultures) were

scored for the presence of MN, buds, and nucleoplasmic bridges, following the criteria described by Bolognesi and Fenech (2013). Frequencies of cells carrying these abnormalities were expressed per 1000 binucleated cells scored. The nuclear division index (NDI) was calculated as a measure of cell proliferation in 1000 cells per subject according to the following formula: $NDI = (M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4)/N$, where M_1 , M_2 , M_3 and M_4 represent the number of cells with 1–4 nuclei and N is the total number of cells (Eastmond and Tucker 1989). The analyses were performed using an optical microscope (Leica DM500, 1000x).

Buccal Micronucleus Assay

Subjects were asked to rinse their mouths with water and a premoistened cytobrush was used to sample cells from both sides of the interior cheek. The swab was immersed in 5 ml cold saline (0.9% w/v, aqueous NaCl) in a conical tube. Cell samples were centrifuged at 1500 rpm for 10 min and the resulting pellets were washed three times more with 2 ml of saline under the same centrifugation conditions. Cell suspension was dropped onto a slide, air dried, and fixed in 80% methanol. Slides were stained with pure Leishman for 2 min followed by 15 min in 10% Leishman aqueous solution, rinsed in distilled water, and air dried. We considered the criteria of scoring described by Thomas and co-workers (2009). The BMNcyt assay measures biomarkers of DNA damage (MN and buds), cell death (condensed chromatin, pyknosis, karyorrhexis and karyolysis), and cytokinetic defects (binucleated cells). Two thousand basal and differentiated cells per subject (1000 from each duplicate slide) were blindly scored by the same person, using an optical microscopy (Leica DM500, 1000x).

TBARs (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) Assay

Malondialdehyde (MDA) is an end product of fatty acid peroxidation and reacts with thiobarbituric acid (TBA) to form a stable pink to red complex that has maximum absorbance

at 532 nm (Jain 1985). Measurement of MDA through TBA reactivity is the most widely used method for estimate the overall lipid peroxidation level (Nielsen et al. 1997). We adopted a modified method from Buege and Aust (1978). Blood samples were kept in ice bath until the time of centrifugation, which was performed at 1500 rpm for 10 min. Plasma samples were stored at -80°C until analysis. To a volume of 1 ml of plasma were added 2 ml of aqueous acid solution (trichloroacetic acid 15%, TBA 0.375%, HCl 0.25 N and 2.5 mM of ethanol solution of butylated hydroxytoluene, BHT). BHT, an antioxidant, was added to prevent MDA formation during the assay, which could result in falsely elevated TBA reactivity. Samples were heated for 30 min at 95°C , cooled at room temperature, and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Absorbance values were read in spectrophotometer at 532 and 572 nm. Absorbance at 572 nm was subtracted from absorbance at 532 nm. MDA values were estimated with the extinction coefficient of MDA-TBA complex at 532 nm = $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Valenzuela 1991).

Statistical Analysis

The normality of data was checked using the D'Agostino-Pearson test. Comparisons of mean values between groups were examined by parametric (unpaired Student's *t* test) or non parametric Mann Whitney U test, when applicable. Data were expressed as mean \pm standard deviation and atwo-tailed probability value less than 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the software Graphpad Prism (Graphpad, Inc., San Diego, CA).

Results

Table 1 summarizes the data obtained from the CBMN and BMNcyt assays. Evaluation of binucleated cells revealed higher frequencies of MN ($p = 0.015$), nucleoplasmic bridges ($p =$

0.002), and buds ($p = 0.009$) in lymphocytes of AD patients, when compared with healthy controls. Evaluation of epithelial buccal cells revealed elevated frequencies of MN ($p = 0.016$), buds ($p = 0.001$), binucleated cells ($p = 0.006$), condensed chromatin ($p = 0.006$), karyorrhexis ($p = 0.040$), and pyknosis ($p = 0.018$) in AD patients, in relation to healthy controls. The mean level of MDA (as TBARs) in plasma was significantly higher in AD patients, when compared with healthy controls ($p = 0.033$, Fig. 1).

Discussion

In this study, we show enhanced frequencies of biomarkers of chromosomal damage in somatic cells of patients affected by AD, compared with healthy controls. Early studies employing the CBMN assay reported a higher frequency of MN in peripheral lymphocytes of these patients, when compared to controls (Migliore et al. 1997, 2011; Petrozzi et al. 2002). In our experiments, we additionally reported the frequencies of nucleoplasmic bridges and buds in lymphocytes of AD patients. The inclusion of these markers of chromosomal damage allows the assessment of complementary events of genomic instability. Nucleoplasmic bridges are suspected to result from chromosomal rearrangements involving more than one centromere or chromatids that migrated to opposite poles of the cell during anaphase (Fenech et al. 2011). Buds, in turn, are structures composed of amplified DNA and appear to result from events that induce gene amplification (Shimizu et al. 1998).

The MN assay in exfoliated buccal cells is a minimally invasive and potentially useful method for monitoring genetic damage in human population. Biomarkers of this assay have been associated with increased risk for accelerated aging, cancer, and neurodegenerative diseases (Fenech et al. 2011). In our study, we adopted the cytome approach to score not only MN but also other biomarkers of nuclear abnormalities (buds), cytokinetic defects (binucleated cells) and cell death (condensed chromatin, karyorrhectic, karyolytic, and pyknotic cells).

Binucleated cells may result from failure of cytokinesis due to aneuploidy; however, the significance of these cells is not understood (Bonassi et al. 2011). Buccal cells with condensed chromatin may be undergoing early stages of apoptosis, while karyorrhexis, karyolysis, and pyknosis are indicators of a late stage of apoptosis, a process under genetic control and required for both normal development and tissue dynamics. However, the mechanisms leading to the formation of these biomarkers are currently unknown (Thomas et al. 2009).

Information regarding MN analysis in buccal epithelium cells of AD patients is scarce in the available literature, with only one study reported by Thomas and co-workers (2007). The authors detected a slight increase in MN frequency in their AD cohort but this failed to reach significance. They also reported significant lower frequencies of condensed chromatin cells and karyorrhectic cells in AD patients compared with controls. These results are in an opposite direction to those obtained in our study. We found significantly increased frequencies of these markers in AD patients compared to healthy controls. Additionally, we detected significantly enhanced frequencies of buds, binucleated cells, and pyknosis in AD patients. Such different results may be partly explained by the features of the cohorts: our AD cohort was composed of patients who developed the disease for a mean period of 3.8 ± 3.0 years and were undergoing treatment with cholinesterase inhibitors at the time of enrolment in the study. In contrast, the study of Thomas and co-workers (2007) comprised newly diagnosed AD cohort prior to the commencement of any treatment. Nevertheless, these changes indicate that buccal cells of AD patients show significant alteration in the cellular kinetics and may be useful as predictive biomarkers in identifying individuals with elevated risk to develop or having AD.

Oxidative damage is implicated in the pathogenesis of several neurodegenerative diseases, and growing evidence points to the involvement of free radicals in mediating neuronal death in these illnesses (Christen 2000; Mecocci et al. 2002). We used the TBARs assay to estimate the level of MDA, the most abundant aldehyde resulting from lipid peroxidation (Uchida 2013). Similarly to other studies (Bourdel-Marchasson et al. 2001, Torres et al. 2011), we detect a significantly higher plasma level of MDA in AD patients, compared with healthy controls. This result supports the hypothesis that oxidative stress may play an important role in the aetiology of AD. Because MDA is a toxic and mutagenic product and may damage genomic material and membranes of cells (Marnett 1999; Pizzimenti et al. 2013), we hypothesise that the higher frequencies of DNA damage observed in the CBMN and BMNcyt assays in the AD patients may be a consequence of elevated oxidative damage in these patients. Finally, in addition to the reported literature, our results suggest that AD is a condition with increased oxidative stress and genomic instability characterized by elevated lipoperoxidation and DNA damage that may contribute in a meaningful way to the neurodegeneration observed in AD patients. It is important to consider that these findings need to be replicated in other populations and at different stages of dementia to validate these biomarkers of genomic instability as reliable predictors of neurodegenerative risk.

Acknowledgments

This study was supported by Fundo de Apoio à Ciência e Tecnologia do Município de Vitória (grant number 5928/2011), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo, and MCTI/CNPq/MEC/CAPES (Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação / Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / Ministério da Educação / Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, grant number 552672/2011-4).

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Alzheimer's Disease International (2013) World Alzheimer Report 2013. <http://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2013.pdf>. Accessed 14 October 2013
- Benedetti D, Nunes E, Sarmento M, Porto C, Dos Santos CE, Dias JF, da Silva J (2013) Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mutat Res* 752:28–33. doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.01.001
- Bolognesi C, Fenech M (2013) Micronucleus assay in human cells: lymphocytes and buccal cells. *Methods Mol Biol* 1044:191–207. doi: 10.1007/978-1-62703-529-3_10
- Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, Burgaz S, Holland N, Kirsh-Volders M, Knasmueller S, Zeiger E, Carnesoltas D, Cavallo D, da Silva J, de Andrade VM, Demircigil GC, Domínguez Odio A, Donmez-Altuntas H, Gattas G, Giri A, Giri S, Gómez-Meda B, Gómez-Arroyo S, Hadjidekova V, Haveric A, Kamboj M, Kurteshi K, Martino-Roth MG, Montero Montoya R, Nersesyan A, Pastor-Benito S, Favero Salvadori DM, Shaposhnikova A, Stopper H, Thomas P, Torres-Bugarín O, Yadav AS, Zúñiga González G, Fenech M (2011) The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res* 728:88–97. doi: 10.1016/j.mrrev.2011.06.005
- Bourdel-Marchasson I, Delmas-Beauvieux MC, Peuchant E, Richard-Harston S, Decamps A, Reignier B, Emeriau JP, Rainfray M (2001) Antioxidant defences and oxidative stress

- markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. *Age Ageing* 30:235–241
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302–310
- Carrano AV, Natarajan AT (1988) International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res* 204:379–406
- Celik A, Diler SB, Eke D (2010) Assessment of genetic damage in buccal epithelium cells of painters: micronucleus, nuclear changes, and repair index. *DNA Cell Biol* 29:277–284. doi: 10.1089/dna.2009.0996
- Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S (2010) Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. *Mutat Res* 705:11–19. doi: 10.1016/j.mrrev.2009.11.001
- Christen Y (2000) Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 71:621S–629S
- Eastmond DA, Tucker JD (1989) Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environ Mol Mutagen* 13:34–43
- Fenech M, Holland N, Zeiger E, Chang WP, Burgaz S, Thomas P, Bolognesi C, Knasmueller S, Kirsch-Volders M, Bonassi S (2011) The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells – past, present and future. *Mutagenesis* 26:239–245. doi: 10.1093/mutage/geq051
- Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surrallés J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P (2011) Molecular mechanisms of micronucleus,

- nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26:125–132. doi: 10.1093/mutage/geq052
- Fenech M, Morley A (1985) Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios* 43:233–246
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975) "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12:189–198
- Hardas SS, Sultana R, Clark AM, Beckett TL, Szweda LI, Murphy MP, Butterfield DA (2013) Oxidative modification of lipoic acid by HNE in Alzheimer disease brain. *Redox Biol* 1:80–85. doi: 10.1016/j.redox.2013.01.002
- Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M (2008) The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res* 659:93–108. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.03.007
- Jain SK (1985) In vivo externalization of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in the membrane bilayer and hypercoagulability by the lipid peroxidation of erythrocytes in rats. *J Clin Invest* 76:281–286
- Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M (2010) Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem* 345:91–104. doi: 10.1007/s11010-010-0563-x
- Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR (1995) Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 45:1594–1601

- Lovell MA, Markesbery WR (2007) Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 85:3036–3040
- Marnett LJ (1999) Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424:83–95
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH (2011) The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging–Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7:263–269. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005
- Mecocci P, Polidori MC, Cherubini A, Ingegneri T, Mattioli P, Catani M, Rinaldi P, Cecchetti R, Stahl W, Senin U, Beal MF (2002) Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 59:794–798
- Migliore L, Coppedè F, Fenech M, Thomas P (2011) Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases. *Mutagenesis* 26:85–92. doi: 10.1093/mutage/geq067
- Migliore L, Testa A, Scarpato R, Pavese N, Petrozzi L, Bonuccelli U (1997) Spontaneous and induced aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Hum Genet* 101:299–305
- Morris JC (1993) The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology* 43:2412–2414
- Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P (1997) Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of lifestyle factors. *Clin Chem* 43:1209–1214

- Petrozzi L, Lucetti C, Scarpato R, Gambaccini G, Trippi F, Bernardini S, Del Dotto P, Migliore L, Bonuccelli U (2002) Cytogenetic alterations in lymphocytes of Alzheimer's disease and Parkinson's disease patients. *Neurol Sci* 23:S97–S98
- Pimplikar SW, Nixon RA, Robakis NK, Shen J, Tsai LH (2010) Amyloid-independent mechanisms in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci* 30:14946–14954. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4305-10.2010
- Pizzimenti S, Ciamporcero E, Daga M, Pettazzoni P, Arcaro A, Cetrangolo G, Minelli R, Dianzani C, Lepore A, Gentile F, Barrera G (2013) Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Front Physiol* 4:1–17
- Querfurth HW, LaFerla FM (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362:329–344
- Shimizu N, Itoh N, Utiyama H, Wahl GM (1998) Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J Cell Biol* 140:1307–1320
- Thomas P, Fenech M (2007) A review of genome mutation and Alzheimer's disease. *Mutagenesis* 22:15–33
- Thomas P, Fenech M (2011) Buccal micronucleus cytome assay. *Methods Mol Biol* 682:235–248. doi: 10.1007/978-1-60327-409-8_17
- Thomas P, Hecker J, Faunt J, Fenech M (2007) Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated with Alzheimer's disease. *Mutagenesis* 22:371–379
- Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M (2009) Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 4:825–437
- Torres LL, Quaglio NB, de Souza GT, Garcia RT, Dati LM, Moreira WL, Loureiro AP, de Souza-Talarico JN, Smid J, Porto CS, Bottino CM, Nitrini R, Barros SB, Camarini R,

Marcourakis T (2011) Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 26:59–68. doi: 10.3233/JAD-2011-110284

Uchida K (2013) Redox-derived damage-associated molecular patterns: ligand function of lipid peroxidation adducts. *Redox Biol* 1:94–96

Valenzuela A (1991) The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci* 48:301–309

Table 1

The cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay in peripheral blood lymphocytes and the buccal micronucleus cytome (BMNcyt) assay from AD patients and nondemented healthy controls (means \pm standard deviation, %). Two thousand binucleated cells (one thousand from each of the duplicate culture) were scored per subject in the CBMN assay. Two thousand epithelial buccal cells (one thousand from each of the duplicate slide) were scored per subject in the BMNcyt assay

| Parameters | Groups | | <i>p</i> |
|-----------------------|--------------------------|------------------------------|----------|
| | Control (<i>n</i> = 10) | AD patients (<i>n</i> = 10) | |
| CBMN assay | | | |
| Micronuclei | 7.7 \pm 2.7 | 11.5 \pm 3.3 | 0.015 |
| Nucleoplasmic bridges | 0.6 \pm 0.2 | 1.4 \pm 0.6 | 0.002 |
| Nuclear buds | 1.9 \pm 1.0 | 4.0 \pm 1.9 | 0.009 |
| NDI | 2.0 \pm 0.2 | 1.9 \pm 0.9 | 0.150 |
| BMNcyt assay | | | |
| Micronuclei | 3.1 \pm 1.6 | 5.0 \pm 1.6 | 0.016 |
| Nuclear buds | 0.7 \pm 0.6 | 2.6 \pm 1.4 | 0.001 |
| Binucleated cells | 12.0 \pm 3.5 | 27.4 \pm 15.4 | 0.006 |
| Condensed chromatin | 33.6 \pm 21.7 | 66.4 \pm 25.4 | 0.006 |
| Karyorrhexis | 16.9 \pm 15.4 | 32.5 \pm 17.9 | 0.040 |
| Karyolysis | 283.7 \pm 141.7 | 168.0 \pm 129.8 | 0.073 |
| Pyknosis | 2.6 \pm 1.2 | 4.2 \pm 1.4 | 0.018 |

NDI = nuclear index division in 1000 cells per subject, *n* = number of subjects. Student's *t* test or Mann Whitney U test.

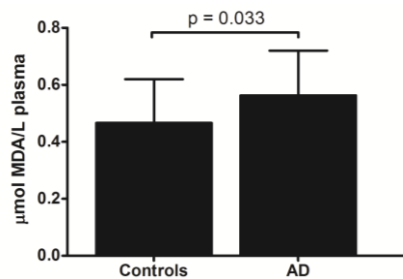


Fig. 1 Comparison of malondialdehyde (MDA) levels in plasma of AD patients (*n* = 25) and nondemented healthy controls (*n* = 25). Student's *t* test.

5 REFERÊNCIAS

ALONSO-VILATELA, M.E.; LÓPEZ-LÓPEZ, M.; YESCAS-GÓMEZ, P. Genetics of Alzheimer's disease. **Arch. Med. Res.**, v. 43, p. 622–31, 2012.

ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. World Alzheimer Report 2013. Disponível em: <<http://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2013.pdf>>. Acesso em 14 de outubro 2013.

AMADOR-ORTIZ, C. et al. TDP-43 immunoreactivity in hippocampal sclerosis and Alzheimer's disease. **Ann. Neurol.**, v. 61, p. 435–45, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALZHEIMER. Disponível em: <<http://abraz.org.br/>>. Acesso em 12 de agosto de 2013.

BARNES, D.E.; YAFFE, K. The projected impact of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. **Lancet Neurol.**, v. 10, p. 819–828, 2011.

BEAL, M.F. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Ann. Neurol.**, v. 38, p. 357–366, 1995.

BLACKER, D. et al. ApoE-4 and age at onset of Alzheimer's disease: the NIMH genetics initiative. **Neurology**, v. 48, p. 139–147, 1997.

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**, v. 114, p. 797–811, 1968.

BOLLER, F.; FORBES, M.M. History of dementia and dementia in history: an overview. **J. Neurol. Sci.**, v. 158, p. 125–133, 1998.

BOLOGNESI, C.; FENECH, M. Micronucleus assay in human cells: lymphocytes and buccal cells. **Methods Mol. Biol.**, v. 1044, p. 191–207, 2013.

BOTTINO, C.M. et al. Estimate of dementia prevalence in a community sample from São Paulo, Brazil. **Dement. Geriatr. Cogn. Disord.**, v. 26, p. 291–299, 2008.

BOURDEL-MARCHASSON, I. et al. Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. **Age Ageing**, v. 30, p. 235–241, 2001.

BUDA, O. et al. Georges Marhninesco and the early research in neuropathology. **Neurology**, v. 72, p. 88–91, 2009.

BUTTERFIELD, D.A.; BADER-LANGE, M.L.; SULTANA, R. Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1801, p. 924–929, 2010.

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

CALERO, M. et al. Apolipoprotein J (clustein) and Alzheimer's disease. **Microsc. Res. Tech.**, v. 50, p. 305–315, 2000.

CANEVARI, L.; CLARK, J.B. Alzheimer's disease and cholesterol: the fat connection. **Neurochem. Res.**, v. 32, p. 739–750, 2007.

CARRILLO, M.C.; THIES, W.; BAIN, L.J. The global impact of Alzheimer's disease. In: Hampel H, Carrillo MC (Eds): Alzheimer's disease – modernizing concept, biological diagnosis and therapy. **Adv. Biol. Psychiatry**, v. 28, Basel: Karger, 2012, p. 1–14.

CARTER, S.B. Effects of cytochalasins on mammalian cells. **Nature**, v. 213, p. 261–264, 1967.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.**, v. 59, p. 527–605, 1979.

CHRISTEN, Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, p. 621S–629S, 2000.

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

CORDER, E.H. et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. **Nat. Genet.**, v. 7, p. 180–184, 1994.

CORRADA, M.M. et al. Dementia incidence continues to increase with age in the oldest old: the 90+ study. **Ann. Neurol.**, v. 67, p. 114–121, 2010.

DELIBAS, N; OZCANKAYA, R; ALTUNTAS, I. Clinical importance of erythrocyte malondialdehyde levels as a marker for cognitive deterioration in patients with dementia of Alzheimer type: a repeated study in 5-year interval. **Clin. Biochem.**, v. 35, p. 137–141, 2002.

Di LUCA, M. et al. Differential level of platelet amyloid beta precursor protein isoforms: an early marker for Alzheimer disease. **Arch. Neurol.**, v. 55, p. 1195–1200, 1998.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 11, p. 81–128, 1991.

FENECH, M. et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutat. Res.**, v. 534, p. 65–75, 2003.

FENECH, M. The in vivo micronucleus technique. **Mutat. Res.**, v. 455, p. 81–95, 2000.

FENECH, M.; MOORLEY, A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus test. **Cytobios**, v. 43, p. 233–246, 1985.

GODINHO, C. et al. Clinical and demographic characteristics of elderly patients with dementia assisted at an outpatient clinic in Southern Brazil. **Dement. Neuropsychol.**, v. 4, p. 42–46, 2010.

GODOY, M.R. et al. Etiological profile of dementia in an ambulatory population. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 56, p. 334, 1998.

GUERREIRO, R.J.; GUSTAFSON, D.R.; HARDY, J. The genetic architecture of Alzheimer's disease: beyond APP, PSENs and APOE. **Neurobiol. Aging.**, v. 33, p. 437–56, 2012.

HAROLD, D. et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. **Nat. Genet.**, v. 41, p. 1088–1093, 2009.

HERRERA, E. et al. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer Dis. Assoc. Disord.**, v. 16, p. 103–108, 2008.

HERRUP, K. Current conceptual view of Alzheimer's disease. In: Hampel H, Carrillo MC (Eds): Alzheimer's disease – modernizing concept, biological diagnosis and therapy. **Adv. Biol. Psychiatry**, v. 28, Basel: Karger, 2012, p. 30–48.

HOLLINGWORTH, P. et al. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. **Nat. Genet.**, v. 43, p. 429–435, 2011.

HOLTZMAN, D.M.; MORRIS, J.C.; GOATE, A.M. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. **Sci. Transl. Med.**, v. 3, p. 77sr1, 2011.

HUA, Y. et al. Association between the MTHFR gene and Alzheimer's disease: a meta-analysis. **Int. J. Neurosci.**, v. 121, p. 462–471, 2011.

JONSSON, T. et al. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 368, p. 107–116, 2013.

JUN, G. et al. Meta-analysis confirms CR1, CLU, and PICALM as alzheimer disease risk loci and reveals interactions with APOE genotypes. **Arch. Neurol.**, v. 67, p. 1473–1484, 2010.

KADOKURA, A. et al. Regional distribution of TDP-43 inclusions in Alzheimer disease (AD) brains: their relation to AD common pathology. **Neuropathology**, v. 29, p. 566–573, 2009.

KIM, J.; BASAK, J.M.; HOLTZMAN, D.M. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 63, p. 287–303, 2009.

LaDU, M.J. et al. Purification of apolipoprotein E attenuates isoform-specific binding to beta-amyloid. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 9039–9042, 1995.

LaFERLA, F.M.; GREEN, K.N.; ODDO, S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 8, p. 499–509, 2007.

LAMBERT, J.C. et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. **Nat. Genet.**, v. 41, p. 1094–1099, 2009.

LAMBERT, J.C. et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. **Nat. Genet.**, 2013, doi:10.1038/ng.2802.

LAMBERT, J.C.; AMOUYEL, P. Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis? **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 21, p. 295–301, 2011.

LEONI, V. The effect of apolipoprotein E (ApoE) genotype on biomarkers of amyloidogenesis, tau pathology and neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 49, p. 375–383, 2011.

LEVY-LAHAD, E. et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. **Science**, v. 269, p. 973–977, 1995.

LÓPEZ, N. et al. Oxidative stress in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment with high sensitivity and specificity. **J. Alzheimers Dis.**, v. 33, p. 823–829, 2013.

LOVELL, M.A.; MARKESBERY, W.R. Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. **J. Neurosci. Res.**, v. 85, p. 3036–3040, 2007.

MANSOORI, N. et al. MTHFR (677 and 1298) and IL-6-174 G/C genes in pathogenesis of Alzheimer's and vascular dementia and their epistatic interaction. **Neurobiol. Aging.**, v. 33, p. 1–8, 2012.

MAHLEY, R.W.; RALL, S.C.Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 1, 507–537, 2000.

MARNETT, L.J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutat. Res.**, v. 424, p. 83–95, 1999.

MECOCCI, P. et al. Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease. **Arch. Neurol.**, v. 59, p. 794–798, 2002.

MECOCCI, P. et al. Oxidative damage to DNA in lymphocytes from AD patients. **Neurology**, v. 51, p. 1014–1017, 1998.

MIGLIORE, L. et al. Spontaneous and induced aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. **Hum. Genet.**, v. 101, p. 299–305, 1997.

MIYASHITA, A. et al. SORL1 is genetically associated with late-onset Alzheimer's disease in Japanese, Koreans and Caucasians. **PLoS One**, v. 8, e58618, 2013.

MOREIRA, P.I. et al. The (un)balance between metabolic and oxidative abnormalities and cellular compensatory responses in Alzheimer disease. **Mech. Ageing Dev.**, v. 127, p. 501–506, 2006.

MUNIZ, J.F. et al. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 227, p. 97–107, 2008.

NAJ, A.C. et al. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. **Nat. Genet.**, v. 43, p. 436–441, 2011.

NEGRE-SALVAYRE, A. et al. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. **Br. J. Pharmacol.**, v. 153, p. 6–20, 2008.

NEGRE-SALVAYRE, A. et al. Pathological aspects of lipid peroxidation. **Free Radic. Res.**, v. 44, p. 1125–1171, 2010.

NELSON, P.T. et al. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. **Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 71, p. 362–381, 2012.

NITRINI, R. et al. Evaluation of 100 patients with dementia in São Paulo, Brazil: correlation with socioeconomic status and education. **Alzheimer Dis. Assoc. Disord.**, v. 9, p. 146–151, 1995.

PETROZZI, L. et al. Cytogenetic alterations in lymphocytes of Alzheimer's disease and Parkinson's disease patients. **Neurol. Sci.**, v. 23, p. S97–S98, 2002.

PIZZIMENTI, S. et al. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. **Front. Physiol.**, v. 4, p. 1–17, 2013.

POTTIER, C. et al. High frequency of potentially pathogenic SORL1 mutations in autosomal dominant early-onset Alzheimer disease. **Mol. Psychiatry**, v. 17, p. 875–879, 2012.

QUERFURTH, H.W.; LaFERLA, F.M. Alzheimer's disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 362, p. 329–344, 2010.

RECUERO, M. et al. Abeta production as consequence of cellular death of a human neuroblastoma overexpressing APP. **FEBS Lett.**, v. 570, p. 114–118, 2004.

RHEIN, V.; ECKERT, A. Effects of Alzheimer's amyloid-beta and tau protein on mitochondrial function – role of glucose metabolism and insulin signalling. **Arch. Physiol. Biochem.**, v. 113, p. 131–141, 2007.

ROGAEVA, E. et al. The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. **Nat. Genet.**, v. 39, p. 168–177, 2007.

SCAZUFCA, M. et al. Risk factors across the life course and dementia in a Brazilian population: results from the Sao Paulo Ageing & Health Study (SPAH). **Int. J. Epidemiol.**, v. 37, p. 879–890, 2008.

SCHIMITT, H.P. Protein ubiquitination, degradation and the proteasome in neurodegenerative disorders: no clear evidence for a significant pathogenetic role of proteasome failure in Alzheimer disease and related disorders. **Med. Hypotheses**, v. 67, p. 311–317, 2006.

SCHIPPER, H.M. et al. Evaluation of heme oxygenase-1 as a systemic biological marker of sporadic AD. **Neurology**, v. 54, p. 1297–1304, 2000.

SCHNEIDER, J.A. et al. Neuropathological basis of Alzheimer's disease and Alzheimer's disease diagnosis. In: Hampel H, Carrillo MC (Eds): Alzheimer's disease – modernizing concept, biological diagnosis and therapy. **Adv. Biol. Psychiatry**, v. 28, Basel: Karger, 2012, p. 49–70.

SCHU, M.C. et al. The genetics of Alzheimer's disease. In: Hampel H, Carrillo MC (Eds): Alzheimer's disease – modernizing concept, biological diagnosis and therapy. **Adv. Biol. Psychiatry**, v. 28, Basel: Karger, 2012, p. 15–29.

SESHADRI, S. et al. Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. **JAMA**, v. 303, p. 1832–1840, 2010.

SHERRINGTON, R. et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. **Nature**, v. 375, p. 754–760, 1995.

SHIMIZU, N. et al. Select entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **J. Cell. Biol.**, v. 140, p. 1307–1320, 1998.

SHIMIZU, N.; SHIMUARA, T.; TANAKA, T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutat. Res.*, v. 448, p. 81–90, 2000.

SIEST, G. et al. Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. **Clin. Chem.**, v. 41, p. 1068–1086, 1995.

SILVA, D.W.; DAMASCENO, B.P. Demência em pacientes do Hospital das Clínicas da UNICAMP. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 60, p. 996–999, 2002.

SINNHUBER, R.O.; YU, T.C.; YU, T.C. Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. **Food Res.**, v. 23, p. 626–634, 1958.

STRITTMATTER, W.J. et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 1977–1981, 1993.

SULTANA, R.; PERLUIGI, M.; BUTTERFIELD, D.A. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 62, p. 157–169, 2012.

TAKADA, L.T. et al. Prevalence of potentially reversible dementias in a dementia outpatient clinic of a tertiary university-affiliated hospital in Brazil. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 61, p. 925–929, 2003.

TASCONE, L.S. et al. Characteristics of patients assisted at an ambulatory of dementia from a university hospital. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 66, p. 631–635, 2008.

THOMAS, P. et al. Buccal micronucleus cytome assay. **Nat. Protoc.**, v. 4, p. 825–437, 2009.

THOMAS, P.; UMEGAKI, K.; FENECH, M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutagenesis**, v. 18, p. 87–194, 2003.

TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutat. Res.**, v. 271, p. 69–77, 1992.

TORRES, L.L. et al. Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **J. Alzheimers Dis.**, v. 26, p. 59–68, 2011.

UCHIDA, K. Redox-derived damage-associated molecular patterns: ligand function of lipid peroxidation adducts. **Redox Biol.**, v. 1, p. 94–96, 2013.

URYU, K. et al. Concomitant TAR-DNA-binding protein 43 pathology is present in Alzheimer disease and corticobasal degeneration but not in other tauopathies. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 67, p. 555–564, 2008.

VALE, F.A.; MIRANDA, S.J. Clinical and demographic features of patients with dementia attended in a tertiary outpatient clinic. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 60, p. 548–552, 2002.

VALENZUELA, A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. **Life Sci.**, v. 48, p. 301–309, 1991.

VIEIRA, R.T.; CAIXETA, L. Epidemiologia da doença de Alzheimer. In: Caixeta L (Ed). **Doença de Alzheimer**. Porto Alegre: Artmed, 2012, p. 57–70.

VITALE, C. et al. Surface expression and function of p75/AIRM-1 or CD33 in acute myeloid leukemias: engagement of CD33 induces apoptosis of leukemic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 5764–5769, 2001.

WANG, Y. et al. Temporal correlation of the memory deficit with Alzheimer-like lesions induced by activation of glycogen synthase kinase-3. **J. Neurochem.**, v. 106, p. 2364–2374, 2008.

WYSS-CORAY, T. et al. Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice. **Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 10837–10842, 2002.

ZIEGLER-GRAHAM, K. et al. Worldwide variation in the doubling time of Alzheimer's disease incidence rates. **Alzheimers Dement.**, v. 4, p. 316–323, 2008.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando o objetivo de avaliar as frequências de polimorfismos genéticos e a frequência de danos genômicos em células somáticas de pacientes com doença Alzheimer e controles, os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

- (i) As frequências genotípicas dos polimorfismos rs11136000 do gene *CLU* e rs6701713 do gene *CRI* não diferiram significativamente entre os grupos (pacientes com DA x controles pareados), indicando que esses polimorfismos não estão associados com risco para a DA na população estudada.
- (ii) Pacientes com DA apresentaram frequências aumentadas de biomarcadores de danos genômicos em linfócitos de sangue periférico e em células esfoliadas de mucosa bucal em relação aos controles, indicando que a instabilidade genômica pode ter um papel importante na etiologia da DA.
- (iii) Pacientes com DA apresentaram níveis plasmáticos significativamente elevados de malondialdeído (medido como TBARs), em relação aos controles, indicando que o estresse oxidativo elevado pode ser responsável, em parte, pelos danos genômicos observados nesses pacientes.

ANEXO – 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

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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 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 | | | |
| TELEFONE | | | |
| DATA NASCIMENTO | | IDADE | SEXO <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F |
| ENDEREÇO | | | |
| ETNIA | | ESCOLARIDADE | |

Responsável legal (se necessário):

| | | |
|----------|--|--------------------|
| NOME | | |
| IDADE | | 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 ou pelo seguinte endereço: Av. Nossa Senhora da Penha, 2190, Santa Luiza - Vitória - ES - 29045-402.

APÊNDICE B – 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"/> | <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?
 Por favor, indique sua média de consumo semanal

Comente sobre sua dieta, caso ela tenha algo de especial (por exemplo, dieta rica em proteínas e pobre em carboidratos etc).

■O(a) Sr(a) pratica alguma atividade física?

NÃO

SIM. Qual?

Com que frequência?

HISTÓRIA GENÉTICA

■O(a) Sr(a) tem conhecimento de algum defeito de nascimento ou outra desordem genética ou doença hereditária que tenha afetado seus pais, irmãos, irmãs ou seus filhos?

NÃO

SIM. Qual?

■A Sra teve ou tem dificuldade para engravidar?

NÃO

SIM. Especifique.

■O(a) Sr(a) já teve filho nascido prematuramente ou que tenha sido abortado?

NÃO

SIM

■O(a) Sr(a) tem um gêmeo idêntico vivo?

NÃO

SIM